

Wojskowy Instytut Medycyny Lotniczej



mgr inż. Ewelina Siwiak-Niedbalska

**OCENA MECHANIZMÓW CYTOTOKSYCZNEGO
WSPÓLDZIAŁANIA INHIBITORÓW GLIKOLIZY ORAZ
INHIBITORÓW DEACETYLAZ HISTONÓW (HDAC) W
MODELU IN VITRO GLEJAKA WIELOPOSTACIOWEGO**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: dr hab. n. med. inż. Beata Pająk, prof. WIHE
*(Samodzielna Pracownia Genetyki i Biologii
Molekularnej, Wojskowy Instytut Higieny i
Epidemiologii w Warszawie)*

Promotor pomocniczy: dr n. rol. Anna Jaśkiewicz
*(Samodzielna Pracownia Genetyki i Biologii
Molekularnej, Wojskowy Instytut Higieny i
Epidemiologii w Warszawie)*

Badania wykonano: *Samodzielna Pracownia Genetyki i Biologii
Molekularnej, Wojskowy Instytut Higieny i
Epidemiologii w Warszawie*

Warszawa, 2022

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania

Pani dr hab. n. med. inż. Beacie Pajak za nieocenioną pomoc udzieloną w trakcie przygotowywania niniejszej rozprawy doktorskiej, za cenne uwagi i sugestie oraz inspirację do zgłębiania zagadnień naukowych.

Chcę także podziękować Rodzicom za ich wsparcie na całej mojej drodze edukacji oraz Mężowi za cierpliwość, motywację i nigdy nie gasnąca wiarę we mnie.

Finansowanie

Badania prowadzone były w ramach realizacji projektu OPUS „Molekularne i farmakologiczne podstawy działania inhibitorów glikolizy jako czynników przełamujących lekooporność glejaka” (UMO-2017/25/B/NZ3/00251) finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Oświadczenie promotora pracy

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data

Podpis promotora pracy.....

Oświadczenie autora pracy

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza praca doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona praca nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni/instytucie naukowo-badawczym.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja pracy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data

Podpis autora pracy.....

Streszczenie

Ocena mechanizmów cytotoksycznego współdziałania inhibitorów glikolizy oraz inhibitorów deacetylaz histonów (HDACi) w modelu in vitro glejaka wielopostaciowego

Komórki nowotworowe preferują proces glikolizy jako główny szlak utylizacji glukozy i pozyskiwania energii niezależnie od dostępności tlenu. Komórki glejaka wielopostaciowego są szczególnie zależne od tego procesu. Hamowanie metabolizmu glukozy przez inhibitory glikolizy, np. 2-deoksy-D-glukozę (2-DG), jest jedną ze strategii przeciwnowotworowych, która z uwagi na niewystarczające właściwości farmakokinetyczne związku nie uzyskała rejestracji do stosowania w klinice. Acetylowana pochodna 2-DG - WP1122 wykazuje istotnie lepsze parametry farmakokinetyczne.

W rozwoju nowotworu ważną rolę odgrywa także regulacja ekspresji genów poprzez zmiany acetylacji/deacetylacji histonów, katalizowana przez acetylotransferazy (HAT) i deacetylasy histonowe (HDAC). Nadekspresja HDAC powoduje obniżenie poziomu acetylacji histonów i nieprawidłowe wyciszenie transkrypcji wielu genów. Dlatego inhibitory HDAC są rozpatrywane jako potencjalne leki przeciwnowotworowe. Powszechnie znanymi i najczęściej badanymi inhibitorami HDAC są maślan sodu (NaBt) i walproinian sodu (NaVPA).

Celem niniejszej pracy była analiza efektów oraz molekularnego mechanizmu współdziałania inhibitorów glikolizy (2-DG, WP1122) wraz z inhibitorami deacetylaz histonów (NaBt, NaVPA) w modelu in vitro glejaka wielopostaciowego. Efekt cytotoksyczny związków oceniono na podstawie parametrów zmian żywotności (test MTS, wyznaczenie IC_{50}), proliferacji (test BrdU) oraz natężenia biosyntezy białek (test z SRB) komórek GBM linii U-87 i U-251. Uzyskane wyniki wykazały, że wszystkie badane związki zależnie od dawki i czasu istotnie statystycznie obniżają żywotność komórek obu linii komórkowych. Wrażliwość komórek na cytotoksyczne oddziaływanie badanych związków nie była istotnie różna w warunkach normoksji oraz warunkach naśladujących hipoksję, co świadczy o silnie glikolitycznym metabolizmie komórek GBM.

Molekularny mechanizm oddziaływania inhibitorów glikolizy potwierdzono poprzez oznaczenie natężenia syntezy mleczanu oraz ATP, które były istotnie niższe pod wpływem działania 2-DG i WP1122 niż w komórkach nietraktowanych. Z kolei, specyficzność oddziaływania inhibitorów HDAC potwierdzono analizą aktywności HDAC w badanych komórkach GBM. Jak wykazały dalsze analizy, cytotoksyczne oddziaływanie badanych związków warunkowała aktywacja procesu apoptozy a nie autofagii, w komórkach.

Skojarzone traktowanie komórek GBM inhibitorami glikolizy i deacetylaz histonów potęgowało synergistycznie ich efekty cytotoksyczne. Z kolei zastosowanie pochodnej

WP1234, zawierającej w swojej strukturze podstawnik etylomaślanu, potwierdziło jej dwutorowy charakter oddziaływania i zdolność indukowania śmierci komórek na drodze ograniczenia aktywności procesu glikolizy oraz zmian epigenetycznych acetylacji histonów i ekspresji białek pro- i antyapoptotycznych.

Podsumowując uzyskane w ramach realizacji pracy doktorskiej wyniki, należy stwierdzić, iż obrona strategia jednoczesnego hamowania procesu glikolizy oraz aktywności deacetylaz histonów okazała się być skutecznym sposobem eliminacji komórek nowotworowych glejaka wielopostaciowego na drodze fizjologicznego procesu apoptozy. Ponadto, eliminacja komórek GBM była możliwa zarówno poprzez zastosowanie kombinacji 2-DG lub WP1122 z NaBt lub NaVPA, jak również w obecności dwufunkcyjnej pochodnej WP1234. Biorąc także pod uwagę zdolność przenikania bariery krew-mózg dla badanych w niniejszej pracy doktorskiej związków, przy ograniczonej obecnie dostępności terapii GBM, opisana koncepcja, powinna być rozwijana w dalszych etapach przedklinicznych i klinicznych, jako potencjalna terapia glejaka wielopostaciowego.

Summary

Assessment of the mechanisms of cytotoxic interaction of glycolysis inhibitors and histone deacetylase inhibitors (HDACi) in an in vitro model of glioblastoma

Tumor cells preferentially use the glycolysis process as the main pathway for glucose utilization and source of ATP regardless of the availability of oxygen (Warburg effect). GBM cells are mainly dependent on this process. An anti-cancer strategy is the inhibition of glucose metabolism by glycolysis inhibitors, e.g., 2-deoxy-D-glucose (2-DG). Unfortunately, therapeutic use of 2-DG is limited due to insufficient pharmacokinetic parameters of the compound. However, the acetylated derivative of 2-DG - WP1122 shows significantly better pharmacokinetic parameters.

Moreover, regulation of gene expression also plays an important role in tumor development - acetylation/deacetylation of histones, catalyzed by acetyltransferases (HAT) and histone deacetylases (HDAC). Overexpression of HDAC causes a decrease in histone acetylation and an abnormal silencing of the transcription of many genes. Therefore, HDAC inhibitors are considered potential anti-cancer drugs. The most frequently studied HDACis are sodium butyrate (NaBt) and sodium valproate (NaVPA).

This study aimed to analyze the effects and molecular mechanism of cooperation of glycolysis inhibitors (2-DG, WP1122) with histone deacetylases inhibitors (NaBt, NaVPA) in an in vitro glioblastoma model. The cytotoxic effect of the mentioned compounds was assessed based on the parameters of changes in viability (MTS test, IC₅₀ determination), proliferation (BrdU test), and the intensity of protein biosynthesis (SRB test) of GBM cells (U-87 and U-251 cell lines). Obtained results showed that all tested compounds, depending on the dose and time, statistically significantly reduced the viability of both cell lines. In addition, combined treatment of GBM cells with compounds with distinct mechanisms of action enhances the cytotoxic effect. The sensitivity of cells to the cytotoxic effect of the tested compounds was not significantly different under normoxia and hypoxia-like conditions, which proves the strongly glycolytic metabolism of GBM cells.

The molecular mechanism of glycolysis inhibitors' action has been confirmed by evaluating lactate and ATP synthesis, which was significantly downregulated in response to 2-DG and WP1122 treatment compared to untreated cells. On the other hand, the specificity of HDACi confirmed the analysis of HDAC activity in GBM cells. Further investigation showed that cytotoxic action of analyzed compounds was mediated by apoptosis, but not autophagy process, activation.

The combined treatment of GBM cells with glycolysis and histone deacetylases inhibitors synergistically potentiated their cytotoxic effects. On the other hand, the WP1234 derivative containing ethyl-butyrate substituent revealed its dual mechanism of cell death induction via glycolysis inhibition and concomitant modulation of histone acetylation and pro-/antiapoptotic proteins expression.

Summarizing the obtained results, it is evident that verified in the Ph.D. thesis strategy of simultaneous inhibition of glycolysis process and histone deacetylases activity appeared as an effective method of cancer cells elimination via physiological apoptosis process induction. Furthermore, GBM cells elimination was induced by combining 2-DG or WP1122 with NaBt or NaVPA, as well as, by bifunctional WP1234 derivative. Bearing in mind the ability of tested compounds to cross the blood-brain barrier and the limitations of currently available GBM therapies, the above-described therapeutic strategy should be further developed in preclinical and clinical studies as a potential therapy for GBM patients.

Spis treści

Wykaz skrótów	12
1. Wstęp	17
1.1. Glejaki - klasyfikacja	17
1.2. Etiologia GBM.....	18
1.3. Cechy morfologiczne GBM.....	19
1.4. Obraz kliniczny GBM.....	19
1.5. Diagnostyka GBM	20
1.6. Terapia GBM	20
1.7. Metabolizm glukozy w komórkach nowotworowych – efekt Warburga.....	21
1.8. 2-DG jako inhibitor glikolizy.....	24
1.8.1. Wewnątrzkomórkowy metabolizm 2-DG	25
1.8.2. 2-DG jako czynnik zaburzający proces N – glikozylacji białek	26
1.8.3. Aktywacja AMPK przez 2-DG – indukcja procesu autofagii.....	27
1.8.4. Wpływ 2-DG na indukcję procesu apoptozy	29
1.9. 2-DG jako kandydat na lek w terapii przeciwnowotworowej: badania przedkliniczne i kliniczne.....	32
1.10. Nowe pochodne 2-DG	35
1.11. Modyfikacje epigenetyczne	37
1.12. Inhibitory deacetylaz histonów	39
1.13. Terapia kombinowana w onkologii	42
1.14. WP1234 – pochodna 2-DG o dwutorowym oddziaływaniu.....	42
2. Cel pracy.....	43
3. Materiały i metody.....	44
3.1. Linie komórkowe	44
3.2. Hodowla komórek.....	44
3.3. Zakładanie hodowli.....	45
3.4. Prowadzenie hodowli ciągłej	45
3.5. Przygotowanie komórek do doświadczeń – odzyskiwanie i zamrażanie komórek	46
3.6. Czynniki doświadczalne	47
3.6.1. Schemat doświadczalny	48
3.7. Analiza aktywności cytotoksycznej związków chemicznych.....	49
3.7.1. Ocena żywotności komórek testem MTS.....	49
3.7.2. Pomiar natężenia biosyntezy białka z SRB.....	50

3.7.3. Pomiar proliferacji komórek testem z BrdU	51
3.7.4. Analiza poziomu śmierci komórkowej przy użyciu Aneksyny V i 7-AAD	52
3.8. Przygotowanie lizatów całokomórkowych przy użyciu buforu RIPA.....	53
3.9. Przygotowanie lizatów cytoplazmatycznych i jądrowych.....	54
3.10. Pomiar stężenia białka metodą Bradford'a w lizatach komórkowych	55
3.11. Analiza aktywności deacetylaz histonów	55
3.12. Analiza natężenia procesu glikolizy na podstawie pomiaru ilości wytworzonego mleczanu	56
3.13. Ocena syntezy ATP.....	57
3.14. Analiza względnego poziomu białek metodą Western-blot	57
3.14.1. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym	57
3.14.2. Detekcja białek.....	58
3.15. Przygotowanie próbek do analizy ultrastruktury komórek za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM).....	59
3.16. Analiza interakcji pomiędzy inhibitorami glikolizy a inhibitorami deacetylaz histonów	60
3.17. Analiza statystyczna.....	61
4. Wyniki	62
4.1. Inhibitory glikolizy wywierają cytotoksyczny wpływ na komórki GBM linii U-87 oraz U-251	62
4.2. Znaczenie hipoksji dla cytotoksycznego oddziaływania inhibitorów glikolizy (2-DG, WP1122) w modelu GBM linii U-87 i U-251	65
4.3. Inhibitory glikolizy: 2-DG i WP1122 hamują wytwarzanie kwasu mlekowego	68
4.4. 2-DG oraz WP1122 zmniejszają syntezę ATP	69
4.5. 2-DG i WP1122 indukują apoptozę komórek GBM linii U-87 i U-251.....	70
4.6. Inhibitory deacetylaz histonów wywierają cytotoksyczny wpływ na komórki GBM linii U-87 i U-251	71
4.7. Znaczenie hipoksji dla cytotoksycznego oddziaływania inhibitorów deacetylaz histonów (NaBt, NaVPA) w modelu GBM linii U-87 i U-251	74
4.8. NaBt i NaVPA indukują apoptozę komórek GBM linii U-87 i U-251.....	75
4.9. Ocena aktywności deacetylaz histonów w komórkach GBM linii U-87 i U-251 poddanych działaniu inhibitorów HDAC	76
4.10. Znaczenie procesu autofagii w cytotoksycznym oddziaływaniu inhibitorów glikolizy i deacetylaz histonów w komórkach GBM linii U-87 i U-251	77
4.11. Ocena ultrastruktury komórek GBM linii U-87 i U-251 poddanych działaniu inhibitorów glikolizy i deacetylaz histonów	79

4.12. Efekty cytotoksyczne współdziałania inhibitorów glikolizy i HDAC wobec komórek GBM linii U-87 i U-251	82
4.13. Identyfikacja mechanizmów współdziałania inhibitorów glikolizy i HDAC wobec komórek GBM linii U-87 i U-251	87
4.14. WP1234 wywierają cytotoksyczny wpływ na komórki GBM linii U-87 oraz U-251.	90
4.15. Dwutorowe oddziaływanie WP1234 na komórki GBM - WP1234 łączy właściwości inhibitorów glikolizy z inhibitorami deacetylaz histonów.....	94
4.16. Znaczenie procesu autofagii w cytotoksycznym oddziaływaniu WP1234 w komórkach GBM linii U-87 i U-251	96
4.17. Ocena ultrastruktury komórek GBM linii U-87 i U-251 poddanych działaniu WP1234	97
4.18. Podsumowanie wyników	98
5. Dyskusja	100
5.1. Metabolizm komórek nowotworowych	100
5.2. Inhibitory glikolizy jako kandydaci na leki przeciwnowotworowe.....	100
5.3. Przeciwnowotworowe oddziaływanie 2-DG	101
5.4. Acetylowana pochodna 2-DG i jej oddziaływanie	103
5.5. Znaczenie autofagii w cytotoksycznym oddziaływaniu inhibitorów glikolizy	105
5.6. Zmiany ultrastruktury mitochondriów pod wpływem działania inhibitorów glikolizy	107
5.7. Inhibitory deacetylaz histonów w terapii przeciwnowotworowej GBM	107
5.8. Leczenie skojarzone w terapii przeciwnowotworowej	111
5.9. Potencjał przeciwnowotworowy nowej pochodnej 2-DG – WP1234	112
5.10. Podsumowanie	113
6. Wnioski.....	115
7. Piśmiennictwo	116
Wykaz Rycin	146
Wykaz Tabel.....	150

Wykaz skrótów

2-BG	ang. <i>2-deoxy-2-bromo-D-glucose</i> , 2-deoxy-2-bromo-D-glukoza
2-CG	ang. <i>2-deoxy-2-chloro-D-glucose</i> , 2-deoxy-2-chloro-D-glukoza
2- ¹⁸ FG	ang. <i>¹⁸F-fluoro-2-deoxy-D-glucose</i> , 2-deoxy-2- ¹⁸ fluoro-D-glukoza
2-FG	ang. <i>2-deoxy-2-fluoro-D-glucose</i> , 2-deoxy-2-fluoro-D-glukoza
2-DG	ang. <i>2-deoxy-D-glucose</i> , 2-deoksy-D-glukoza
2-DG-6-P	ang. <i>2-deoxy-D-glucose-6-phosphate</i> , 2-deoksyglukozo-6-fosforan
2-DG-GDP	ang. <i>2-deoxy-D-glucose-guanosine 5'-diphosphate</i> , 2-deoksy-D-glukozo-guanozyno-5'-difosforan
2-DM	ang. <i>2-deoxy-D-mannose</i> , 2-deoksy-D-mannoza
2-IM	ang. <i>2-deoxy-2-iodo-D-glucose</i> , 2-deoxy-2-jodo-D-glukoza
4-PB	ang. <i>4-phenylbutyrate</i> , fenylomaślan sodu
5'AMP	ang. <i>adenosine 5'-monophosphate</i> , adenozy-no-5'-monofosforan
acetylo-CoA	ang. <i>acetyl coenzyme A</i> , acetylo koenzym A
AEO	ang. <i>anhydrous enol-oxaloacetate</i> , bezwodny enolo-szczawiooctan
AIF	ang. <i>apoptosis inducing factor</i> , czynnik indukujący apoptozę
AMPK	ang. <i>AMP-activated protein kinase</i> , kinaza białkowa aktywowana przez AMP
AN9	ang. <i>pivaloyloxymethyl butyrate</i> , maślan piwaloiloksymetylu
ANT	ang. <i>adenine nucleotide translocator</i> , translokaza nukleotydów adeninowych
APAF1	ang. <i>apoptotic protease activating factor 1</i> , apoptotyczny czynnik aktywujący
ATG	ang. <i>autophagy-related protein</i> , białko związane z autofagią
ATP	ang. <i>adenosine-5'-triphosphate</i> , adenozy-no-5'-trifosforan
BBB	ang. <i>blood-brain barrier</i> , bariera krew-mózg
Bcl-xl	ang. <i>B-cell lymphoma-extra-large</i> , białko anty-apoptotyczne
Bim	ang. <i>Bcl-2-like protein 11</i> , białko 11 podobne do Bcl-2
BNIP3	ang. <i>BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein</i> , BCL2/adenowirus E1B 19 kDa białko oddziałujące z białkiem 3
CAD	ang. <i>caspase-activated DNA-se</i> , aktywowana kaspazą DNAza
CCM	ang. <i>curcuminoids</i> , kurkuminoidy
CHOP	ang. <i>C/EBP homologous protein</i> , białko homologiczne C/EBP
CT, TK	ang. <i>computed tomography</i> , tomografia komputerowa
CTCL	ang. <i>cutaneous T-cell lymphoma</i> , chłoniak skórny T-komórkowy
DCA	ang. <i>dichloroacetate</i> , kwas dichlorooctowy
DHAP	ang. <i>dihydroxyacetone phosphate</i> , fosfodihydroksyaceton

DISC	ang. <i>death-inducing signal complex</i> , kompleks sygnałowy wywołujący śmierć
DMSO	ang. <i>dimethylsulfoxide</i> , dimetylosulfotlenek
Dol-P	ang. <i>dolichol phosphate</i> , fosforan dolicholu
Dol-P-Glc	ang. <i>dolichyl phosphate glucose</i> , fosfodolichylo-glukoza
Dol-P-Man	ang. <i>dolichyl phosphate mannose</i> , fosfodolichylo-mannoza
EGFR	ang. <i>epidermal growth factor receptor</i> , receptor naskórkowego czynnika wzrostu
EKLF	ang. <i>erythroid Krueppel-like transcription factor</i> , erytroidalny czynnik transkrypcyjny podobny do Krueppela
ER	ang. <i>endoplasmic reticulum</i> , retikulum endoplazmatyczne
ERK	ang. <i>extracellular signal-regulated kinases</i> , kinazy regulowane sygnałem zewnątrzkomórkowym
F-1,6-biP	ang. <i>fructose 1,6-bisphosphate</i> , fruktozo-1,6-bisfosforan
F-6-P	ang. <i>fructose-6-phosphate</i> , fruktozo-6-fosforan
FADD	ang. <i>Fas-associated death domain protein</i> , białko domeny śmierci związane z Fas
Fas-L	ang. <i>Fas ligand</i> , ligand Fas, białko transbłonowe należące do cytokin z rodziny TNF
FBS	ang. <i>fetal bovine serum</i> , płodowa surowica bydlęca
FDA	ang. <i>Food and Drug Administration</i> , Amerykańska Agencja Żywności i Leków
Foxp3	ang. <i>forkhead box P3</i> , skurfina (czynnik transkrypcyjny)
G-6-P	ang. <i>glucose-6-phosphate</i> , glukoza-6-fosforan
G-6-PD	ang. <i>glucose-6-phosphate dehydrogenase</i> , dehydrogenaza glukoza-6-fosforanowa
GAP, PGAL	ang. <i>glyceraldehyde 3-phosphate</i> , aldehyd 3-fosfoglicerynowy
GBM	ang. <i>glioblastoma multiforme</i> , glejak wielopostaciowy
GLUT	ang. <i>glucose transporter</i> , transporter glukozy
GSK-3 β	ang. <i>glycogen synthase kinase-3 beta</i> , kinaza syntazy glikogenu-3 beta
HATs	ang. <i>histone acetyltransferases</i> , acetylotransferazy histonowe
HCMV	ang. <i>human cytomegalovirus</i> , ludzki cytomegalowirus
HDACs	ang. <i>histone deacetylases</i> , deacetylazy histonów
HIF-1 α	ang. <i>hypoxia-inducible factor 1α</i> , czynnik transkrypcyjny indukowany hipoksją
HK	ang. <i>hexokinase</i> , heksokinaza
IDH	ang. <i>isocitrate dehydrogenase</i> , dehydrogenaza izocytrynianowa

IR	ang. <i>infrared radiation</i> , promieniowanie podczerwone
JNK	ang. <i>c-Jun N-terminal kinase</i> , kinaza białka c-Jun
KRN	Krajowy Rejestr Nowotworów
LDHA	ang. <i>lactate dehydrogenase</i> , dehydrogenaza mleczanowa
LLO	ang. <i>lipid linked oligosaccharide</i> , pierwotny oligosacharyd
MAP1-LC3	ang. <i>microtubule-associated protein 1 light chain 3</i> , łańcuch lekki 3 białka związanego z mikrotubulami
Mcl-1	ang. <i>myeloid cell 91 leukaemia-1</i> , białko anty-apoptotyczne
MCT	ang. <i>monocarboxylate transporters</i> , transportery monokarboksylanów
MGMT	ang. <i>O6-methylguanine-DNA methyltransferase</i> , metylotransferaza O-6-metyloguaniny
MPTP	ang. <i>mitochondrial permeability transition pore</i> , por przejściowy przepuszczalności mitochondrialnej
MRA	ang. <i>magnetic resonance angiography</i> , angiografia metodą rezonansu magnetycznego
MRI, RM	ang. <i>magnetic resonance imaging</i> , rezonans magnetyczny
MTIC	ang. <i>5-(3-Methyl-1-triazeno)-imidazole-4-carboxamide</i> , metylo-triazen-1-imidazolo-4-karboksyamid
mTORC1	ang. <i>mammalian target of rapamycin complex 1</i> , kompleks 1 kinazy mTOR
MyoD	ang. <i>myoblast determination protein 1</i> , białko 1 określające mioblasty
NaBt	ang. <i>sodium butyrate</i> , maślan sodu
NAD ⁺	ang. <i>oxidized form of nicotinamide adenine dinucleotide</i> , forma utleniona dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
NADH	ang. <i>reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide</i> , forma zredukowana dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
NaVPA	ang. <i>sodium valproate</i> , walproinian sodu
NF-1	ang. <i>neurofibromatosis-1</i> , neurofibromatoza typu 1
NF-κB	ang. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> , jądrowy czynnik transkrypcyjny
NOS	ang. <i>not otherwise specified</i> , status <i>IDH</i> nie został określony
OAA	ang. <i>oxaloacetic acid</i> , kwas szczawiooctowy
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
PBS	ang. <i>Phosphate buffered saline</i> , sól fizjologiczna buforowana fosforanem

PDK1	ang. <i>pyruvate dehydrogenase kinase 1</i> , kinaza 1 zależna od fosfatydyloinozytolu
PEP	ang. <i>phosphoenolpyruvate</i> , fosfoenolpirogronian
PET	ang. <i>positron emission tomography</i> , pozytonowa tomografia emisyjna
PFK-1	ang. <i>phosphofructokinase-1</i> , fosfofruktokinaza-1
PGI	ang. <i>glucose-6-phosphate isomerase</i> , izomeraza glukozy-6-fosforanowa
PI3K-III	ang. <i>class III phosphatidylinositol 3-kinase</i> , 3-kinaza fosfatydyloinozytolu klasy III
PKM	ang. <i>pyruvate kinase</i> , kinaza pirogronianowa
PON2	ang. <i>paraoxonase 2</i> , paraoksanaza 2
PPP	ang. <i>pentose phosphate pathway</i> , szlak pentozofosforanowy proteazę 1
PTCL	ang. <i>peripheral T-cell lymphoma</i> , chłoniak z obwodowych komórek T
PTEN	ang. <i>phosphatase and tensin homolog</i> , gen dla homologu fosfatazy i tensyny
QCT	ang. <i>quercetin</i> , kwercetyna
RB1	ang. <i>retinoblastoma-1</i> , retinoblastoma
ROS	ang. <i>reactive oxygen species</i> , reaktywne formy tlenu
RUNX3	ang. <i>runt-related transcription factor 3</i> , czynnik transkrypcyjny 3 związany z runt
SDS	ang. <i>dodecyl sodium sulfate</i> , siarczan dodecyłu, sól sodowa
SGLT	ang. <i>sodium-glucose linked transporter</i> , kotransporter glukozowo – sodowy
Smac/DIABLO	ang. <i>second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI</i> , mitochondrialny czynnik 2 aktywujący kaspazy, wiążący inhibitory kaspaz (IAPs)
SPECT	ang. <i>single-photon emission computed tomography</i> , emisyjna tomografia pojedynczego fotonu
STAT3	ang. <i>signal transducer and activator of transcription 3</i> , przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji 3
TEMED	ang. <i>tetramethylethylenediamine</i> , tetrametyloetylenodiamina
TERT	ang. <i>telomerase reverse transcriptase</i> , odwrotna transkryptaza telomerazy
TMZ	ang. <i>Temozolomide</i> , Temozolomid
TNF	ang. <i>tumor necrosis factor</i> , czynnik martwicy nowotworów
TRADD	ang. <i>TNFR1-associated death domain protein</i> , białko domeny śmierci związane z TNFR1

TRAIL	ang. <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i> , ligand indukujący apoptozę związany z TNF
ULK	ang. <i>unc-51-like kinase</i> , kinazy aktywująca autofagię unc-51
UPR	ang. <i>unfolded protein response</i> , odpowiedź na niesfaldowane białka
VEGF	ang. <i>vascular endothelial growth factor</i> , receptor czynnika wzrostu śródbłónka naczyń
WHO	ang. <i>World Health Organization</i> , Światowa Organizacja Zdrowia
WP1122	ang. <i>3,6-di-O-acetyl-2-deoxy-D-glucose</i> , 2-deoksy-3,6-di-O-acetylo-D-glukoza
WP1234	ang. <i>3,6-di-O(2-ethyl)butyryl-2-deoxy-D-glucose</i> 3,6-di-O-(2-Ethyl)butyryl-D- glukoza

1. Wstęp

1.1. Glejaki - klasyfikacja

Glejaki to ogólny termin używany do opisanego pierwotnych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Klasyfikacji glejaków możemy dokonać zgodnie z pochodzeniem komórek glejowych. Wyróżniamy nowotwory gleju gwiaździstego (astrocytoma), gleju skąpowypustkowego (oligodendroglioma), gleju wyściółkowego (ependymoma) jak również tzw. glejaki mieszane [1]. Nowotwory gleju gwiaździstego stanowią prawie 80% wszystkich glejaków. Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO) klasyfikuje glejaki w zależności od stopnia złośliwości określanego przez kryteria histopatologiczne wykorzystujące cechy morfologiczne guza, od łagodnych (I°) do najbardziej złośliwych (IV°) [2] (Tabela I). Ponadto w 2016 r. WHO opublikowała zmienioną klasyfikację guzów OUN uwzględniającą charakterystykę molekularną nowotworów mózgu. Zmiana ta dotyczy opisanego mutacji dehydrogenazy izocytrynianowej (ang. *isocitrate dehydrogenase*, *IDH*) i jej znaczenia w patogenezie GBM [3].

Tabela I. Klasyfikacja nowotworów gleju gwiaździstego według WHO, 2016.

Typy nowotworów gleju gwiaździstego	Stopień złośliwości
Gwiaździak rozlany (ang. <i>diffuse astrocytoma</i>) – <i>IDH</i> mutant Gwiaździak gemistocytarny (ang. <i>gemistocytic astrocytoma</i>) – <i>IDH</i> mutant Gwiaździak rozlany (ang. <i>diffuse astrocytoma</i>) – <i>IDH</i> typ dziki (ang. <i>wild-type</i>) Gwiaździak rozlany – (ang. <i>diffuse astrocytoma</i>) – NOS* Gwiaździak włóknkowy (ang. <i>fibrillar astrocytoma</i>) Gwiaździak protoplazmatyczny (ang. <i>protoplasmic astrocytoma</i>)	II°
Gwiaździak anaplastyczny (ang. <i>anaplastic astrocytoma</i>) – <i>IDH</i> mutant Gwiaździak anaplastyczny (ang. <i>anaplastic astrocytoma</i>) – <i>IDH</i> typ dziki Gwiaździak anaplastyczny – NOS*	III°
Glejak złośliwy (ang. <i>glioblastoma</i> , GBM) – <i>IDH</i> typ dziki Glejak wielokomórkowy (ang. <i>giant cell glioblastoma</i>) Glejakomięsak (ang. <i>gliosarcoma</i>) Glejak nabłonkowy (ang. <i>epithelioid glioblastoma</i>) Glejak złośliwy (ang. <i>glioblastoma</i>) – <i>IDH</i> mutant Glejak złośliwy (ang. <i>glioblastoma</i>) – NOS* Rozlany glejak linii środkowej (ang. <i>diffuse midline glioma</i>) <i>H3K27</i> mutant	IV°

*NOS – status *IDH* nie został określony

Glejak wielopostaciowy (ang. *glioblastoma multiforme*, GBM) *IDH* - typ dziki, to najbardziej inwazyjny pierwotny nowotwór pochodzenia glejowego. Pacjenci z GBM mają złe rokowanie i jedynie 3–5% pacjentów przeżywa dłużej niż trzy lata od diagnozy [4]. 90% przypadków GBM stanowią guzy rozwijające się „*de novo*”. Pozostałe 10% glejaków to nowotwory wtórne (z mutacją genu *IDH*), które rozwijają się poprzez transformację nowotworów o niskiej złośliwości – gwiaździak rozlany lub anaplastyczny [3]. Mutacje genu *IDH* wykazuje jedynie 2% pierwotnych, a aż 80% wtórnych GBM [5]. Glejaki pierwotne i wtórne stanowią dwie odrębne jednostki chorobowe różniące się pod względem zarówno molekularnym jak i genetycznym, jednak nie wykazują różnic morfologicznych. GBM rozwijający się „*de novo*” rośnie w okresie około trzech miesięcy i częściej występuje u osób starszych, powyżej 55 roku życia. Glejaki wtórne rozwijają się wolniej, mają lepsze rokowania i zazwyczaj występują u osób młodszych (średni wiek zachorowania to 44 lata) [6]. Badania wskazują, że globalna zapadalność na GBM waha się od 0,6-5/100 tys. osób rocznie [7]. W krajach europejskich i Ameryce Północnej zapadalność na GBM wynosi 2/3 nowe przypadki na 100 tys. osób rocznie [8]. W Polsce guzy mózgu obejmują 3,10% i 1,62% wśród zachorowań na nowotwory złośliwe odpowiednio dla kobiet i mężczyzn a częstość zachorowania stale rośnie [9]. Od 1980 roku do teraz zauważono około dwukrotny wzrost liczby nowych przypadków nowotworów mózgu. GBM stanowi także poważny problem pediatryczny. U dzieci nowotwory OUN, zaraz po białaczkach, są najczęstszym typem nowotworu (ponad 15% zachorowań u pacjentów poniżej 19 roku życia) [10-12].

Glejaki wielopostaciowe są wysoce inwazyjnymi guzami. Obecnie terapia GBM oparta jest o resekcję chirurgiczną guza (95% przypadków) i późniejszą chemio- lub/i radio-terapię. U większości pacjentów dochodzi jednak do nawrotu choroby.

Pomimo postępu w terapii wielu typów nowotworów od ponad trzech dekad mediana przeżycia pacjentów z GBM nie zwiększyła się znacząco i wynosi około 14 - 15 miesięcy od momentu diagnozy [13-15]. Według danych z Krajowego Rejestru Nowotworów (KRN) u pacjentów ze zdiagnozowanymi nowotworami mózgu jednoroczne wskaźniki przeżycia wynosiły mniej niż 50% zarówno w przypadku kobiet jak i mężczyzn. Nowotwory mózgu stanowią 3% zgonów powodowanych chorobą nowotworową u kobiet i mężczyzn oraz 30% zgonów powodowanych chorobą nowotworową dzieci (0 – 19 lat) [16].

1.2. Etiologia GBM

Przyczyny GBM są nadal nieznane. Postuluje się udział różnych czynników środowiskowych, ale jedynym potwierdzonym czynnikiem ryzyka jest ekspozycja na wysokie

dawki promieniowania jonizującego [17]. Generalnie uważa się, że GBM to nowotwór pojawiający się w sposób samoistny. Predyspozycje genetyczne obserwowano tylko w 5 – 10% przypadków [2]. GBM może również występować w przebiegu chorób genetycznych tj.: choroba von Recklinghausena (neurofibromatoza typu 1 (NF-1)), zespół Turcota, zespół Li-Fraumeni, stwardnienie guzowate [18-23]. Uważa się, również, że cytomegalowirus (ang. *human cytomegalovirus*, HCMV), który powoduje wrodzone zapalenie mózgu czy zmiany wielonarządowe u dorosłych jest jednym z czynników etiologicznych rozwoju GBM [24]. Ponadto, postuluje się udział estrogenów w patogenezie GBM, gdyż GBM jest nowotworem częściej diagnozowanym u kobiet w wieku post-menopauzalnym [25]. Zauważono także, iż infekcje oraz choroby alergiczne mają ochronny wpływ na rozwój GBM. U alergików prawdopodobieństwo wystąpienia GBM jest niższe nawet o 40% [26].

1.3. Cechy morfologiczne GBM

GBM składa się z polimorficznych, wrzecionowatych komórek, które charakteryzuje przewaga proliferacji nad zróżnicowaniem i dojrzewaniem komórek (anaplazja), atypia jąder, aktywność mitotyczna, kwasochłonna cytoplazma oraz niewyraźne granice międzykomórkowe [27]. Jądra komórek glejaka są owalne lub wydłużone, hiperchromatyczne z gruboziarnistą, zbitą chromatyną i zawierają wiele ułożonych centralnie lub obwodowo jąder. Komórki GBM mają zwiększony stosunek jądrowy do cytoplazmatycznego, niektóre zawierają wtrącenia wewnątrzjądrowe. Ponadto mogą także występować dwa lub więcej jąder komórkowych jak również makrofagi, neutrofile, limfocyty czy komórki nekrotyczne [28]. Ze względu na zawartość dużych wakuoli tłuszczowych, niekiedy komórki GBM są podobne w morfologii do adipocytów [29, 30]. Glejak charakteryzuje się dużym unaczynieniem oraz występowaniem obszarów martwicy wywołanej niedotlenieniem, które są otaczane przez strefy tzw. pseudopalisad, zawierających komórki apoptotyczne [31, 32].

1.4. Obraz kliniczny GBM

Obraz kliniczny pacjentów z glejakiem wielopostaciowym zależy przede wszystkim od umiejscowienia guza jak również wzrastającego wraz z postępem choroby ciśnienia wewnątrzczaszkowego. Najczęściej występującymi objawami GBM są: bóle głowy, senność, zaburzenia widzenia, równowagi i osobowości, napady padaczkowe, częste omdlenia a także ból pleców, czy rwa kulszowa. Objawy są początkowo niespecyficzne, przez co diagnostyka GBM bywa utrudniona [33, 34].

1.5. Diagnostyka GBM

Diagnostyka glejaka wielopostaciowego obejmuje badania obrazowe jak również laboratoryjne. Do obrazowych metod zalicza się: tomografię komputerową (TK, ang. *computed tomography*, CT), emisyjną tomografię pojedynczego fotonu (ang. *single-photon emission computed tomography*, SPECT), rezonans magnetyczny (RM, ang. *magnetic resonance imaging*, MRI), angiografię metodą rezonansu magnetycznego (ang. *magnetic resonance angiography*, MRA) jak również pozytonową tomografię emisyjną (ang. *positron emission tomography*, PET) [35-37]. Pomimo dobrej rozdzielczości oraz możliwości oceny charakteru, unaczynienia czy metabolizmu tkanek, metody obrazowe nie w każdym przypadku pozwalają trafnie i jednoznacznie zdiagnozować rodzaj guza. Co więcej, identyczne pod względem morfologii guzy zazwyczaj różnią się od siebie pod względem molekularnym [38]. Niedawne postępy w technice sekwencjonowania nowej generacji zapoczątkowały identyfikację charakterystycznych, molekularnych cech GBM, dzięki czemu możliwe jest dokładniejsze poznanie podłoża molekularnego tej choroby. W rezultacie zaproponowano szereg biomarkerów prognostycznych i diagnostycznych. Biomarkerami, które są obecnie stosowane do stratyfikacji pacjentów GBM są: gen metylotransferazy O-6-metyloguaniny – *MGMT* (ang. *O6-methylguanine-DNA methyltransferase*) i delecja 1p/19q, *IDH1/2*, receptor naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor*, *EGFR*), receptor czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (ang., *vascular endothelial growth factor*, *VEGF*), gen białka *p53*, gen *p16INK4a*, gen dla homologu fosfatazy i tensyny – *PTEN* (ang. *phosphatase and tensin homolog*), gen odwrotnej transkryptazy telomerazy (ang. *telomerase reverse transcriptase*, *TERT*), gen *NF1* (ang. *neurofibromatosis-1*), gen *RBI* (ang. *retinoblastoma-1*), ocena poziomu trójmetylowanej lizyny 4 histonu H3 (H3K4me3), ocena metabolizmu fosfolipidów [38-43].

1.6. Terapia GBM

Pomimo znaczących postępów w diagnostyce, terapia GBM opiera się głównie na resekcji chirurgicznej guza, chemioterapii i/lub radioterapii. Obecny schemat terapeutyczny nie zapewnia jednak wyleczenia pacjenta a jedynie krótkotrwałe zahamowanie postępu choroby. Ze względu na naciekający charakter GBM, całkowite, chirurgiczne usunięcie guza prawie zawsze jest niemożliwe [44-46]. Z uwagi na ograniczoną przenikalność leków przez barierę krew-mózg (ang. *blood-brain barrier*, BBB) wybór możliwych do stosowania chemioterapeutyków jest ograniczony a jedynym dopuszczonym lekiem do stosowania w pierwszej linii chemioterapii jest temozolomid (TMZ). Mechanizm działania TMZ opiera się na hydrolizie leku wewnątrz komórki do metabolitu pośredniego – MTIC (metylo-triazenu-1-

imidazolo-4-karboksyamidu), który ma działanie alkilujące. Prowadzi to do uszkodzenia DNA, zaburzenia syntezy kwasów nukleinowych i białek a w konsekwencji do śmierci komórki [47]. Skuteczność TMZ jest jednak również bardzo ograniczona, gdyż u około 50% pacjentów z GBM występuje nadekspresja enzymu MGMT, która bierze udział w mechanizmach naprawy DNA, znosząc cytotoksyczne działanie TMZ [48]. Nieznacznie lepsze efekty terapeutyczne są osiągnięte w schemacie leczenia TMZ w połączeniu z radioterapią [49].

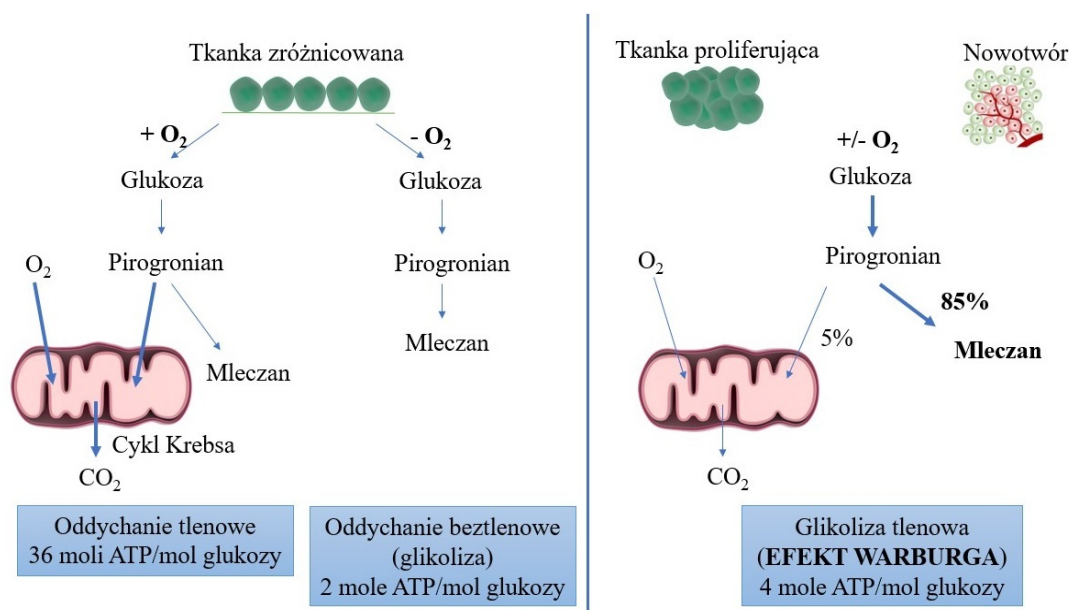
Wielopostaciowość komórek GBM oraz zróżnicowanie na poziomie molekularnym są głównymi problemami w opracowaniu skutecznej terapii GBM. Istnieje pilna potrzeba kliniczna opracowania nowych sposobów w leczeniu glejaka. Dużą nadzieję pokładano w rozwoju immunoterapii. Jedną z obiecujących strategii było zastosowanie inhibitorów angiogenezy, ale terapie antyangiogenne nie spełniły początkowych oczekiwań by w istotny sposób zmienić kliniczny przebieg choroby. Skuteczność w badaniach klinicznych dotyczących GBM wykazał jedynie Bevacizumab (przeciwciało monoklonalne wiążące VEGF), który został zaakceptowany jako lek w nawrotowym GBM [50, 51]. Bevacizumab nie wykazuje jednak istotnego wpływu na całkowitą długość życia pacjentów z GBM, lecz jedynie poprawia jakość życia pacjentów ze wznową [52].

Jednym z innowacyjnych i dotychczas niewykorzystanych terapeutycznie podejść jest celowanie w metabolizm guza mózgu. Guzy mózgu są silnie zależne od procesu glikolizy, co może skutkować ich wyjątkową wrażliwością na inhibicję tego procesu [53-55]. Zjawisko nasilonego metabolizmu komórek GBM jest powszechnie wykorzystywane w diagnostyce techniką PET. W metodzie PET jako znacznik wykorzystuje się ^{18}F -fluoro-2-deoxy-glukozę (^{18}F FDG), która jest pobierana przez szybko metabolizujące komórki nowotworowe. PET jest standardem w diagnostyce guzów mózgu, jednakże terapeutyczne wykorzystanie strategii hamowania metabolizmu komórek nowotworowych dotychczas nie zostało w pełni wykorzystane [56].

1.7. Metabolizm glukozy w komórkach nowotworowych – efekt Warburga

Glukoza jest najpowszechniejszym źródłem pozyskiwania energii komórkowej jak również substratem do szeregu procesów biochemicznych. W 1920 r. Otto Warburg zauważył, że komórki charakteryzujące się wysokim stopniem proliferacji (w tym nowotworowe), nawet w obecności tlenu preferują glikolizę tlenową jako głównie źródło utylizacji glukozy i pozyskiwania energii (tzw. efekt Warburga) [57]. W komórkach prawidłowych w obecności tlenu utylizacja glukozy odbywa się w procesie fosforylacji oksydacyjnej. W warunkach beztlenowych komórki prawidłowe przekształcają glukozę głównie w procesie glikolizy a

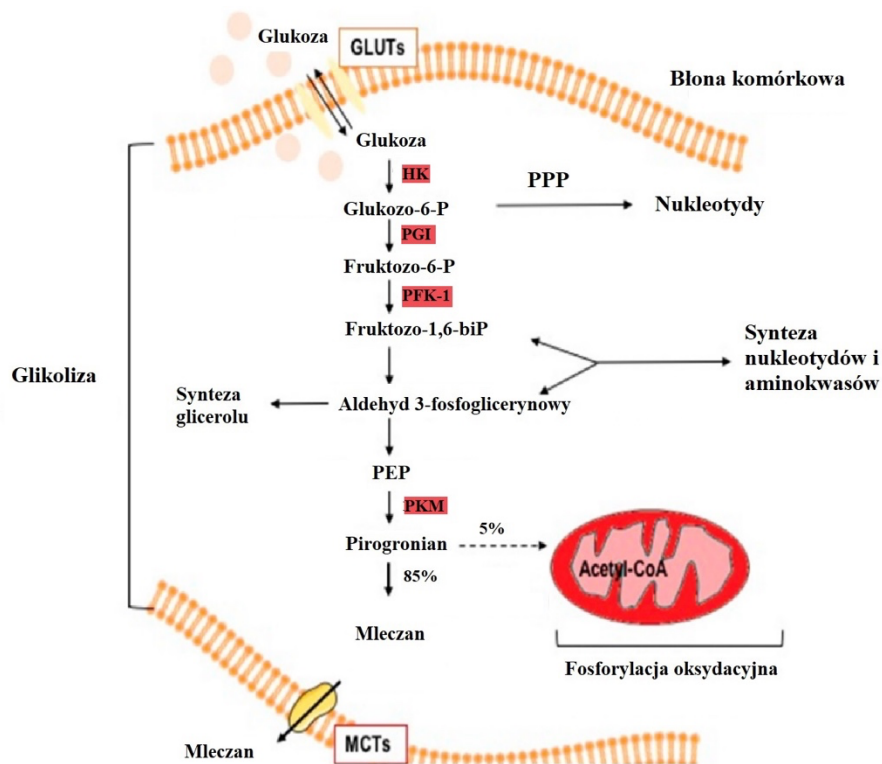
produktem utylizacji jest mleczan [58]. W przeciwieństwie do prawidłowych, komórki nowotworowe metabolizują glukozę do mleczanu nawet w warunkach dostępności tlenu [57, 59-63]. W wyniku procesu glikolizy z jednej cząsteczki glukozy zostają wytworzone dwie cząsteczki pirogronianu a w konsekwencji dwie cząsteczki ATP (ang. *adenosine-5'-triphosphate*) podczas gdy poprzez fosforylację oksydacyjną wytworzonych jest 36 cząsteczek ATP. W trakcie glikolizy tlenowej wytwarzane są 4 cząsteczki ATP [61, 64, 65]. Schematyczny przebieg metabolizmu glukozy w komórkach prawidłowych i nowotworowych został przedstawiony na Rysunku 1.



Rysunek 1. Porównanie metabolizmu glukozy w komórkach prawidłowych i nowotworowych (oddychanie tlenowe i beztlenowe vs glikoliza tlenowa).

Do wnętrza komórki glukoza jest transportowana przez transportery GLUT (ang. *glucose transporter*) a także SGLT (ang. *sodium-glucose linked transporter*) [66, 67]. Ze względu na wysokie zapotrzebowanie metaboliczne komórek nowotworowych, charakteryzuje je nadekspresja GLUT w porównaniu do komórek prawidłowych [68, 69]. We wnętrzu komórki glukoza ulega fosforylacji z udziałem enzymu heksokinazy (HK) do glukozy-6-fosforanu (ang. *glucose-6-phosphate*, G-6-P), który następnie jest metabolizowany przez dehydrogenazę glukozy-6-fosforanową (ang. *glucose-6-phosphate dehydrogenase*, G-6-PD) w szlaku pentozofosforanowym (z ang. *pentose phosphate pathway*, PPP) lub jest przekształcany do fruktozy-6-fosforanu (ang. *fructose-6-phosphate*, F-6-P) przez izomerazę glukozy-6-fosforanową (z ang. *phosphoglucose isomerase*, PGI). W kolejnym etapie F-6-P jest

przekształcany przez fosfofruktokinazę (ang. *phosphofructokinase-1*, PFK-1) do fruktozo-1,6-bisfosforanu (ang. *fructose 1,6-bisphosphate*, F-1,6-biP). F-1,6-diP jest kolejno przekształcany w aldehyd 3-fosfoglicerynowy (ang. *glyceraldehyde 3-phosphate*, GAP, PGAL) lub fosfodihydroksyaceton (ang. *dihydroxyacetone phosphate*, DHAP) wykorzystywany w syntezie trigliceroli i fosfolipidów. W następnych etapach fosfoenolpirogonian (ang. *phosphoenolpyruvate*, PEP) jest przekształcany do pirogonianu przez enzym – kinazę pirogonianową (z ang. *pyruvate kinase*, PKM). PKM jest dezaktywowana z powodu działania glukagonu podczas niedożywienia komórki przez co PEP nie może zostać dalej przekształcony w pirogonian. Dlatego też alternatywnie poprzez glukoneogenezę jest przekształcany w glukozę, która jest wydalana z wątroby i zaopatruje tkanki w stanie niedoborów. Ostatnią przemianą procesu glikolizy jest przekształcenie pirogonianu przez dehydrogenazę mleczanową, która utlenia NADH (ang. *reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide*) do NAD⁺ (ang. *oxidized form of nicotinamide adenine dinucleotide*) i wytworzenie mleczanu lub acetylo-CoA (ang. *acetyl coenzyme A*). W komórkach nowotworowych jedynie około 5% pirogonianu jest katalizowane do acetylo-CoA [70-74]. Schematyczne przedstawienie przekształceń glukozy w komórkach nowotworowych ilustruje Rysunek 2.



Rysunek 2. Schematyczne przedstawienie przebiegu procesu glikolizy w komórce nowotworowej. Najważniejsze enzymy kontrolujące poszczególne etapy glikolizy zaznaczono na czerwono [74].

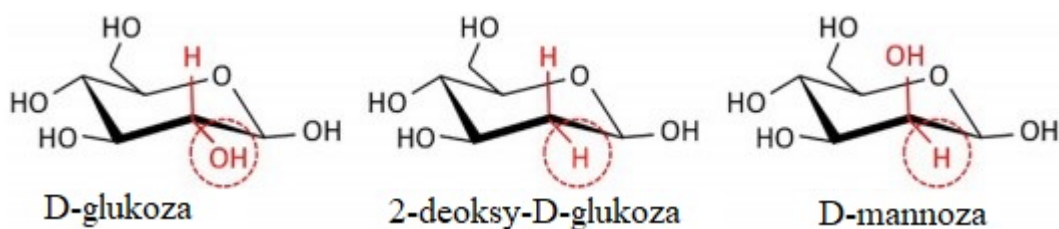
Istnieje kilka mechanizmów, które warunkują nasilenie glikolizy w warunkach tlenowych. W odpowiedzi na warunki niedotlenienia komórki nowotworowe przeprogramowują protoonkogeny, zmieniają szlaki sygnalizacyjne a także aktywują różne czynniki transkrypcyjne, z których kluczowe znaczenie ma HIF-1 α (ang. *hypoxia-inducible factor 1 α*). HIF-1 α aktywuje transkrypcję genów kodujących transportery glukozy (GLUT), transportery monokarboksylanów (ang. *monocarboxylate transporters*, MCT) oraz enzymy glikolityczne: heksokinazę I/II (HK I/II), kinazę pirogronianową (PKM), dehydrogenazę mleczanową (LDHA) [75-78]. Ponadto, aktywacja HIF1 α poprzez zwiększenie ekspresji PDK1 (ang. *pyruvate dehydrogenase kinase 1*) zmniejsza oddychanie mitochondrialne a także indukuje mitofagocytosę zależną od BNIP3 (ang. *BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein*). Co więcej, czynnik HIF-1 α umożliwia zachowanie homeostazy pomiędzy zużyciem tlenu, produkcją energii w postaci ATP a powstawaniem reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS) w odpowiedzi na hipoksję.

Komórki nowotworowe różnych typów nowotworów różnią się natężeniem procesu glikolizy w utylizacji glukozy [79]. Glejak wielopostaciowy i rak trzustki charakteryzuje natomiast metabolizm wybitnie glikolityczny [53, 80, 81]. Jedną z molekularnych przyczyn wysoce glikolitycznego charakteru komórek GBM jest mutacja genu *IDH1*. *IDH1* to enzym cyklu Krebsa, którego niska aktywność prowadzi do konstytutywnej aktywności czynnika HIF-1 α , i zależnych od niego enzymów szlaku glikolizy w komórce [82, 83].

Z uwagi na kluczowe znaczenie procesu glikolizy dla przeżycia komórek GBM, proces ten jest atrakcyjnym celem terapeutycznym. Jednym z najlepiej poznanych inhibitorów procesu glikolizy jest pochodna glukozy – 2-deoxy-D-glukoza (2-DG) [84-90].

1.8. 2-DG jako inhibitor glikolizy

2-DG jest syntetycznym analogiem glukozy, w którym grupę hydroksylową (-OH) przy drugim atomie węgla zastąpiono wodorem. Ze względu na podobieństwo strukturalne 2-DG i glukozy, 2-DG działa jako kompetycyjny inhibitor metabolizmu glukozy [90, 91]. Brak grupy hydroksylowej przy 2 atomie węgla w cząsteczce glukopiranozy sprawia, że 2-DG jest zarówno analogiem glukozy i mannozy, co ilustrują wzory strukturalne przedstawione na Rysunku 3.

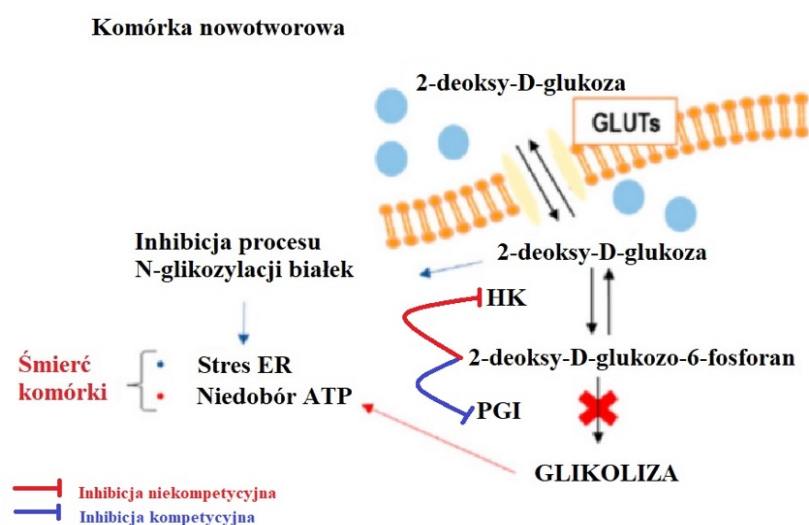


Rysunek 3. Budowa cząsteczki D-glukozy, 2-DG oraz D-mannozy [92].

Pierwsze doniesienia dotyczące efektów oddziaływania 2-DG pochodzą z 1952 r. gdzie opisano hamujący wpływ 2-DG na proliferację linii komórkowej mięsaka szczura [93]. Późniejsze badania fermentacji glukozy u drożdży wykazały, iż 2-DG konkuruje z glukozą [94]. Inne prace potwierdziły współzawodnictwo pomiędzy 2-DG oraz glukozą w komórkach prawidłowych oraz nowotworowych [95]. Istotnym faktem w kontekście terapii glejaków jest zdolność przenikania 2-DG przez BBB ze względu na swoje wysokie podobieństwo w strukturze do cząsteczki glukozy. Ponadto, 2-DG wykazuje niską toksyczność i może być podawany doustnie. Wspomniane właściwości 2-DG sprawiły, iż jest postrzegana jako kandydat na lek przeciwnowotworowy. Atrakcyjną koncepcją jest także zastosowanie 2-DG w terapiach kombinowanych z innymi związkami o działaniu cytotoksycznym [73, 93].

1.8.1. Wewnątrzkomórkowy metabolizm 2-DG

2-DG analogicznie jak glukoza jest transportowana do wnętrza komórki przez transportery GLUT jak również w wyniku transportu aktywnego przez transportery SGLT [96]. We wnętrzu komórki 2-DG ulega fosforylacji przez HK II do 2-deoksyglukozo-6-fosforanu (ang. *2-deoxy-D-glucose-6-phosphate*, 2-DG-6-P). 2-DG-6-P ze względu na brak grupy -OH, nie jest dobrym substratem dla kolejnych enzymów: izomerazy-glukozo-6-fosforanowej (PGI) i dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej (G-6-PD) i nie ulega dalszym przemianom w szlaku glikolizy. 2-DG-6-P hamuje w sposób kompetycyjny PGI podczas gdy niekompetycyjnie hamuje aktywność HK, co schematycznie przedstawia Rysunek 4 [97]. W konsekwencji dochodzi do wewnątrzkomórkowej akumulacji 2-DG-6-P, zmniejszenia transportu glukozy do komórki, niedoboru ATP, zatrzymania cyklu komórkowego oraz indukcji śmierci komórki [98, 99]. Postuluje się, iż hamowanie glikolizy przez 2-DG jest silniejsze w warunkach hipoksji, gdyż w warunkach normalnej dostępności tlenu komórki nowotworowe mogą wytwarzać ATP używając alternatywnych szlaków sygnałowych z kwasów tłuszczowych lub aminokwasów [100].



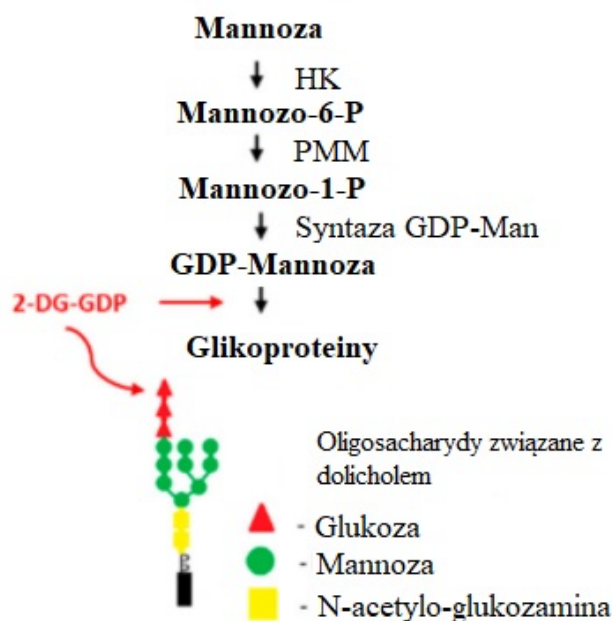
Rysunek 4. Schemat działania 2-DG na poziomie komórki [93].

1.8.2. 2-DG jako czynnik zaburzający proces N – glikozylacji białek

Mannoza jest epimerem glukozy, różni je jedynie położenie grupy -OH, która po jej usunięciu tworzy cząsteczkę 2-DG (Rysunek 3). Dlatego też 2-DG jest zarazem 2-deoksymannozą (ang. *2-deoxy-mannose*, 2-DM) i może wpływać na jej metabolizm. Najważniejszym procesem komórkowym, w którym uczestniczy mannoza jest N-glikozylacja białek [101, 102]. N-glikozylacja białek rozpoczyna się w retikulum endoplazmatycznym (ang. *endoplasmic reticulum*, ER) i jest kontynuowana wewnątrz aparatu Golgiego. Polega ona na przyłączeniu reszty cukrowej tj. mannozy, glukozy, N-acetyloglukozoaminy do nośnika lipidowego, którym jest fosforan dolicholu i utworzeniu wiązania glikozydowego w wyniku czego powstaje pierwotny sacharyd – LLO (ang. *lipid linked oligosaccharide*). Powstały glikan o strukturze Man5GlcNAc2 zostaje przeniesiony do wnętrza ER gdzie następuje wydłużanie oligosacharydu przez dołączanie aktywowanych przez Dol-P (ang. *dolichol phosphate*) czterech mannoz i trzech glukozy. Powstają odpowiednio Dol-P-Man (ang. *dolichyl phosphate mannose*) i Dol-P-Glc (ang. *dolichyl phosphate glucose*). Proces glikozylacji stabilizuje strukturę III-rzędową białek, chroni je przed proteolizą, kontroluje proces ich prawidłowego fałdowania a także odpowiada za przekazywanie sygnałów wewnątrzkomórkowych, właściwe interakcje wewnątrzkomórkowe i adhezję komórki [103-105].

Ze względu na swoje podobieństwo do mannozy, 2-DG nie tylko współzawodniczy z metabolizmem mannozy, ale także wbudowuje się (2-DG-GDP, ang. *2-deoxy-D-glucose-guanosine 5'-diphosphate*) w oligosacharydy połączone z Dol-P (Rysunek 5). Inhibicja GDP-mannozy przez 2-DG-GDP prowadzi do nieprawidłowego fałdowania białek, ich zatrzymania

w ER, co indukuje proces tzw. odpowiedzi na niesfałdowane białka – UPR (ang. *unfolded protein response*), zaburzenie autofagii, aktywację AMPK (ang. *AMP-activated protein kinase*), obniżenie aktywności ERK (ang. *extracellular signal-regulated kinases*) oraz kinazy białkowej B/AKT. Finalnie przyczynia się to do apoptotycznej śmierci komórki [93, 103, 104, 106-108]. Efekty działania 2-DG na proces glikozylacji mogą zostać odwrócone poprzez dodanie egzogennej mannozy, co zatrzymuje stres ER oraz aktywację autofagii, natomiast nie ma wpływu na ilość wytwarzanego ATP [109-112]. Ponadto prace Kurtoglu i wsp. [107] wykazały, iż działanie 2-DG jest zależne od dostępności tlenu – w warunkach hipoksji 2-DG preferencyjnie zaburza proces glikolizy natomiast w normoksji ma większy wpływ na zaburzenie glikozylacji białek [93, 107].



Rysunek 5. Schemat działania 2-DG na N-glikozylację białek [74].

1.8.3. Aktywacja AMPK przez 2-DG – indukcja procesu autofagii

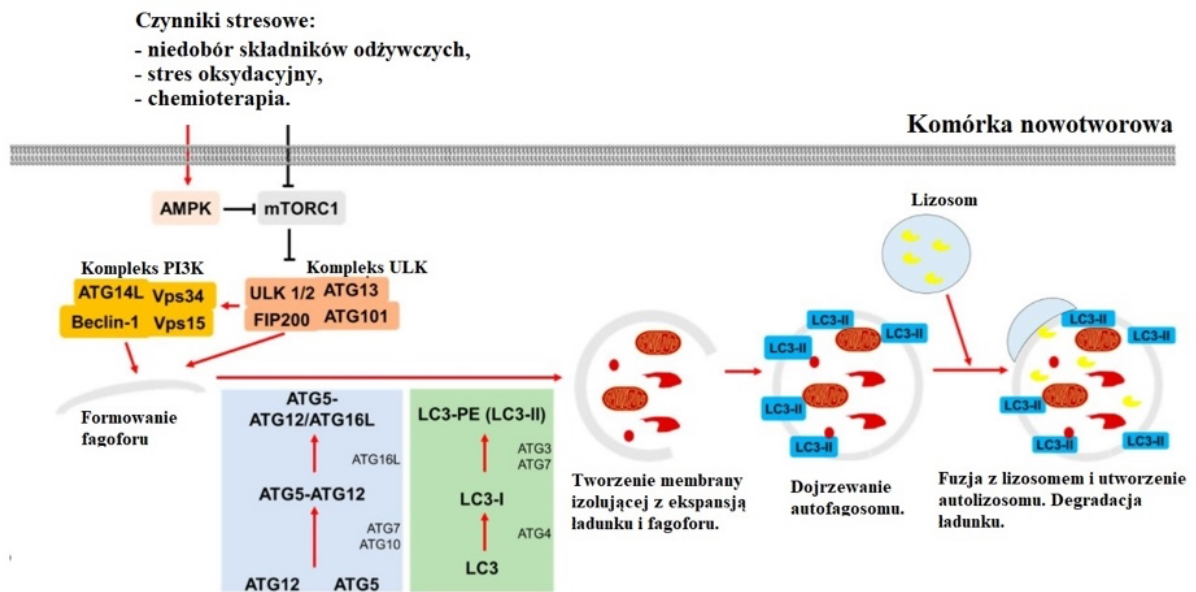
Jednym z dobrze poznanych efektów działania 2-DG na komórkę jest aktywacja kinazy aktywowanej 5'AMP (ang. *adenosine 5'-monophosphate*) - AMPK. W następstwie niedoboru ATP oraz stresu ER aktywacji ulega enzym AMPK [95, 113]. Konsekwencją aktywacji AMPK jest zahamowanie aktywności kinazy mTORC1 (ang. *mammalian target of rapamycin complex 1*) i indukcja procesu autofagii [95, 114].

Autofagia (makroautofagia) zachodząca we wnętrzu każdej komórki jest procesem katabolicznym, który polega na degradacji składników komórkowych (składników

cytoplazmatycznych i organelli) w pęcherzykach o podwójnych błonach - autofagolizosomach [115]. Kompletny autofagosom dojrzewa przez połączenie z lizosomem i/lub endosomem w wyniku czego powstaje autofagolizosom z pojedynczą błoną. W autofagolizosomach zachodzi trawienie (przez hydrolazy) zawartości pęcherzyka a uwolnione do cytoplazmy aminokwasy, nukleotydy czy kwasy tłuszczowe są ponownie włączane w procesy anaboliczne [116, 117]. Proces ten odgrywa istotną rolę we wzroście, rozwoju i homeostazie komórek, jest mechanizmem adaptującym komórki do stresu. Autofagia jest indukowana przez liczne bodźce tj., niedobór składników odżywczych, infekcję patogenem, agregację białek, nieprawidłowo sfałdowane białka, niedotlenienie, obecność wolnych rodników czy działanie związków chemicznych [117, 118]. Ponadto, autofagia jest nieodłącznym procesem występującym w wielu chorobach, w tym nowotworach [119]. W przypadku komórek nowotworowych proces autofagii pełni dwojaką rolę. Podczas niedoboru składników odżywczych/stresu komórkowego autofagia zachodzi z większą intensywnością, aby zapewnić dostarczenie składników odżywczych służących jako źródło energii i podtrzymać przeżywalność komórek [120]. Z drugiej strony, w sytuacji długo trwającego stresu komórkowego, przedłużający się proces autofagii może indukować śmierć komórki na drodze apoptozy [121]. Autofagia i apoptoza to procesy ściśle ze sobą powiązane od których zależy dalszy los komórki [122, 123].

Regulacja przebiegu autofagii jest złożona i bierze w niej udział wiele białek komórkowych, z których kluczowe znaczenia mają kompleks ULK (ang. *unc-51-like kinase*, biorący udział w formowaniu fagoforu oraz aktywacji kompleksu klasy III PI3K (ang. *class III phosphatidylinositol 3-kinase*): Vps34, Vps15, Beklina-1) [124], kompleksy ATG5-ATG12/16L3 oraz białka związane z mikrotubulami, LC3 (ang. *microtubule-associated protein 1 light chain 3*, MAP1-LC3) [125]. W przypadku ssaków, tzw. ssaczy cel rapamycyny, kinaza mTOR jest powiązana z proliferacją i stresem komórek a także progresją nowotworu [126]. Aktywacja mTORC1 ma kluczową rolę w fosforylacji białka związanego z autofagią - ATG (ang. *autophagy-related protein*) a jej konsekwencją jest inhibicja procesu autofagii. W sytuacji stresu, głodu czy uszkodzenia organelli komórki, mTORC1 jest hamowany a autofagia wzmocniona. Kinaza mTORC1 jest regulowana przez kinazę AMPK, która jest aktywowana na skutek fosforylacji treoniny 172 (Thr172) przez kinazę serynowo-treoninową 11 (LKB11) i kinazę kalmodulino zależną (CaMKK). Hamowanie mTORC1 i aktywacja AMPK indukuje autofagię [127-129].

Zahamowanie kinazy mTORC1 powoduje defosforylację kompleksu kinaz ULK i jego aktywację [130], co zostało schematycznie przedstawione na Rysunku 6.



Rysunek 6. Schematyczny przebieg makroautofagii wywołanej czynnikami stresowymi [131].

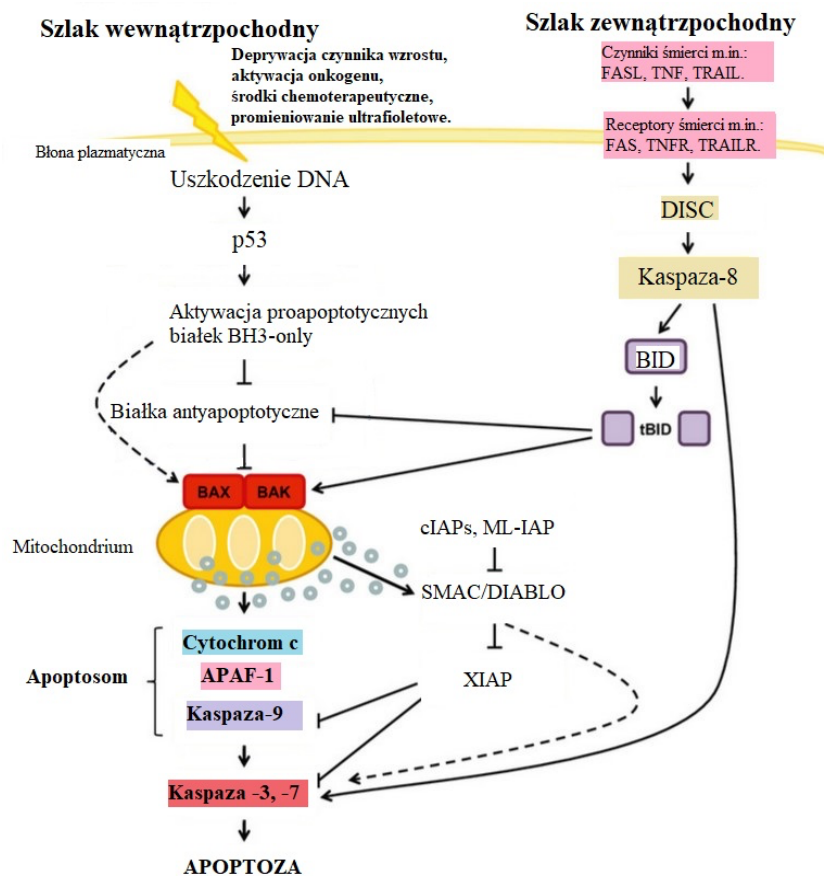
1.8.4. Wpływ 2-DG na indukcję procesu apoptozy

Niedobór ATP w komórce zaburza prawidłowy przebieg wszystkich procesów komórkowych. Ponadto, rozregulowanie procesu dojrzewania białek komórkowych dodatkowo upośledzają ich funkcje. Z tego też względu cytotoksyczne oddziaływanie 2-DG wobec komórek nowotworowych manifestuje się indukcją procesu apoptozy. Apoptoza jest procesem złożonym, którego przebieg w komórce następuje z udziałem szlaku zewnątrzpochodnego (receptorowego), lub szlaku wewnątrzpochodnego (mitochondrialnego), lub szlaku pseudoreceptorowego (wykorzystujący perforyny i granzym B) lub szlaku indukowanego stresem ER [132, 133].

Zewnątrzpochodny szlak apoptozy jest aktywowany, gdy ligandy tj.: czynnik martwicy nowotworu TNF (ang. *tumor necrosis factor*), Fas-L (ang. *fas ligand*) lub TRAIL (ang. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) są przyłączane do specyficznego receptora transbłonowego, odpowiednio: TNFR1, lub CD95/APO-1 lub TRAIL-R [134, 135]. Przyłączenie ligandu do receptora uruchamia utworzenie kompleksu sygnału indukującego śmierć komórki – DISC (ang. *death-inducing signal complex*), w skład którego wchodzi białka FADD (ang. *Fas-associated death domain protein*) lub TRADD (ang. *TNFR1-associated death domain protein*), prokaspazy 8 i 10. Główną rolą kompleksu DISC jest autokataliza i aktywacja kaspazy 8 [136-139]. Aktywna kaspaza 8 aktywuje tzw. kaspazy efektorowe - 3, 6 i 7 lub szlak wewnątrzpochodny apoptozy poprzez translokację białka Bid do błony mitochondriów [140].

Wewnątrzpochodny szlak apoptozy jest stymulowany przez różne czynniki niereceptorowe - negatywne (brak czynników wzrostu, hormonów oraz cytokiny) i pozytywne

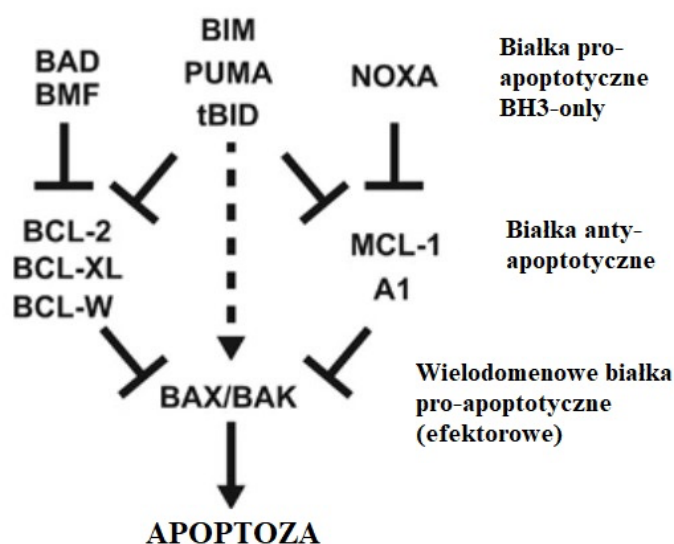
(promieniowanie, niedotlenienie, toksyny, infekcje wirusowe, hipertermia czy wolne rodniki) [133, 141]. W wyniku działania w/w czynników następują zmiany w błonie mitochondrialnej, otwarciu kanałów mitochondrialnych MPTP (ang. *mitochondrial permeability transition pore*), utrata potencjału transbłonowego oraz uwolnienie do cytoplazmy białek pro-apoptotycznych [142]. Poziom zamknięcia lub otwarcia MPTP kontrolują białka z rodziny Bcl-2, zarówno działające anty- lub pro-apoptotycznie [143, 144]. Otwarcie MPTP wiąże się z uwolnieniem do cytoplazmy białek cytochromu c, Smac/DIABLO i proteazy serynowej HtrA2/Omi [145, 146]. Cytochrom c indukuje oligomeryzację białka APAF1 (ang. *apoptotic protease activating factor 1*) i wiąże prokaspazę 9, w wyniku czego powstaje struktura nazywana apoptosomem [147]. W apoptosomie dochodzi do dimeryzacji prokaspazy 9 i jej aktywacji co z kolei aktywuje kaspazy efektorowe 3 i 7 [147, 148]. Drugą grupę białek uwalnianych z mitochondrium do cytoplazmy są białko AIF (ang. *apoptosis inducing factor*), endonukleaza G oraz CAD [149]. Białka te działają niezależnie od kaspaz, przemieszczają się do jądra komórkowego i wywołują fragmentację DNA [150]. Schematyczny przebieg szlaków sygnałowych apoptozy ilustruje Rysunek 7.



Rysunek 7. Szlaki sygnałowe procesu apoptozy. Szlak zewnętrzz pochodny uruchamia przyłączenie do receptorów śmierci ich ligandów co skutkuje utworzeniem kompleksu DISC (miejsce aktywacji kaspazy-8). Szlak wewnętrzz pochodny uruchamia zaburzenie równowagi (która jest pod kontrolą białek

rodziny BH3-only) między białkami Bcl-2 a BAX. Cytochrom c, APAF-1 i prokaspaza-9 prowadzą do powstania apoptosomu i aktywacji kaspazy-9 [151].

Jak wspomniano wcześniej, szlak apoptozy jest ściśle kontrolowany przez białka z rodziny Bcl-2, które zostały sklasyfikowane na podstawie funkcji na trzy grupy [143]. Pierwszą grupą są białka antyapoptotyczne: Bcl-2, Bcl-xl (ang. *Bcl-extra long*), Bcl-w, Mcl-1 (ang. *myeloid cell 91 leukaemia-1*), A1/Bfl i Bcl-B [152]. Podstawową funkcją białek antyapoptotycznych jest zapobieganie zakłóceniom integralności błon mitochondrialnych i tworzenia kanałów [153, 154]. Drugą grupę stanowią białka pro-apoptotyczne wielodomenowe (efektory) takie jak: Bax, Bak, Bok. Kolejną grupę stanowią białka pro-apoptotyczne BH3-only tj.: Bcl-rambo, Bid, Bim, Blk, Bnip3, Nix, NOXA, PUMA, Bcl-Gs, Bad, Bik i Hrk [155]. Oddziaływanie białek pro- i antyapoptotycznych ma charakter dynamiczny i oparty jest na ich wzajemnych oddziaływaniach, które ilustruje Rysunek 8.



Rysunek 8. Białka z rodziny Bcl-2 i ich funkcja w szlaku mitochondrialnym apoptozy. Białka antyapoptotyczne chronią przeżycie komórki zapobiegając otwarciu kanałów MPTP przez zahamowanie proapoptotycznych białek „efektorów” Bax/Bak. Białka BH3-only pełnią kluczową rolę regulacyjną w wewnątrzpochodnym szlaku apoptozy. Umożliwiają czynnikom Bax, Bak otwarcie kanałów MPTP oraz sprzyjają procesowi zaprogramowanej śmierci komórki. Bezpośrednia aktywacja Bax, Bak przez białka Bim, PUMA, tBid nie jest jednoznaczna z indukcją śmierci komórki [156].

W fazie wykonawczej apoptozy kaspazy efektorowe 3, 6, 7 i 9 powodują zniszczenie białek cytoplazmatycznych i jądrowych [157]. Degradacji ulega polimeraza ADP rybozy oraz białkowa kinaza DNA. Uszkodzenie lamin powoduje zniszczenie błony jądrowej, następuje zniszczenie filamentów pośrednich i aktyny w cytoszkielecie [141]. Następuje kondensacja

cytoplazmy (zmiana kształtu i wielkości komórki) i chromatyny, DNA ulega fragmentacji. Podczas zaawansowanego etapu apoptozy jądro komórkowe ulega fragmentacji i zanika błona jądrowa, a ostatecznie powstają tzw. ciała apoptotyczne, które ulegają fagocytozie przez sąsiadujące komórki [141].

Liczne doniesienia potwierdzają proapoptotyczne działanie 2-DG. Wykazano, iż 2-DG przez supresję cytoprotekcyjnej autofagicznej sygnalizacji w komórkach za pośrednictwem kinazy JNK (ang. *c-Jun N-terminal kinases*) może uwrażliwiać komórki nowotworu żołądka na apoptozę indukowaną przez TRAIL [158]. Także Liu i wsp. [159], wykazali, że w komórkach czerniaka 2-DG wzmacniało apoptozę indukowaną przez TRAIL poprzez aktywację kaskady kaspaz i mitochondrialnego szlaku apoptotycznego. Ponadto, Zhang i wsp. [160] stwierdzili, że 2-DG istotnie obniża ekspresję antyapoptotycznego białka cFLIP i kinazy RIP, ułatwiając aktywację kaspazy 8 w kompleksie DISC receptora TRAIL-R w modelu raka wątroby. Ishino i wsp. [102] wskazali natomiast, iż przeciwnowotworowy mechanizm działania 2-DG może być związany z indukcją apoptozy poprzez stres ER wywołany zaburzeniem procesu N-glikozylacji białek w komórkach nowotworu trzustki. Ponadto wykazano, że 2-DG indukuje wytwarzanie ROS prowadząc do śmierci komórki [161, 162]. Co więcej, niedobór glukozy i hamowanie procesu glikolizy przez 2-DG prowadzące do autofagii może także doprowadzić do indukcji apoptozy komórek na drodze wewnątrzpochodnej na skutek załamania homeostazy komórkowej.

1.9. 2-DG jako kandydat na lek w terapii przeciwnowotworowej: badania przedkliniczne i kliniczne

Z uwagi na opisane powyżej mechanizmy cytotoksyczności 2-DG sprawiły, iż od wielu lat 2-DG jest intensywnie badana w różnych modelach jako kandydat na lek przeciwnowotworowy zarówno w monoterapii jak i terapii kombinowanej z chemioterapeutykami lub radioterapią. Tabela II przedstawia podsumowanie dostępnych badań przedklinicznych i klinicznych z zastosowaniem 2-DG w terapii kombinowanej (Tabela II).

Tabela II. Badania przedkliniczne i kliniczne z zastosowaniem 2-DG w terapii kombinowanej.

Czynnik terapeutyczny	Rodzaj nowotworu	Piśmiennictwo
Cisplatyna	- nowotwory głowy i szyi - GBM - nowotwór pęcherza moczowego	[163-165]
Docetaksel	- nowotwory piersi, - nowotwory płuc	[166] - badania kliniczne

	- nowotwory głowy i szyi	
Metformina	- nowotwory piersi - chłoniak z obwodowych limfocytów T - nowotwór jajnika - GBM	[167-170]
NCL-240	- czerniak - drobnokomórkowy nowotwór płuca - nowotwór jajnika - nowotwór piersi	[171]
Doksorubicyna	- rak brodawkowy tarczycy - nowotwór piersi - nowotwór pęcherza moczowego	[165, 172-174]
Daunorubicyna	- nowotwór jelita grubego - nowotwór piersi	[175]
Gemcytabina	- nowotwór pęcherza moczowego	[165]
Sorafenib	- rak brodawkowy tarczycy - rak wątrobowokomórkowy	[172, 176, 177]
Adriamycyna	- kostniakomięsak - drobnokomórkowy nowotwór płuca	[178]
Barasertib i Everolimus	- ostra białaczka limfoblastyczna	[179]
Salirasib	- nowotwór trzustki	[180]
Paklitaksel	- kostniakomięsak - drobnokomórkowy nowotwór płuca	[178]
Berberyna	- nowotwór płuc	[181]
Fenofibrat (FF)	- nowotwór piersi - czerniak - kostniakomięsak	[182]
Resweratrol	- neuroblastoma	[183]
Mito-Q, Mito-CP, Dec-TPP+	- nowotwór piersi	[184]
Metylprednizolon	- chłoniaki nieziarnicze	[185]
Bursztynian alfa-tokoferylu	- gruczolakorak okrężnicy - rak szyjki macicy - gruczolakorak płuc	[186]
Afatynib	- niedrobnokomórkowy nowotwór płuca	[187]
Etopozyd	- myszy z nowotworem wodobrzusza Ehrlicha	[188]
Oligomycyna	- drobnokomórkowy nowotwór płuca - GBM	[189, 190]
Bevacizumab	- GBM	[191]
5'-Fluorouracil	- nowotwór trzustki	[192]
Trastuzumab	- nowotwór piersi	[193]
Dehydroepiandrosteron (DHEA)	- nowotwór piersi - rak prostaty	[194]

Kwas ferulowy z napromieniowaniem	- niedrobnokomórkowy nowotwór płuca	[195]
Radioterapia	- GBM - nowotwór piersi - rak prostaty - rak szyjki macicy	[196-198]

Powszechnie wiadomo, że jednym z głównych czynników korelujących z opornością na radioterapię jest hipoksja oraz nasilony proces glikolizy w komórkach [199]. Badania przeprowadzone przez Singh i wsp. [196] oraz Shah i wsp. [84] wykazały, że 2-DG zwiększa skuteczność radioterapii zależnie od dawki przez selektywne uwrażliwianie komórek nowotworowych przy jednoczesnej ochronie zdrowych komórek. Badania kliniczne fazy I i II wykazały, że 2-DG w dawce 200 mg/kg masy ciała w połączeniu z dużymi frakcjami promieniowania gamma jest skuteczna w leczeniu i dobrze tolerowana u pacjentów z GBM [196]. Kombinacja 2-DG z IR (ang. *infrared radiation*) powoduje nasilenie stresu ER oraz zwiększenie poziomu niesfałdowanych białek co indukowało apoptozę [84].

Liczne badania potwierdziły skuteczność oddziaływania 2-DG w połączeniu z dostępnymi obecnie chemioterapeutykami. Liu i wsp. [200] wykazali skuteczność kombinacji 2-DG z Antymycyną A i Rotenonem w modelu kostniakomięsaka. 2-DG zwiększało także aktywność cytotoksyczną Adriamycyny czy Paklitakselu [178]. Co więcej wykazano, iż połączenia 2-DG i metforminy indukuje śmierć komórek raka piersi związaną ze zmniejszoną ilością ATP, przedłużoną aktywacją AMPK i autofagią. Ponadto badana kombinacja nie indukowała skutków ubocznych a jedynym, ale bardzo rzadkim powikłaniem była kwasica mleczanowa [87].

Co ważne, w opisanych badaniach 2-DG była dobrze tolerowana. W badaniach na modelu mysim z indukowanym zapaleniem skóry nie obserwowano niekorzystnych efektów 2-DG nawet w stężeniu 50 mg/kg m/c. [201]. Z kolei badania w modelu szczurzym wykazały, iż dopiero długotrwałe podawanie 2-DG w wysokiej dawce 200 mg/kg m/c. prowadziło do zmniejszenia spożycia pokarmu, kardiotoxyczości oraz zwiększonej śmiertelności zwierząt [202]. 2-DG stosowano także w badaniach klinicznych m.in. do leczenia zaburzeń psychicznych, nowotworu piersi, płuc, prostaty czy glejaków. Wśród objawów ubocznych 2-DG obserwowano jedynie przejściowe zmęczenie i zawroty głowy, wynikające z zaburzeń podobnych do hipoglikemii [203, 204].

Pomimo dobrze poznanego mechanizmu działania i licznych badań potwierdzających cytotoxyczne właściwości oraz wysokie bezpieczeństwo 2-DG, jego zastosowanie w terapii

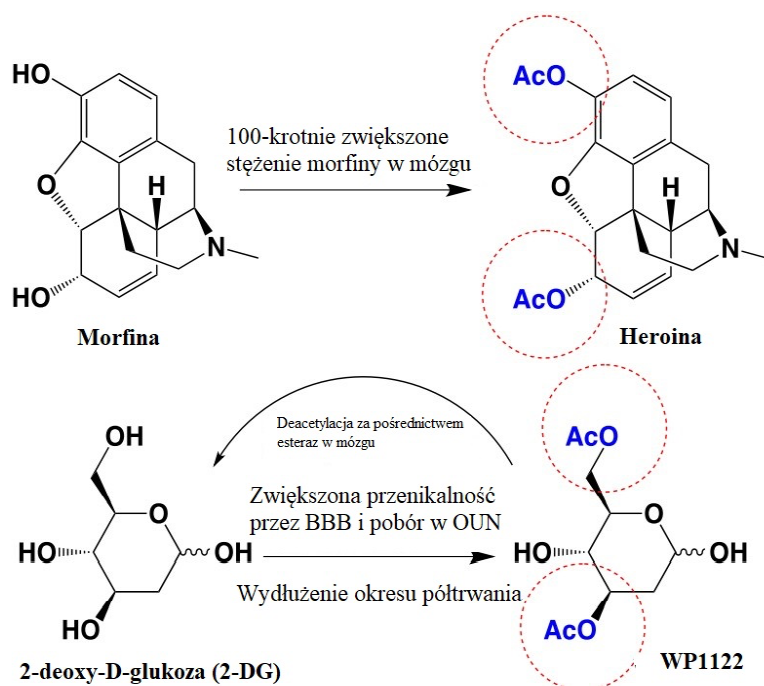
przeciwnowotworowej nie zostało ostatecznie wdrożone [204]. Przyczyną są niewystarczające właściwości farmakokinetyczne 2-DG - jej szybki metabolizm, niska retencja w tkankach docelowych oraz krótki okres półtrwania (w krwi około 90 minut) [203]. Co więcej, żeby konkurować z wysokim poziomem glukozy we krwi, 2-DG musi być stosowany w dość wysokich stężeniach. Badania z udziałem pacjentów chorych na nowotwory lite wykazały, że maksymalna tolerowana dawka 2-DG przez pierwsze dwa tygodnie (trzy-tygodniowego cyklu) wynosiła 45 mg/kg/dzień (C_{max} = 0,449 mM). Jednakże jest to dawka około dziesięciokrotnie niższa niż efektywne stężenia 2-DG stosowane w badaniach in vitro [205].

1.10. Nowe pochodne 2-DG

W celu poprawy właściwości farmakokinetycznych 2-DG i umożliwienia dalszego rozwoju cząsteczki w badaniach przeciwnowotworowych, zsyntetyzowano nowe pochodne 2-DG i jej proleki.

W laboratorium Profesora Waldemara Priebe zsyntetyzowano nowe grupy pochodnych 2-DG: 2-halogeno-pochodne 2-DG tj.: 2-fluoro/2-chloro/2-bromo/2-jodo-2-DG (2-FG, 2-CG, 2-BG, 2-IG), acetylowane analogi oraz pochodne zawierające reszty o właściwościach inhibitorów deacetylaz histonów.

Acetylacja cząsteczek jest częstą modyfikacją chemiczną, która powoduje wydłużenie okresu półtrwania, zwiększa ich lipofilowy charakter oraz poprawia przenikalność przez BBB [206]. Przykładem takiej modyfikacji jest obecność grup acetylowych w strukturze heroiny, warunkujące istotnie większą zdolność przenikania przez BBB oraz błony komórkowe w porównaniu do nieacetylowanej cząsteczki morfiny (Rysunek 9) [207].



Rysunek 9. Znaczenie acetyljacji dla właściwości cząsteczek chemicznych na przykładzie heroiny i 2-DG. Heroina to diacetylowany ester morfiny. Acetyljacja morfiny istotnie zwiększa przenikanie morfiny do mózgu (100–krotnie). Analogicznie, zsyntetyzowano diacetylowaną pochodną 2-DG, WP1122, która dzięki obecności grup acetylowych istotnie lepiej przenika do mózgu, umożliwiając otrzymanie wyższego stężenia 2-DG w OUN [207].

Jedną z acetylowych pochodnych 2-DG jest 2-deoksy-3,6-di-O-acetylo-D-glukoza (WP1122) powstała przez zastąpienie dwóch grup -OH, grupami acetylowymi. Co istotne, WP1122 wnika do komórek i przekracza BBB na drodze dyfuzji biernej a nie poprzez transportery glukozy GLUT, które wykorzystuje 2-DG. Wewnątrz komórki esterazy usuwają grupy acetylowe uwalniając wolną postać 2-DG. Szacuje się, że stężenia 2-DG uwalnianej w mózgu podczas przemian WP1122 jest 9-krotnie większe. Potwierdzeniem wysokiej aktywności WP1122 były cytotoksyczne efekty jej oddziaływania w ortotopowych modelach GBM [208]. Badania przeprowadzone przez zespół Priebe i wsp. [208] potwierdziły hamowanie glikolizy i wysoką wrażliwość szerokiego spektrum komórek nowotworowych na cytotoksyczne oddziaływanie WP1122 zarówno w warunkach hipoksji, jak i normoksji (IC₅₀ w zakresie 1–10 mM). Ponadto, doświadczenia *in vivo* wykazały, wysokie bezpieczeństwo WP1122 oraz istotne wydłużenie przeżycia w mysim ortotopowym modelu GBM [209]. Analizy farmakokinetyczne wykazały szybkie wchłanianie WP1122 po podaniu *per os* oraz wyższe stężenia 2-DG w osoczu w porównaniu ze zwierzętami otrzymującymi równo-molową dawkę 2-DG [209].

Podsumowując, WP1122 jest biologicznie skutecznym prolekiem 2-DG o niskim profilu toksyczności i obiecujących właściwościach farmakokinetycznych, które umożliwiają rozwój przedkliniczny i kliniczny cząsteczki w terapii glejaków i innych wysoko glikolitycznych guzów [208], zarówno w monoterapii jak i terapii kombinowanej.

1.11. Modyfikacje epigenetyczne

Poza zaburzeniami metabolizmu, także anomalie epigenetyczne, wpływające na proces hamowania/aktywacji genów w komórce są jednym z mechanizmów nowotworzenia [210-213]. Można wyróżnić dwie główne grupy genów odpowiedzialnych za proces powstawania nowotworu – onkogeny (geny, których zmiany w DNA mogą prowadzić do przekształcenia prawidłowych komórek w komórki nowotworowe) oraz geny supresorowe (geny hamujące nowotwór, które po zmianie lub eliminacji mogą promować powstawanie nowotworu) [214]. W odróżnieniu od mutacji, modyfikacje epigenetyczne są zmianami odwracalnymi i w konsekwencji można je modyfikować poprzez celowane terapie epigenetyczne [215].

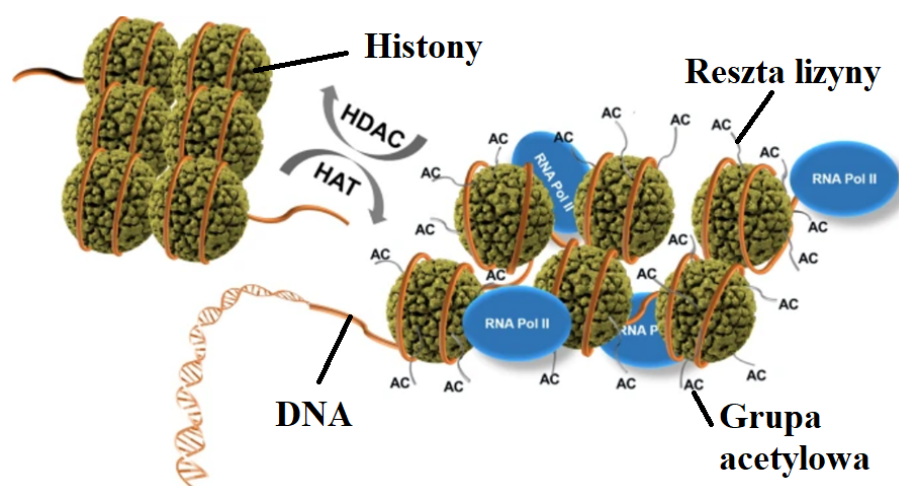
Ważnym mechanizmem epigenetycznym jest modyfikacja struktury chromatyny poprzez potranslacyjne modyfikacje reszt aminokwasowych histonów na ich N-końcu tj.: acetylację, metylację, fosforylację, ubikwitynację, ADP-rybozylację i sumoilację. Modyfikacje regulują transkrypcję genów, zaangażowanych w kluczowe procesy komórkowe [215].

Najczęściej opisywaną modyfikacją białek histonowych jest acetylacja [216]. Przyłączenie grupy acetylowej do grupy ε-aminowej reszt lizyny prowadzi do rozluźnienia wiązania DNA – białka histonowe oraz wzrostu aktywności transkrypcyjnej DNA [215, 217]. Proces acetylacji jest katalizowany przez acetylotransferazy histonowe (ang. *histone acetyltransferases*, HATs), a kofaktorem reakcji jest acetylo-CoA [218]. HATs mogą także acetylować wiele białek niehistonowych tj.: p53, Rb czy MYC. Enzymami o działaniu przeciwnym do HATs są deacetylazy histonów (ang. *histone deacetylases*, HDACs) [219-221]. U ludzi wyróżnia się 18 enzymów HDAC, które w oparciu o podobieństwa w sekwencji i funkcji zostały podzielone na 4 klasy – HDAC I, II, III, IV. Podsumowanie HDACs przedstawia Tabela III.

Tabela III. Klasyfikacja HDACs i ich występowanie w komórce oraz w organizmie. Klasy I, II i IV deacetylaz histonów zawierają domenę katalityczną z jonami cynku (Zn^{2+}). Ich działanie może być hamowane przez związki chelatujące cynk. Klasa III deacetylaz histonów do prawidłowego funkcjonowania potrzebuje obecności NAD^+ [215, 219, 221-226].

Klasa HDACs	Podklasa HDACs	Przedstawiciele	Lokalizacja w komórce	Lokalizacja w organizmie
Klasa I – homologi białka Rpd3 u drożdży (zależna od obecności jonów Zn^{2+})	Ia	HDAC1	jądro kom.	wszystkie tkanki
		HDAC2	jądro kom.	wszystkie tkanki
	Ib	HDAC3	jądro kom.	wszystkie tkanki
	Ic	HDAC8	jądro kom./ cytoplazma	wszystkie tkanki
Klasa II – homologi białka Hda1 u drożdży (zależna od obecności jonów Zn^{2+})	IIa	HDAC4	jądro kom./ cytoplazma	mózg, serce, mięśnie szkieletowe
		HDAC5	jądro kom./ cytoplazma	mózg, serce, mięśnie szkieletowe
		HDAC7	jądro kom./ cytoplazma	serce, mięśnie szkieletowe, łożysko
		HDAC9	jądro kom./ cytoplazma	mózg, mięśnie szkieletowe
	IIb	HDAC6	cytoplazma	serce, wątroba, łożysko, nerka
		HDAC10	cytoplazma	wątroba, nerka, śledziona
Klasa III – homologi białka Sir2 u drożdży (zależna od obecności NAD^+)		SIRT1	jądro kom./ cytoplazma	astrocyty mózg płodu i noworodków, mózg dorosłego (z wyjątkiem SIRT 2 i 5).
		SIRT2	jądro kom./ cytoplazma	
		SIRT3	jądro kom./mitochondr ia	
		SIRT4	mitochondria	
		SIRT5	mitochondria	
		SIRT6	jądro kom.	
		SIRT7	jądro kom.	
Klasa IV – (zależna od obecności jonów Zn^{2+})		HDAC11	jądro kom./cytoplazma	mózg, serce, nerki, mięśnie szkieletowe.

Równowaga i kontrola aktywności acetylotransferaz i deacetylaz histonów jest istotna dla precyzyjnej oraz terminowej ekspresji wielu genów związanych z transdukcją sygnału, wzrostem komórki i jej śmiercią [227]. Schematyczna ilustracja procesu acetylacji/deacetylacji jest przedstawiona na Rysunku 10.



Rysunek 10. Regulacja ekspresji i represji genów pod wpływem działania acetylotransferaz i deacetylaz histonów. Acetylowanie reszt lizyny histonów przez HAT otwiera strukturę chromatyny i daje możliwość wiązania polimerazy RNA II (RNA Pol II). Deacetylowanie reszt lizyny histonu przez HDAC powoduje, że zamknięta konformacja chromatyny nie jest zdolna do wiązania RNA Pol I [228].

Zaburzenia równowagi aktywności HATs/HDACs w acetylowaniu histonów są jednym z mechanizmów rozwoju i progresji nowotworów [229-232]. Spośród białek, których funkcje są regulowane dzięki aktywności HDACs oraz które są najważniejsze w przypadku nowotworów można wyróżnić m.in.: p53, STAT3 (ang. *signal transducer and activator of transcription 3*), RUNX3 (ang. *runt-related transcription factor 3*), β -katenina, receptor estrogenowy, c-Myc, EKLF (ang. *erythroid krueppel-like transcription factor*), rodzina czynników GATA, HIF-1 α , MyoD (ang. *myoblast determination protein 1*), NF- κ B (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), Foxp3 (ang. *forkhead box P3*) [226]. Z tego względu kontrola aktywności HDACs jest wykorzystywana jako jedna ze strategii przeciwnowotworowych [217, 233].

1.12. Inhibitory deacetylaz histonów

Strategia hamowania aktywności deacetylaz histonów jako narzędzia eliminowania komórek nowotworowych zarówno w guzach litych oraz hematologicznych nowotworów złośliwych doprowadziła do wyselekcjonowania szerokiego wachlarza substancji badanych w kontekście przeciwnowotworowym. Jak wykazały liczne prace, zastosowanie inhibitorów HDAC indukuje zahamowanie wzrostu, różnicowania oraz apoptozę komórek nowotworowych [234-238]. Ze względu na strukturę chemiczną, HDACis podzielono na pięć klas – krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, kwasy hydroksyaminowe, epoksyketony, aminobenzamidy oraz naturalnie występujące cykliczne peptydy [219]. Podsumowanie

rozwijanych w terapii HDACs przedstawia Tabela IV. Amerykańska Agencja Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA) zaakceptowała stosowanie m.in. Vorinostatu - do leczenia CTCL (ang. *cutaneous T-cell lymphoma*) [239], Romidepsyny - do leczenia CTCL i PTCL (ang. *peripheral T-cell lymphoma*) [240], Belinostatu - do leczenia PTCL [241] oraz Panobinostatu – w terapii choroby Kahlera - szpiczak mnogi [242].

Tabela IV. HDACis i ich rozwój w terapii przeciwnowotworowej [243].

Klasa HDACis	Przykłady HDACis	Swoistość substratowa HDAC	Stopień zaawansowania rozwoju
Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe	Maślan sodu (NaBt)	Klasa I, IIa	II faza badań klinicznych
	Kwas walproinowy (VPA)	Klasa I, IIa	II faza badań klinicznych – powszechnie dostępny lek przeciwpadaczkowy
	Maślan piwaloiloksymetylu (AN-9)	Klasa I, IIa	II faza badań klinicznych
	Trimaślan glicerylu	Brak danych	I faza badań klinicznych
	Fenylomaślan sodu (4-PB)	I, IIa	Zatwierdzony przez FDA do leczenia zaburzeń cyklu moczniowego, II faza badań klinicznych – guzy mózgu
Kwasy hydroksyaminowe	Vorinostat (SAHA)	1, 2, 3, 4, 6, 7, 9	Zatwierdzony przez FDA
	Trichostatyna A (TSA)	1, 2, 3, 4, 6, 7, 9	Toksyczny
	Panobinostat	1, 2, 3, 4, 7, 9	II faza badań klinicznych
	Belinostat	Klasa I, IIa oraz 6	II faza badań klinicznych
	PCI24781	Klasa I, IIb	I faza badań klinicznych
	Dacinostat	Klasa I, II	I faza badań klinicznych
Cykliczne peptydy	Apicidin	Klasa I, II	Brak danych
	Romidepsyna	1, 2, 4, 6	Zatwierdzony przez FDA
Aminobenzamidy	Entinostat	1, 2, 3, 9	II faza badań klinicznych
	Mocetinosta	1, 2, 3, 11	II faza badań klinicznych
	CI-994	Brak danych	II faza badań klinicznych

W przeciwieństwie do powszechnie stosowanych leków przeciwnowotworowych, inhibitory HDAC wykazują niską toksyczność w stosunku do prawidłowych komórek organizmu [244, 245]. Pierwszymi zidentyfikowanymi inhibitorami HDAC, które są powszechnie wykorzystywane w badaniach, także realizowanych w niniejszej dysertacji, są krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe tj.: maślan sodu (NaBt) i kwas walproinowy (VPA) [246-252].

NaBt (C4) jest związkiem naturalnie syntetyzowanym w jelicie człowieka [253, 254]. Wykazano, że wywiera on działanie przeciwnowotworowe w raku okrężnicy, trzustki, wątroby

a także wobec glejaków [255]. Badania mechanizmu oddziaływania wykazały, iż NaBt indukuje proces apoptozy poprzez zwiększenie ilości proapoptotycznego białka Bad. Ponadto obniża ekspresję czynnika VEGF hamując proces angiogenezy [256]. Ponadto, NaBt powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego przez stabilizację mRNA genów *p21* i aktywację *p16* oraz *p21* [257]. W analizach *in vitro* przeprowadzonych przez Nakagawa i wsp. [255] stwierdzono, że NaBt hamuje proliferację i inwazję komórek GBM linii A172, oraz indukuje ich starzenie. Ponadto badania *in vitro* oraz *in vivo* przeprowadzone przez Engelhard i wsp. [258] potwierdziły, cytostatyczne i cytotoksyczne działanie NaBt wobec komórek GBM. Wlewy doguzowe z NaBt istotnie przedłużyły życie szczurów z guzami wewnątrzmoźgowymi C6 bez objawów toksyczności.

Ze względu na krótki okres półtrwania i niski poziom w osoczu krwi opracowano kilka proleków NaBt. Jednym z nich jest maślan piwaloiloksymetylu (AN9, Pivanex) - inhibitor HDAC klasy I i IIa. Związek ten jest metabolizowany przez wewnątrzkomórkowe esterazy przez co uwalniany jest maślan sodu, formaldehyd i kwas piwalinowy. Wykazano, że AN9 szybciej i w niższych stężeniach niż NaBt wpływa na wzrost, różnicowanie i apoptozę różnych linii komórek nowotworowych [259].

Kolejnym wdrożonym do terapii zaburzeń cyklu mocznikowego prolekiem jest fenylomaślan sodu (4-PB). 4-PB ulega konwersji do fenylooctanu w wyniku mitochondrialnej β -oksydacji. Obecnie 4-PB jest w trakcie II fazy badań klinicznych w terapii GBM [260].

VPA to inhibitor HDAC klasy I i IIa, stosowany powszechnie w leczeniu epilepsji, choroby afektywnej dwubiegunowej, migreny oraz schizofrenii [261-263]. Pierwsze badania kliniczne z użyciem VPA jako środka o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych zostały przeprowadzone w 1999 r [261] i są nadal kontynuowane. VPA wpływa na szereg funkcji komórkowych - uszkodzenie DNA, zatrzymanie cyklu komórkowego, apoptozę, proliferację i różnicowanie komórek. Moduluje aktywność wielu kluczowych szlaków sygnałowych – szlak sygnałowy Wnt [264], p21 Waf1/Cip1 [265, 266], PI3K/AKT/mTOR [267, 268], ERK/JNK [269], NF- κ B [270], Nrf2-ARE [271], Notch1 [272]. Skuteczność cytotoksyczną VPA potwierdzono wobec komórek m.in. raka szyjki macicy, prostaty, okrężnicy, piersi, płuc, pęcherza, szpiczaka, tarczycy, neuroblastomy, białaczki, gleju (w tym glejaka wielopostaciowego) czy trzustki [250, 261, 273]. Kwas walproinowy jest zatem dobrym kandydatem na lek przeciwnowotworowy ze względu na poznany mechanizm działania, dobrą tolerancję, znikome skutki uboczne a także niską cenę. Z uwagi na słabszą skuteczność przeciwnowotworową i potrzebę stosowania wysokich stężeń, VPA jest często stosowany jako

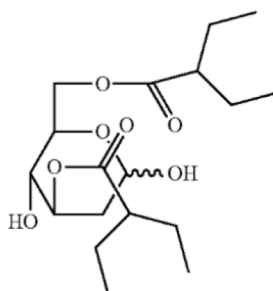
adjuwant w terapiach kombinowanych z innymi środkami przeciwnowotworowymi także w terapii GBM [274-277].

1.13. Terapia kombinowana w onkologii

Większość obecnie stosowanych terapii przeciwnowotworowych jest niezadowolająca ze względu na częste występowanie skutków ubocznych lub stopniowy rozwój oporności przez mechanizmy wrodzone lub adaptacyjne, co ogranicza ich kliniczne zastosowanie. Aby pokonać te trudności, ograniczyć skutki uboczne oraz zwiększyć kliniczną efektywność terapeutyczną stosuje się powszechnie w praktyce terapie łączone. Z tego względu, w przeprowadzonych badaniach w ramach pracy doktorskiej, oceniono potencjał przeciwnowotworowy inhibitorów glikolizy i nowych pochodnych 2-DG, jak również inhibitorów HDAC zarówno w monoterapii jak i działaniu skojarzonym na modelu *in vitro* glejaka wielopostaciowego.

1.14. WP1234 – pochodna 2-DG o dwutorowym oddziaływaniu

Stosowanie terapii kombinowanej wymaga ustalenia odpowiednich zakresów stosowanych leków celem wykluczenia antagonizmu i braku skuteczności leczenia. Ponadto, podawanie dwóch i więcej leków jest dodatkowym obciążaniem dla organizmu pacjenta i naraża go na bardziej dotkliwe efekty uboczne. Z tego względu poza stosowaniem kombinacji inhibitorów glikolizy i HDAC, zaplanowano wykorzystanie nowej pochodnej 2-DG - WP1234, o dwutorowym mechanizmie oddziaływania w komórkach docelowych. 3,6-di-O-(2-Ethyl)butyryl-D-glukopiranoza (WP1234) jest pochodną 2-DG, w strukturze której podstawiono resztę etylomaślanu (Rysunek 11). Założono, iż w wyniku wewnątrzkomórkowego metabolizmu WP1234 uwolni aktywną biologicznie 2-DG, hamującą proces glikolizy oraz resztę etylomaślanu, który może wpływać na modyfikacje epigenetyczne w komórce i ekspresję genów pro- i antyapoptotycznych. Potencjał cytotoksyczny WP1234 będzie również analizowany w niniejszej dysertacji.



Rysunek 11. Wzór chemiczny WP1234.

2. Cel pracy

W oparciu o opisaną hipotezę badawczą dotyczącą możliwości eliminowania komórek nowotworowych glejaka wielopostaciowego poprzez jednoczesne zastosowanie inhibitorów glikolizy oraz deacetylaz histonów, sformułowano następujące cele badawcze pracy:

1. Ocena potencjału i mechanizmów cytotoksycznego współdziałania inhibitorów glikolizy (2-DG, WP1122) oraz inhibitorów deacetylaz histonów (NaBt, NaVPA) w modelu in vitro glejaka wielopostaciowego linii U-87 i U-251.
2. Identyfikacja rodzaju interakcji badanych inhibitorów glikolizy i HDAC w indukcji efektów cytotoksycznych.
3. Ocena potencjału i mechanizmów cytotoksycznego oddziaływania cząsteczki WP1234 - nowej pochodnej 2-DG zawierającej podstawnik etylomaślanu.
4. Ocena znaczenie warunków hipoksji dla cytotoksycznych efektów oddziaływania inhibitorów glikolizy (2-DG, WP1122), HDAC (NaBt, NaVPA) oraz WP1234.

3. Materiały i metody

3.1. Linie komórkowe

Doświadczenia prowadzono z wykorzystaniem ludzkich linii komórkowych glejaka wielopostaciowego: U-87MG oraz U-251MG. Obie linie komórkowe pochodziły z banku linii komórkowych *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (ECACC, Salisbury, Wiltshire, UK).

Linia U-87MG (skrót od *Uppsala 87 Malignant Glioma*, nr. kat. 89081402) pochodzi od 44-letniej pacjentki z Uniwersytetu w Uppsali (1966 r.). Linia komórkowa została przekazana do Memorial Sloan Kettering Cancer Center (1973 r.), a następnie w 1982 roku do *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, USA). W 2016 roku Allen i wsp., [278] porównali profil DNA powszechnie stosowanej linii komórkowej glejaka U-87MG i stwierdzono, że profil ten różni się od profilu pierwotnych komórek. Uznaje się, że obecnie dostępna linia pochodzi od pacjenta płci męskiej w nieznanym wieku. Linia U-87MG to komórki pochodzenia epitelialnego, które rosną w postaci hodowli adherentnej.

Linia U-251MG (dawniej znana jako U-373MG, nr. kat. 09063001) została założona ponad 40 lat temu w laboratorium Wallenberga (Uppsala, Szwecja) i pochodzi od mężczyzny z gwiazdździakiem złośliwym. Oprócz oryginalnej linii U-251MG wyróżniono także jej dwa subklony o różnej morfologii tj. U-251MGAg C11 oraz U-251MGsp. W 1999 roku odnotowano, że inna linia komórkowa glejaka wielopostaciowego tj. U-373MG została krzyżowo zanieczyszczona przez U-251MG. Błędnie zidentyfikowane komórki linii U-251MG zostały nieprawidłowo rozpowszechnione przez wszystkie główne banki komórek. ECACC podjęło dochodzenie w sprawie autentyczności linii U-373MG. Linia komórkowa U-373MG została przemianowana na U-251MG [279].

3.2. Hodowla komórek

Komórki hodowano w sterylnych butelkach do hodowli adherentnych, z zakrętką z filtrem antybakteryjnym o pojemności 250 cm³ i powierzchni 75 cm² (Nest Scientific Biotechnology, Wuxi, China). Hodowle prowadzono w inkubatorze NuAire (Inkubator CO₂ z płaszczem powietrznym model NU-5710E In-vitro Cell, NuAire, USA) w warunkach określanych jako standardowe tj.: 5% wysycenia powietrza CO₂, 95% wilgotności oraz temperatura 37°C. Komórki obu linii hodowano w pożywce wzrostowej o składzie: DMEM (Dulbecco's Modified

Eagle's Medium, Gibco™ - Life Technologies, Grand Island, NY, USA), glukoza (niska zawartość – 1000 mg/L w przypadku komórek U-87MG, wysoka zawartość – 4500 mg/L dla komórek linii U-251MG), glutaMAX, czerwień fenolowa, pirogronian sodu, 10% (v/v) płodowej surowicy bydlęcej (FBS) inaktywowanej termicznie 0,5 h w temp. 56°C (Biowest, Riverside, MO, USA), roztwór Penicyliny i Streptomycyny [10000 U/mL Penicyliny oraz 10 000 µg/mL Streptomycyny] (Gibco™ - Life Technologies, Grand Island, NY, USA), Amfoterycyna B [250 µg/mL] (Gibco™ - Life Technologies, Grand Island, NY, USA), roztwór Gentamycyny (50 mg/mL; Biological Industries, Izrael). Pożywkę wzrostową wymieniano co 48 h uprzednio przepłukując warstwę komórek roztworem PBS z dodatkiem jonów Ca²⁺ oraz Mg²⁺ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). PBS zakupiony w postaci tabletek rozpuszczano w wodzie dejonizowanej a następnie filtrowano do sterylnych butelek przez filtr nabutelkowy, próżniowy, kwadratowy (średnica porów 0,22 µm, PES) (TPP - Techno Plastic Products, Szwajcaria). Wszystkie stosowane bufony oraz pożywki przechowywano w lodówce w temperaturze 4°C a przed użyciem ogrzewano w łaźni wodnej do temperatury 37°C.

3.3. Zakładanie hodowli

Po wyjęciu krioprobówki z dewaru z ciekłym azotem komórki szybko rozmrażano w łaźni wodnej (37°C), następnie przenoszono do sterylnej probówki stożkowej (15 mL), dodawano pożywkę wzrostową (3 mL) i wirowano w celu usunięcia DMSO (5 minut, 1300 rpm) (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Niemcy). Supernatant usuwano, komórki zawieszano w świeżej, sterylnej pożywce wzrostowej (10 mL) i hodowano w sterylnych butelkach do uzyskania odpowiedniej konfluencji w warunkach określanych jako standardowe dla kultur in vitro - 5% wysycenia powietrza CO₂, 95% wilgotności oraz temperatura 37°C.

3.4. Prowadzenie hodowli ciągłej

Komórki po rozmrożeniu hodowano w sterylnych, plastikowych butelkach z filtrem o pojemności 50 cm³ i powierzchni wzrostu 25 cm² (Nest Scientific Biotechnology, Wuxi, China). Po uzyskaniu odpowiedniej konfluencji (kilka dni hodowli) komórki pasażowano na większe butelki - pojemność 250 cm³, powierzchnia 75 cm² (Nest Scientific Biotechnology, Wuxi, China). W zależności od charakteru planowanej analizy komórki hodowano na sterylnych płytkach TC (ang. *tissue culture* – do hodowli tkankowej, adherentnej) z płaskim dnem i

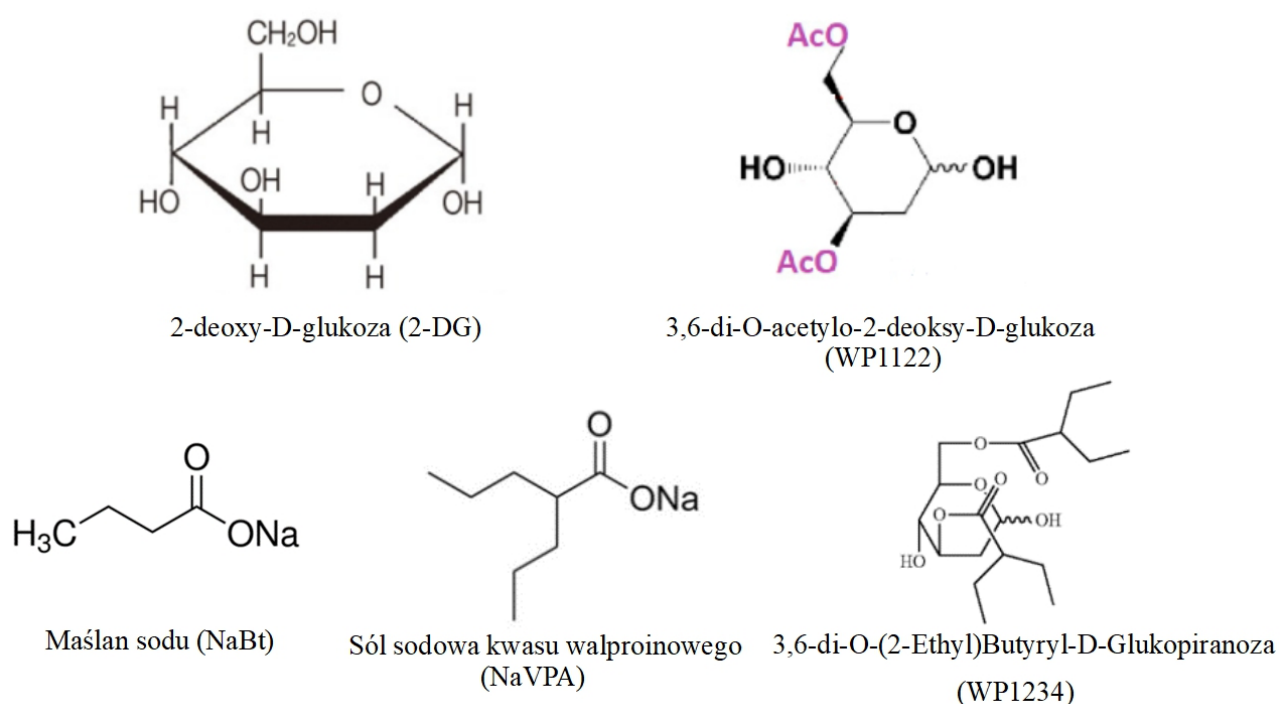
pokrywką zabezpieczającą przed zakażeniem i kontaminacją krzyżową, 96-, 24-, 12- lub 6-dołkowych (Nest Scientific Biotechnology, Wuxi, China). Hodowlę prowadzono także na sterylnych, plastikowych szalkach Petriego o średnicach – 4 cm, 6 cm, 10 cm (TPP - Techno Plastic Products, Szwajcaria) oraz na powierzchni ośmiokomorowych, szklanych szkiełek o pojemności 0,7-0,8 mL (Falcon® CultureSlides, Corning CA, USA). Wszystkie czynności na kulturach komórkowych wykonywano w sterylnych warunkach, w komorze laminarnej z pionowym przepływem powietrza (Alpina, K1300, Biobase Biotech, Jinan Co., Ltd., China). Komorę laminarną sterylizowano przy użyciu lampy UV (ZW30S19W-Z894, Shellett, China). Przy pracy w komorze używano sterylnych, jednorazowych pipet serologicznych (1, 2, 5, 10, 25 mL) (TPP - Techno Plastic Products, Szwajcaria) oraz sterylnych probówek stożkowych typu Falcon – 15, 50 mL (Nest Scientific Biotechnology, Wuxi, China).

3.5. Przygotowanie komórek do doświadczeń – odzyskiwanie i zamrażanie komórek

Po uzyskaniu odpowiedniej konfluencji komórki dwukrotnie płukano roztworem PBS, a następnie w celu odklejenia ich od dna butelki używano roztworu trypsyny o zawartości 1 mM EDTA (Trypsin-EDTA 0,25% z czerwienią fenolową; Gibco™ - Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Komórki inkubowano przez około 3 minuty w temperaturze 37°C a następnie trypsynę inaktywowano poprzez dodanie 2-krotnej objętości pożywki wzrostowej i zawiesinę przenoszono do sterylnych probówek stożkowych (15 mL). Probówki z komórkami wirowano przez 5 minut, 1300 rpm (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Niemcy). Po odwirowaniu supernatant usuwano, a pelet zawieszano w pożywce wzrostowej. W zależności od potrzeb komórki liczone (barwienie błękitem trypanu, Countess Automated Cell Counter, Thermo Fisher Scientific Invitrogen, USA) i używano do doświadczeń lub mrożono w medium wzrostowym z dodatkiem 10% DMSO oraz 2% FBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) i przenoszono do krioprobówek (TPP - Techno Plastic Products, Szwajcaria). Krioprobówki umieszczano w pojemniku do zamrażania (CoolCell® LX, Bioanalytic, Gdańsk, Polska), następnie w zamrażarce o temperaturze -80°C. Po 24 h krioprobówki przenoszono do dewaru z ciekłym azotem (temperatura -196°C) (Donserv, Polska).

3.6. Czynniki doświadczalne

W eksperymentach użyto następujących czynników doświadczalnych, których stężenia ustalono na podstawie własnych badań, jak również dostępnych danych literaturowych: 2-deoxy-D-glukoza (2-DG), maślan sodu (NaBt), sól sodowa kwasu walproinowego (NaVPA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) oraz WP1122 (3,6-di-O-acetylo-2-deoksy-D-glukoza) i WP1234 (3,6-di-O-(2-Ethyl)Butyryl-D-Glukopiranoza) – związki zsyntetyzowane w Department of Experimental Therapeutics, Division of Cancer Medicine The University of Texas MD Anderson, Cancer Center, USA. Wzory chemiczne badanych związków przedstawiono poniżej na Rysunku 12:



Rysunek 12. Wzory chemiczne badanych związków: 2-DG, NaBt, NaVPA, WP1234, WP1122.

Użyte w eksperymentach czynniki doświadczalne przygotowywano jako zatężone roztwory wodne lub w DMSO (Tabela V).

Tabela V. Wykaz badanych związków i sposób w jaki przygotowywano ich stoki.

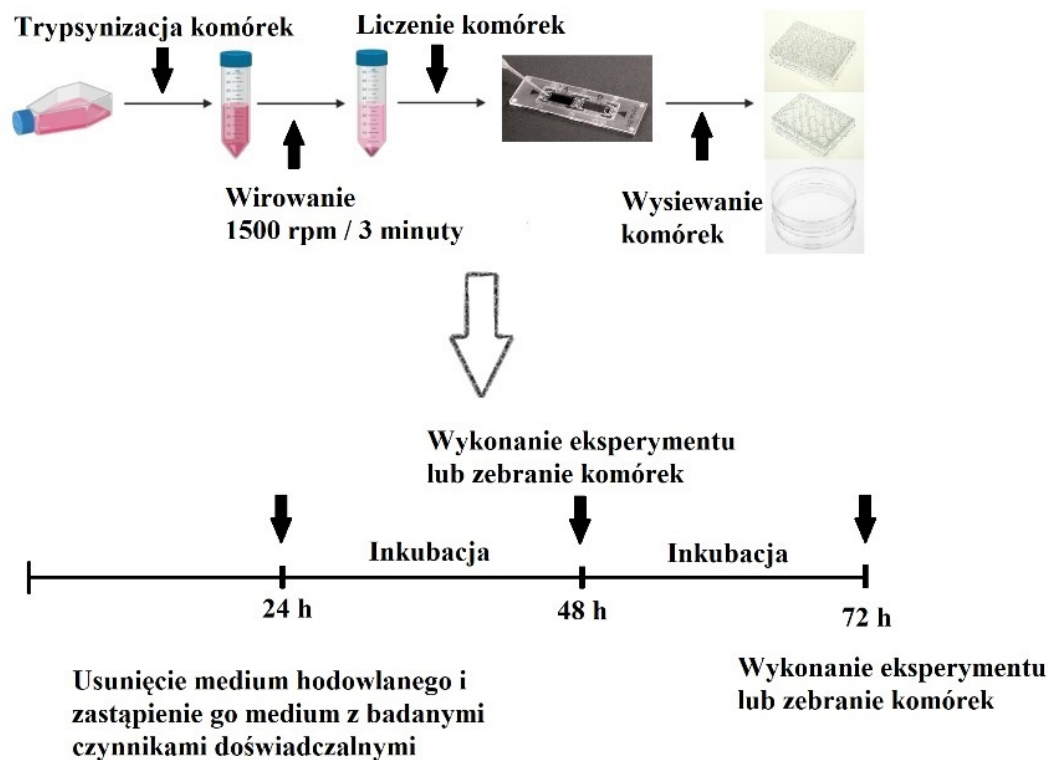
Związek	Stok [mM]	Naważka [mg]	Ilość rozpuszczalnika
2-DG	50	50	6,1 mLH ₂ O

WP1122	50	50	4,03 mL H ₂ O
NaBt	50	55	10 mL H ₂ O
NaVPA	50	50	6 mL H ₂ O
WP1234	830	30	100 µL DMSO

Roztwory wodne filtrowano przez sterylne filtry strzykawkowe PES (0,22 µM, 25 mm średnicy; ChemLand, Stargard, Polska). Z kolei roztwór w DMSO - WP1234, filtrowano przez sterylny filtr strzykawkowy hydrofobowy PTFE (0,22 µM, 25 mm średnicy; ChemLand, Stargard, Polska). Gdy czynnik doświadczalny rozpuszczono w DMSO – pożywka kontrolna także zawierała DMSO (0,1% v/v). Traktowania doświadczalne przygotowywano w sterylnych warunkach poprzez dodanie czynnika doświadczalnego w odpowiedniej, wyliczonej objętości do pożywki kontrolnej.

3.6.1. Schemat doświadczalny

Komórki hodowane w butelkach, w celu odklejenia od dna, trypsynizowano, zawiesinę przenoszono do falkonów, odwirowywano, a pelet rozbijano w 5 mL świeżej pożywki i liczone komórki. W zależności od doświadczenia po odpowiednim rozcieńczeniu zawiesiny, komórki wysiewano na plastikowe płytki 96- lub 24- dołkowe lub szalki (linię U-87MG wysiewano używając DMEM LG (ang. *low glucose*) - niska zawartość glukozy, natomiast U-251MG używając DMEM HG - wysoka zawartość glukozy (ang. *high glucose*). Po 24 h, po przyklejeniu się do podłoża komórek, odsysano medium hodowlane i zastępowano je medium z dodatkiem badanych czynników doświadczalnych w odpowiednich stężeniach z przygotowanych wcześniej stoków (w przypadku obu linii użyto DMEM LG). Czynniki doświadczalne w zakresie od 3 do 5 stężeń były obecne w pożywce przez 48 lub 72 h. Po zakończeniu inkubacji wykonywano odpowiednie oznaczenia biochemiczne lub zbierano komórki do dalszych analiz. Schemat doświadczalny przedstawia Rycina 13.



Rysunek 13. Schemat doświadczenia.

3.7. Analiza aktywności cytotoksycznej związków chemicznych

3.7.1. Ocena żywotności komórek testem MTS

Do określenia liczby żywych komórek po traktowaniach badanymi czynnikami doświadczalnymi użyto kolorymetrycznego testu MTS - CellTiter 96[®]Aqueous MTS Reagent Powder (Promega, Madison, USA). Test ten składa się ze związku tetrazolowego [3- (4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-5- (3-karboksymetoksyfenylo)-2- (4-sulfofenylo)- 2H- tetrazolium] - sól wewnętrzna (MTS) oraz odczynnika sprzęgającego elektrony - metosiarczanu fenazyny (ang. *phenazine methosulfate*, PMS). Ma on na celu określenie aktywności enzymu mitochondrialnego, dehydrogenazy bursztynianowej. MTS jest redukowany przez komórki metabolicznie aktywne do formazanu, który rozpuszcza się w pożywce doświadczalnej. Roztwór MTS przygotowano zgodnie z instrukcją producenta. Odważoną porcję proszku MTS rozpuszczano w odpowiedniej objętości roztworu PBS z dodatkiem PMS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) i ustalano pH przy użyciu 1 M NaCl na pH 6-6,5. Roztwór filtrowano przez sterylny filtr strzykawkowy PES (0,22 μm) i przechowywano w sterylnych probówkach stożkowych (15 mL) w zamrażarce (-20°C) chroniąc przed światłem. Test wykonywano na

komórkach poddanych działaniu czynników doświadczalnych, hodowanych na sterylnych, bezbarwnych 96-dołkowych płytkach z płaskim dnem i pokrywką, w objętości 100 μ L pożywki/dołek. Roztwór MTS (uprzednio rozmrożony i ogrzany w łaźni wodnej, 37°C) dodawano bezpośrednio do każdego dołka z komórkami (20 μ L/dołek) na godzinę przed planowanym zakończeniem doświadczenia. Płytkę inkubowano w cieplarni przez godzinę (5% wysycenia powietrza CO₂, 95% wilgotności oraz temperatura 37°C). Po tym czasie wykonywano pomiar absorbancji za pomocą czytnika wielopłytek (Synergy H1, BioTek, Winooski, USA) przy długości fali 490 nm. Absorbancja wytworzonego formazanu jest wprost proporcjonalna do liczby żywych komórek. Wyniki przedstawiono w odniesieniu do kontroli (komórki nie traktowane czynnikami doświadczalnymi) jako % żywotności komórek kontrolnych (Ctrl). Na podstawie uzyskanych wyników z testu MTS wyznaczono wartości IC₅₀ (ang. *inhibitory concentration*) czyli stężenia związków, w których wzrost i proliferacja komórek była zahamowana w 50% w stosunku do kontroli.

Ponadto za pomocą tego testu, w celu weryfikacji znaczenia dostępności tlenu dla wrażliwości komórek GBM na cytotoksyczne oddziaływanie badanych cząsteczek, dokonano oceny żywotności komórek w warunkach naśladujących hipoksję. W celu indukcji zmian biochemicznych komórek w warunkach naśladujących hipoksję, komórki traktowano DMOG + Rodamina 123, które indukowały aktywację czynnika HIF-1 α oraz intensyfikację procesu glikolizy [200, 280-282]. W celu wykonania testu w warunkach naśladujących hipoksję komórki preinkubowano przez 4 h z DMOG i Rodaminą 123 w wyznaczonych wcześniej stężeniach, następnie wymieniano medium na medium zawierającą DMOG, Rhodaminę 123 i badane czynniki doświadczalne. Po odpowiednim czasie inkubacji wykonywano test MTS jak opisano powyżej.

3.7.2. Pomiar natężenia biosyntezy białka z SRB

Test SRB jest oparty na anionowym barwniku, którym jest sulforodamina B (sól sodowa sulforodaminy B) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Pozwala on na określenie liczby żywych komórek po traktowaniach czynnikami doświadczalnymi na podstawie pomiaru ilości związanej z białkami sulforodaminy (SRB), która ma zdolność elektrostatycznego wiązania się z białkami komórkowymi. Doświadczenie wykonano na komórkach poddanych działaniu czynników doświadczalnych, hodowanych na sterylnych, bezbarwnych 96-dołkowych

płytkach z płaskim dnem i pokrywą, w objętości 100 μ L pożywki/dołek. Po inkubacji komórek z czynnikami doświadczalnymi (48 lub 72 h) dodano 25 μ L/dołek zimnego roztworu 50% kwasu trichlorooctowego (ang. *trichloroacetic acid*, TCA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), a następnie inkubowano przez godzinę w 4°C. Płytki płukano 4x wodą przez delikatne zanurzenie i usuwaniu jej nadmiaru poprzez osuszanie płytki na ręczniku papierowym. Po ostatnim płukaniu, płytki pozostawiano w temperaturze pokojowej do wyschnięcia. Kolejnym krokiem było dodanie 50 μ L, 0,04% roztworu SRB/dołek oraz godzinna inkubacja w temperaturze pokojowej. W celu usunięcia niezwiązanego barwnika płytki płukano cztery razy 200 μ L/dołek 1% roztworem kwasu octowego (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), osuszano ręcznikiem papierowym i pozostawiano do wyschnięcia w temperaturze pokojowej. Po wyschnięciu dodawano 50 μ L/dołek 10 mM roztworu TRIS pH 10,5, mieszano (10 min.) i mierzono absorbancję czytnikiem wielopłytek przy długości fali 510 nm (Synergy H1, BioTek, Winooski, USA). Wyniki przedstawiono w odniesieniu do kontroli (komórki nie traktowane czynnikami doświadczalnymi) jako % żywotności komórek kontrolnych (Ctrl).

3.7.3. Pomiar proliferacji komórek testem z BrdU

BrdU (BrdU Cell Proliferation Assay Kit; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to nieizotopowy test, który pozwala na ilościowy pomiar natężenia syntezy DNA. 5-bromo-2-deoxyurydyna (BrdU) to syntetyczny analog nukleozydu tymidyny, który jest wbudowywany do DNA w trakcie podziału komórki (faza S). Po częściowej denaturacji dwuniciowego DNA, BrdU jest wykrywana immunochemicznie. Wszystkie składniki kitu przechowywano w lodówce (4°C). Test wykonano na komórkach poddanych działaniu związków doświadczalnych, hodowanych na bezbarwnych, sterylnych 96-dołkowych płytkach z płaskim dnem i pokrywą. Do każdego doświadczenia wykonano trzy kontrole – próba ślepa (tylko pożywka wzrostowa), komórki z pożywką wzrostową bez dodatku BrdU oraz komórki z pożywką wzrostową i BrdU. 24 h przed zakończeniem inkubacji z czynnikami doświadczalnymi dodawano 20 μ L BrdU/dołek (BrdU rozcieńczono 500x w pożywce wzrostowej) i kontynuowano inkubację płytek w cieplarni (5% wysycenia powietrza CO₂, 95% wilgotności, temperatura 37°C). Po 24 h inkubacji z czynnikami doświadczalnymi, pożywkę wraz z BrdU usuwano i dodawano wcześniej ogrzany do temperatury pokojowej roztwór utrwalający (200 μ L/dołek). Komórki inkubowano 0,5 h (RT) następnie usuwano utrwalacz a

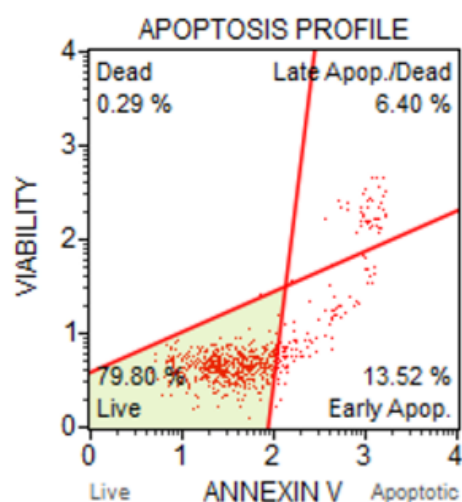
płytkę pozostawiano do wyschnięcia. Płytki następnie 3x płukano buforem i ponownie suszono. Kolejnym etapem testu była detekcja BrdU z wykorzystaniem przeciwciał mysich anti-BrdU (100 µL/dołek; 1,5 h, RT). Po inkubacji dołki ponownie płukano buforem oraz suszono płytkę. Następnie dodawano przeciwciało anti-mysz IgG (100 µL/dołek, 1:2000) i inkubowano kolejne 0,5 h. Płytki ponownie płukano buforem oraz wodą destylowaną i osuszano na ręczniku papierowym. W ostatnim etapie dodawano 100 µL/dołek peroksydazy (TMB Peroxidase) i inkubowano 0,5 h w RT, w ciemności. W wyniku reakcji powstaje niebieski produkt, którego barwa jest wprost proporcjonalna do zawartości BrdU i koreluje z proliferacją komórek. Reakcję zatrzymywano dodając bufor „Acid Stop Solution” (100 µL/dołek). Po zahamowaniu reakcji kolor produktu zmieniał się na żółty. Pomiar absorpcji wykonano z wykorzystaniem czytnika wielopłytek (Synergy H1, BioTek, Winooski, USA) przy długości fali 450 nm. Wyniki przedstawiono w odniesieniu do kontroli (komórki nie traktowane czynnikami doświadczalnymi) jako % żywotności komórek kontrolnych (Ctrl).

3.7.4. Analiza poziomu śmierci komórkowej przy użyciu Aneksyny V i 7-AAD

Do oznaczenia poziomu apoptozy użyto testu z aneksyną V i 7-AAD (Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit; Merck Millipore, USA). Zastosowany test wykorzystuje aneksynę V do wykrywania fosfatydyloseryny eksponowanej na zewnętrznej stronie błony komórkowej komórek apoptotycznych. Pozwala na rozpoznanie komórek wczesno-apoptotycznych. Z kolei barwnik 7-AAD (7-amino-aktynomycyna D) znakuje komórki późno-apoptotyczne oraz martwe. Dzięki temu możliwe jest wyróżnienie populacji komórek na poszczególnych etapach przebiegu apoptozy.

Za pomocą tego testu można wyróżnić cztery populacje komórek:

- nieapoptotyczne, żywe komórki – Aneksyna V (-), 7-AAD (-);
- komórki we wczesnej fazie apoptozy – Aneksyna V (+), 7-AAD (-);
- komórki w późnej fazie apoptozy i komórki martwe – Aneksyna V (+), 7-AAD (+);
- głównie szczątki materiału jądrowego – Aneksyna V (-), 7-AAD (+).



Rysunek 14. Przykładowy wykres gęstościowy przedstawiający sposób bramkowania populacji komórek wyznakowanych Aneksyną V. Wyróżnić można cztery populacje komórek: żywe, we wczesnej fazie apoptozy, w późnej fazie apoptozy i martwe.

W celu wykonania analizy, komórki hodowano na płytkach 6-dołkowych. Po zakończeniu inkubacji z badanymi związkami komórki trypsynizowano (Trypsin-EDTA (0,25%) z czerwieńią fenolową) (Gibco™ - Life Technologies, Grand Island, NY, USA), wirowano przez 5 minut, 1300 rpm (Centrifuge 5804R, Eppendorf, Niemcy). Pelet zawieszano w 1 mL roztworu PBS. Do 100 μ L Muse™ Annexin V & Dead Cell Reagent dodawano 100 μ L zawiesiny komórek, inkubowano 20 minut w ciemności, w RT. Pomiaru dokonywano za pomocą cytometru przepływowego Muse™ Cell Analyzer (Luminex Corporation, USA). Wyniki przedstawiono w odniesieniu do kontroli jako % komórek apoptotycznych.

3.8. Przygotowanie lizatów całokomórkowych przy użyciu buforu RIPA

Komórki do izolacji białka hodowano na sterylnych, plastikowych szalkach o średnicy 6 cm lub 10 cm (Techno Plastic Products (TPP), Szwajcaria). Po odpowiednim czasie inkubacji komórki zbierano dodając 500 μ L zimnego roztworu PBS na każdą szalkę i zeskrobując przy pomocy skrobaków (Techno Plastic Products, TPP, Szwajcaria). Zawiesinę przenoszono do probówek typu Eppendorf 1,5 mL (Nest Scientific Biotechnology, Chiny), wirowano przez 6 minut (10000 g, 4°C; Centrifuge 5804R, Eppendorf, Niemcy). Supernatant odsysano a pelet komórkowy ponownie zawieszano w 500 μ L zimnego PBS i ponownie wirowano. Supernatant

po raz kolejny usuwano. Osad komórek zawieszano w 300 μ L buforu RIPA, w skład którego wchodzi:

- Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- 0,5% Dezoksycholan sodu (Merck Millipore, USA).
- 0,1% Siarczan dodecyłu, sól sodowa (Merck Millipore, USA).
- Fluorek fenylometrylosulfonylu (ang. *phenylmethylsulfonyl fluoride*, PMSF) [10 μ g/mL], ze stoku 10 mg/mL, rozpuszczony w izopropanolu (Merck Millipore, USA) – dodawany tuż przed użyciem.
- Aprotynina [30 μ L/mL] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), dodawana tuż przed użyciem.
- Ortowanadian sodu [10 μ L/mL], ze stoku 100 mM (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), dodawany tuż przed użyciem.

Próbki inkubowano 30 minut, następnie wirowano 5 minut przy 10000 g, 4°C. Supernatant zawierający białka całokomórkowe przenoszono do nowej probówki typu Eppendorf 1,5 ml i wykonywano oznaczenie białka metodą Bradford'a.

3.9. Przygotowanie lizatów cytoplazmatycznych i jądrowych

Do przygotowania lizatów cytoplazmatycznych i jądrowych użyto zestawu do izolacji Nuclear Extraction Kit (Abcam, USA).

Komórki hodowano na plastikowych szalkach o średnicy 10 cm (Techno Plastic Products, TPP, Szwajcaria) uzyskując 70 – 80% konfluencji (około 4×10^6 komórek z jednej szalki). Po inkubacji z badanymi związkami usuwano pożywkę hodowlaną i przepłukiwano dwukrotnie zimnym roztworem PBS (przechowywanym w lodówce, 4°C). Ponownie dodawano 3 mL zimnego roztworu PBS i za pomocą skrobaków (Techno Plastic Products, TPP, Szwajcaria) zeskrobywano komórki z szalek i przenoszono je do 15 ml falkonów. Następnie falkony wirowano 5 minut, 1000 rpm/minutę. Supernatant usuwano, natomiast pelet komórkowy rozbijano w 100 μ L 1X Pre-Extraction Buffer. 1X Pre-Extraction Buffer wcześniej przygotowano rozcieńczając 10X Pre-Extraction Buffer wodą destylowaną w stosunku 1:10 oraz dodając 10 μ L roztworu DTT i 10 μ L PIC (ang. *Protease Inhibitor Cocktail*). Pelet komórkowy zawieszony w 1X Pre-Extraction Buffer i przenoszono do 1,5 mL probówek typu Eppendorf. Inkubowano 10 minut na kruszonym lodzie wortexując co 10 sekund. Po inkubacji

próbówki wirowano - 12000 rpm przez 1 minutę. Supernatant zawierający białka cytoplazmatyczne przenoszono do nowej próbówki typu Eppendorf i zamrażano (-80°C). Pozostały pelet jądrowy ponownie zawieszano w 30 µL przygotowanego wcześniej buforu do ekstrakcji i inkubowano 15 minut na kruszonym lodzie, wortexując (5 sekund) co 3 minuty. Zawiesinę wirowano przez 10 minut, 14000 rpm/minutę. Supernatant zawierający białka jądrowe przenoszono do nowej próbówki i w zależności od potrzeb zamrażano (-80°C) lub mierzono stężenie białka za pomocą metody Bradford'a opisanej poniżej.

3.10. Pomiar stężenia białka metodą Bradford'a w lizatach komórkowych

Do oznaczania stężenia białek wykorzystano metodę Bradford'a [283]. Zasada oznaczenia stężenia białka opiera się na zdolności tworzenia kompleksu białko – barwnik (Brilliant Blue G-250, Bradford Reagent for 0,1-1,4 mg/ml protein, Sigma -Aldrich, St. Louis, MO, USA), a wartość absorbancji jest proporcjonalna do stężenia białek w próbce. W celu wykonania krzywej wzorcowej wykonano roztwory albuminy o wzorcowych stężeniach od 0,2 mg/mL do 1,8 mg/mL (ze stoku albuminy 2 mg/mL; 10 mg albuminy + 5 mL buforu do izolacji białka RIPA). Próbę ślepą stanowił bufor RIPA. Przygotowane standardy jak również płytki 96-dołkowe, na których wykonano oznaczenie umieszczono na kruszonym lodzie. Do 5 µL standardu dodawano 250 µL odczynnika Bradford'a. Odczyt przeprowadzano z wykorzystaniem czytnika wielopłytek (Synergy H1, BioTek, Winooski, USA) przy długości fali 595 nm. Dla wszystkich badanych prób oznaczenie przeprowadzano w trzykrotnych powtórzeniach, a stężenia białek wyliczono na podstawie uzyskanej krzywej wzorcowej.

3.11. Analiza aktywności deacetylaz histonów

W pracy do oceny aktywności deacetylaz histonów użyto testu HDAC Activity Colorimetric Assay Kit (Biovision, Milpitas, USA). Test ten obejmuje dwa główne etapy. Pierwszy polega na tym, że kolorymetryczny substrat HDAC (HDAC substrat) zawierający łańcuch boczny acetylowanej lizyny jest inkubowany z próbką, która posiada aktywność HDAC (kontrolne komórki linii U-87MG, U-251MG i komórki obu linii po traktowaniach badanymi związkami). W drugim etapie dodanie Lysine Developer powoduje barwną reakcję.

Doświadczenie zostało wykonane na 96-dołkowych płytkach. W badaniu wykorzystano lizaty całokomórkowe wykonane po zakończeniu inkubacji z badanymi czynnikami

doświadczalnymi. Lizaty komórkowe zawierające 100 µg białka rozcieńczano w wodzie tak, aby końcowa objętość próbki wynosiła 85 µL. Kontrolę pozytywną stanowiły nietraktowane komórki linii U-87MG lub U-251MG. Kontrolę negatywną stanowił lizat komórkowy rozcieńczony H₂O do 83 µl zawierający 2 µL Trichostatyny A (TSA). Do każdego dołka dodawano 10 µL buforu (10x HDAC Assay Buffer) oraz 5 µL kolorymetrycznego substratu HDAC (HDAC Colorimetric Substrate). Płytkę inkubowano 1,5 h w temperaturze 37°C. Reakcję zatrzymywano dodając 10 µL Lysine Developer. Następnie płytkę inkubowano 0,5 h w temperaturze 37°C. Po tym czasie wykonywano pomiar absorbancji za pomocą czytnika wielopłytek (SYNERGY H1, BioTek, Winooski, USA) przy długości fali 400 nm.

Aktywność deacetylaz histonów jest wprost proporcjonalna do ilości zdeacetylowanej lizyny mierzonej kolorymetrycznie w próbkach. Wyniki przedstawiono w odniesieniu do kontroli pozytywnej – jako % ctrl.

3.12. Analiza natężenia procesu glikolizy na podstawie pomiaru ilości wytworzonego mleczanu

Do oceny wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego poziomu L(+) – mleczanu użyto zestawu - Lactate Assay Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Komórki U-251MG, U-87MG poddane działaniu badanych związków hodowano na plastikowych szalkach o średnicy 6 cm (Techno Plastic Products, TPP, Szwajcaria). Po odpowiednim czasie inkubacji komórki zbierano dodając 500 µL zimnego roztworu PBS i zeskrobując przy pomocy skrobaków (Techno Plastic Products, TPP, Szwajcaria). Zawiesinę komórek przenoszono do probówek typu Eppendorf 1,5 mL (Nest Scientific Biotechnology, Chiny), wirowano przez 6 minut (10000 g, 4°C, Centrifuge 5804R, Eppendorf, Niemcy). Supernatant usuwano, a pelet komórkowy ponownie zawieszano w 500 µL zimnego PBS i ponownie wirowano (6 minut, 10000 g, 4°C). Supernatant usuwano. W celu usunięcia z próbek dehydrogenazy L – mleczanowej pelet komórkowy zawieszano w 500 µL buforu (Lactate Assay Buffer), przenoszono do koncentratorów PES (Pierce™ Protein Concentrators PES, 10K MWCO, 0,5 mL, Thermo Fisher Scientific Invitrogen, USA), wirowano 13000 g przez 10 minut. Powstałą frakcję rozpuszczalną używano do oznaczeń. 50 µL supernatantu nanoszono na płytkę 96-dołkową (w trzech powtórzeniach). Do oceny zewnątrzkomórkowego poziomu mleczanu po zakończonym doświadczeniu, pobierano 50 µL medium hodowlanego, rozcieńczano je 10x i nanoszono na

płytkę 96-dołkową (trzy powtórzenia). Kolejno dodawano 50 μL *Master Reaction Mix* (Lactate Assay Buffer 46 μL , Lactate Enzyme Mix 2 μL , Lactate Probe 2 μL). Płytkę inkubowano 15 minut, chroniąc od światła a następnie mierzono absorbancję przy długości fali 570 nm (Synergy H1, BioTek, Winooski, USA). Wyniki przedstawiono w odniesieniu do kontroli jako % kontroli.

3.13. Ocena syntezy ATP

Do oceny syntezy ATP użyto komercyjnego testu ATP Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Komórki GBM poddane działaniu analizowanych związków lub kombinacji związków hodowano na plastikowych szalkach o średnicy 6 cm (Techno Plastic Products, TPP, Szwajcaria). Po zakończeniu doświadczenia komórki zbierano dodając 500 μL zimnego roztworu PBS i zeskrobując przy pomocy skrobaków (Techno Plastic Products, TPP, Szwajcaria). Zawiesinę komórek przenoszono do probówek typu Eppendorf 1,5 mL (Nest Scientific Biotechnology, Chiny), wirowano przez 6 minut (10000 g, 4°C, Centrifuge 5804R, Eppendorf, Niemcy). Supernatant usuwano, a pelet komórkowy rozbijano w 100 μL ATP Assay Buffer i przenoszono do koncentratorów PES (Pierce™ Protein Concentrators PES, 10K MWCO, 0,5 mL, Thermo Fisher Scientific Invitrogen, USA), wirowano 12000 g przez 30 minut. Powstały przesącz używano do oznaczeń. 50 μL supernatantu nanoszono na płytkę 96-dołkową (w trzech powtórzeniach) i dodawano 50 μL Reaction Mix składającego się z ATP Assay Buffer 44 μL , ATP Probe 2 μL , ATP Converter 2 μL , Developer Mix 2 μL . Przygotowano próbę ślepa – bufor ATP Assay Buffer 46 μL , ATP Probe 2 μL , Developer Mix 2 μL . Do każdego doświadczenia wykonano szereg standardów ATP – 0, 2, 4, 6, 8, 10 nM/dołek. Po dodaniu Reaction Mix do każdego dołka płytkę mieszano przez 3 minuty, następnie inkubowano 30 minut chroniąc od światła. Po tym czasie mierzono absorbancję przy długości fali 570 nm (Synergy H1, BioTek, Winooski, USA). Wyniki przedstawiono w odniesieniu do kontroli jako % kontroli.

3.14. Analiza względnego poziomu białek metodą Western-blot

3.14.1. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym

Rozdział białek wykonano przez pionową elektroforezę na żelu poliakrylamidowym. W zależności od masy cząsteczkowej identyfikowanych białek użyto żeli 15% (białka mniejsze

niż 20 kDa), 10% (20 – 90 kDa), 7,5 – 8,5% (100 – 150 kDa) lub 6% (200 kDa). Żele wykonano z następujących odczynników:

- 30% (v/v) roztwór wodny akrylamidu/bisakrylamidu (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA).
- 10% roztwór wodny SDS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).
- TEMED (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA).
- 20% APS nadsiarczan amonu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).
- TRIZMA base (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Do studzienek przygotowanego żelu nakładano zdenaturowane próbki (100°C przez 4 minuty) zawierające 20 µg białka całokomórkowego oraz 2x stężony bufor Laemmli (1/4 objętości próbki). Elektroforezę wykonano przy użyciu aparatu Mini PROTEAN Tetra System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) przy stałym napięciu – 100 V. W kolejnym etapie wykonano transfer białek na membranę nylonową PVDF (Immun-Blot® PVDF Membrane, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) przy pomocy aparatu do transferu - Trans-Blot® Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) i napięciu 85 V (1,5 h). Membrany w celu aktywacji umieszczono w pojemnikach z metanolem (30 sekund). Transfer przeprowadzono w buforze do transferu składającego się z TRIZMA base, glicyny i metanolu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

3.14.2. Detekcja białek

Membrany nylonowe blokowano przez godzinę, w temperaturze pokojowej w 5 % roztworze odłuszczonego mleka w proszku (Krotoszyn, Polska) (5 g odłuszczonego mleka w proszku + 100 mL buforu TBST). Bufor TBST sporządzono ze składników: 100 mL 10x TBS, 900 mL H₂O, 0,05% Tween 20. Następnie membrany inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi zawieszonymi w 1 % roztworze mleka w proszku. Membrany inkubowano przez noc w temperaturze 4°C. Kolejnego dnia membrany płukano 3x po 10 minut w świeżym buforze TBST i umieszczano w roztworze (mleko w proszku rozpuszczone w buforze TBST – 5 %) przeciwciał wtórych sprzężonych z peroksydazą chrzanową. Membrany z przeciwciałami wtórnymi inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie membrany płukano trzykrotnie w buforze TBST, przekładano na folię i osuszano. Do detekcji białek użyto dwuskładnikowego odczynnika ECL lub ECL PLUS (WesternBright Sirius Chemiluminescent

Detection Kit, Advansta Inc., USA) i przekładano następną folią. Membrany archiwizowano przy użyciu aparatu G-BOX (Syngene, Wielka Brytania). Intensywność otrzymanych prążków analizowano w odniesieniu do białka referencyjnego aktyny.

Przeciwciała pierwszorzędowe użyte do doświadczeń:

- mysie anty-aktyna przeciwciało poliklonalne (1:2500) (nr. kat. 3700S, Cell Signaling, USA)
- królicze anty-HIF-1 α przeciwciało monoklonalne (1:250) (nr. kat. [EP1215Y] (nr. kat. ab51608, Abcam, USA)
- królicze anty-LDHA przeciwciało poliklonalne (1:1000) (nr. kat. 2012S, Cell Signaling, USA)
- królicze anty-PDK1 przeciwciało poliklonalne (1:1000) (nr. kat. ab90444, Abcam, USA)
- królicze anty-Bax przeciwciało monoklonalne (1:1000) (nr. kat. [E63] ab32503, Abcam, USA)
- królicze anty-Bad przeciwciało monoklonalne (1:2000) (nr. kat. [Y208] ab32445, Abcam, USA)
- królicze anty-Bcl-2 przeciwciało monoklonalne (1:500) (nr. kat. ab59348, Abcam, USA)
- królicze anty-pro-kaspaza-3 przeciwciało monoklonalne (1:1000) (nr. kat. ab32499, Abcam, USA)
- królicze anty-MAP-LC3B przeciwciało poliklonalne (1:1000) (nr. kat. 2775S, Cell Signaling, USA)

Przeciwciała drugorzędowe użyte do doświadczeń:

- anty-królik IgG- skonjugowane z HRP (1:1000) (nr. kat. 7074S, Cell Signaling, USA).
- anty-mysz IgG- skonjugowane z HRP (1:1000) (nr. kat. 7076S, Cell Signaling, USA).

3.15. Przygotowanie próbek do analizy ultrastruktury komórek za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM)

Komórki wysiewano w ilości 5×10^4 /mL na sterylne, bezbarwne 24-dołkowe płytki z płaskim dnem i pokrywką, w objętości 500 μ L/dołek. W każdym dołku przed wysianiem komórek, umieszczono okrągłe szkiełko nakrywkowe o średnicy 12 mm (Bionovo, Polska). Komórki inkubowano z 2-DG, WP1122, NaBt, NaVPA przez 24 h oraz WP1234 w stężeniu 250 i 500 μ M w trzech punktach czasowych (4, 8 i 12 h). Po odpowiednim czasie inkubacji komórki utrwalano 2,5% glutaraldehydem i 4% paraformaldehydem przez 4 h, a następnie

płukano 4x po 10 minut 0,1 M buforem kakodylowy. Po ostatnim płukaniu preparatu, roztwór pozostawiono, a płytkę umieszczono w lodówce (-4°C) do momentu dalszej procedury. W kolejnych etapach przygotowania próbek do analizy, komórki utrwalano czterotlenkiem osmu (OsO₄), który reagując z nienasyconymi łańcuchami kwasów tłuszczowych w lipidach błon komórkowych, nadaje kontrast błon struktur komórkowych. Następnie komórki barwiono octanem uranylu (UO₂(O₂CCH₃)₂ * 2H₂O), który kontrastuje białka i kwasy nukleinowe. W kolejnym etapie materiał odwadniano we wzrastających stężeniach EtOH. Szkiełka przekładano na kapsułki wypełnione żywicą, komórkami w kierunku żywicy i polimeryzowano (utwardzano) w 60°C. Po procesie polimeryzacji, szkiełka usuwano a komórki pozostawały na bloczku żywicy. Następnie uzyskane bloczki żywicy z komórkami krojono za pomocą ultramikrotomu (LKB, Szwecja) na ultracienkie skrawki (o grubości ≈ 70 nm), nakładano na specjalne siatki miedziane o średnicy 3 mm i oglądano na transmisyjnym mikroskopie elektronowym (JEM 1200EX, JEOL Co., Japonia).

3.16. Analiza interakcji pomiędzy inhibitorami glikolizy a inhibitorami deacetylaz histonów

Do oceny mechanizmu interakcji pomiędzy inhibitorami glikolizy i inhibitorami HDAC zastosowano metodę efektu mediany opracowaną przez Chou oraz Talalay'a (metoda Chou-Talalay) [284]. W doświadczeniu oceniono żywotność komórek GBM (test MTS) po traktowaniu różnymi kombinacjami wyżej wspomnianych grup związków (1:10, 1:5, 1:2,5, 1:1,25). Na tej podstawie obliczono tzw. indeks kombinacji (ang. *Combination Index*, CI), który określa rodzaj interakcji pomiędzy związkami, gdzie CI > 10 oznacza bardzo silny antagonizm, CI 3,31-10 silny antagonizm, CI 1,46-3,30 antagonizm, CI 1,25-1,45 umiarkowany antagonizm, CI 1,11-1,20 nieznaczny antagonizm, CI 0,91-1,10 prawie addytywny, CI 0,86-0,9 niewielką synergę, CI 0,71-0,85 umiarkowaną synergę, CI 0,31-0,7 synergę, CI 0,1-0,3 silną synergę, CI < 0,1 bardzo silną synergę. Wyniki przeanalizowano za pomocą programu CompuSyn w wersji 1,0 (ComboSyn, Inc., Paramus, N.Y., USA). Poza wyznaczeniem indeksu kombinacji program pozwala także określić wartości dla pojedynczych związków oraz ich kombinacji m. in. D_m – średnia skuteczna dawka, wartość IC₅₀, medialne stężenie inhibitora hamujące w 50% funkcje biologiczne i biochemiczne komórek; m - określa nachylenie wykresu, kształt krzywej dawka-odpowiedź, m = 1, m > 1 oraz m < 1 oznaczają odpowiednio

kształt hiperboliczny, sigmoidalny oraz płaski sigmoidalny; r – współczynnik korelacji Parsona, który przyjmuje zawsze wartość z przedziału -1 do 1, znak tego współczynnika informuje o kierunku korelacji (liniowa ujemna lub liniowa dodatnia). Wartość bezwzględna r informuje o sile korelacji liniowej. Współczynnik r wskazuje jak dobre są dane, gdy $r = 1$ dane uważane są za wzorcowe, gdy $r = 0$ - brak korelacji.

3.17. Analiza statystyczna

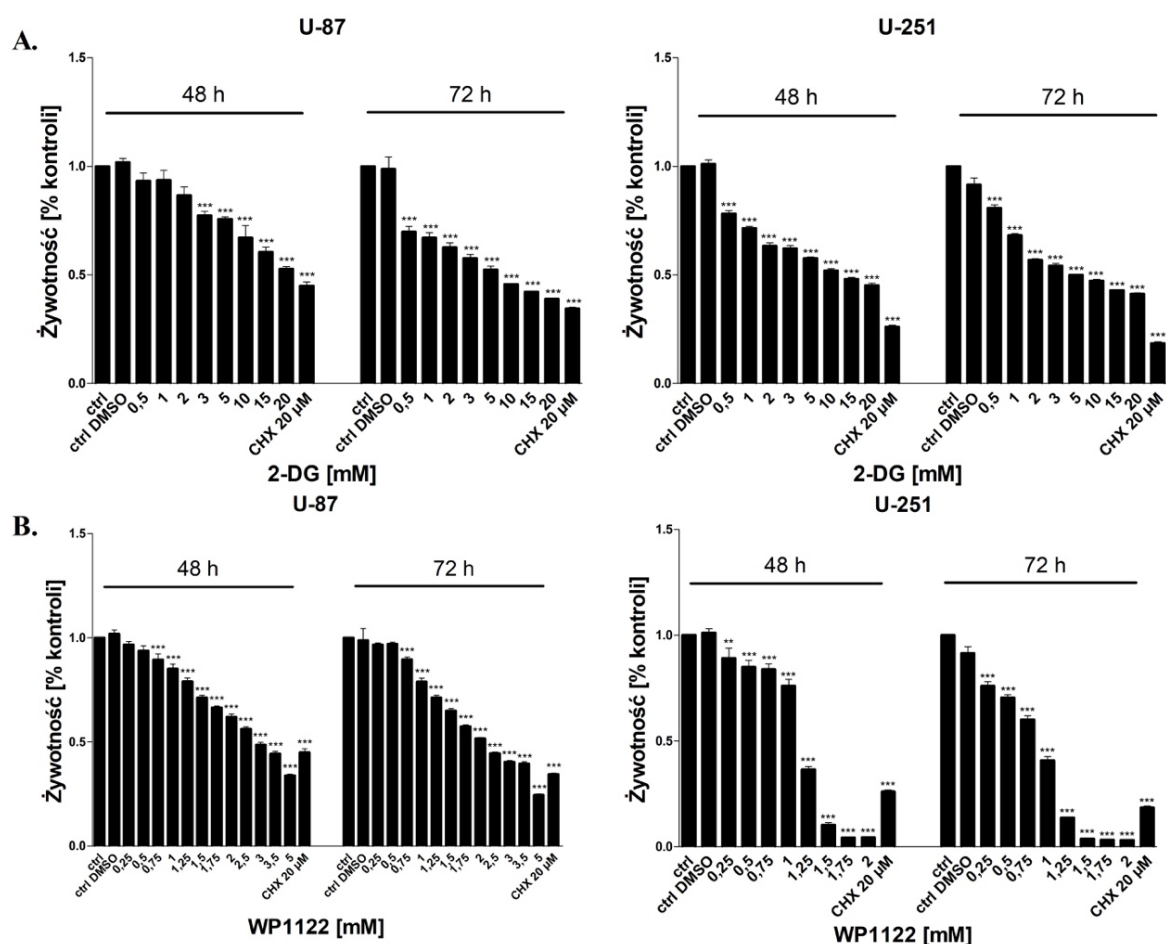
Wyniki badań, uzyskano z przynajmniej trzech odrębnych doświadczeniach, w minimum trzech powtórzeniach każdy. Wyniki analizowano za pomocą programu GraphPad Prism 8.0. W celu określenia różnic ilościowych zastosowano jako jednostkę umowną procent wartości kontrolnej w każdym z punktów czasowych (wartość uzyskana z doświadczenia/wartość kontrolna x 100%). Do oceny istotności statystycznej wykorzystano jednokierunkową (one-way ANOVA) lub dwukierunkową (two-way ANOVA) analizę wariancji jak również test rozstępu Tukey'a. Jako wartość graniczną w określeniu poziomu istotności statystycznej przyjęto $p=0,05$. Wartości średnich różniące się statystycznie pomiędzy średnimi z traktowań a kontrolą oznaczano odpowiednio gwiazdkami (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

4. Wyniki

4.1. Inhibitory glikolizy wywierają cytotoksyczny wpływ na komórki GBM linii U-87 oraz U-251

Efekty cytotoksyczne badanych związków oceniano na podstawie parametrów zmian żywotności, proliferacji i natężenia syntezy białka komórek GBM linii U-87 oraz U-251, pod wpływem wzrastających stężeń badanych inhibitorów glikolizy: 2-DG [0,5 - 20 mM] oraz WP1122 [0,25 - 5 mM] po 48 i 72 h inkubacji. Uzyskane wyniki były porównywane względem wartości uzyskanych dla komórek kontrolnych, nietraktowanych. Jako kontrolę pozytywną zastosowano inhibitor syntezy białek - cykloheksymid (CHX) [20 μ M].

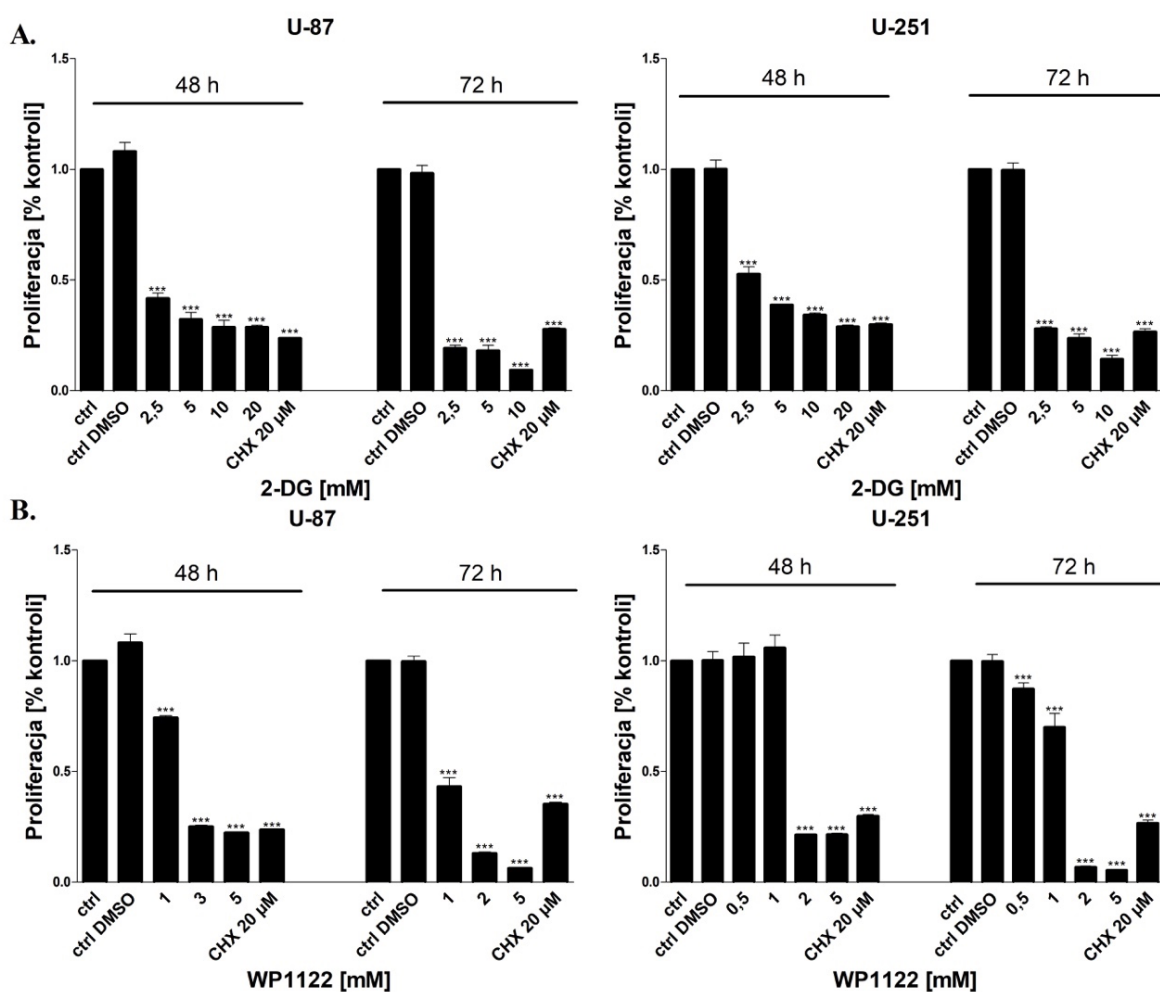
Jak wskazuje Rysunek 15, badane substancje zależnie od dawki i czasu istotnie statystycznie obniżyły żywotność komórek obu linii komórkowych ($***p < 0.001$).



Rysunek 15. Wpływ wzrastających stężeń inhibitorów glikolizy A. 2-DG [0,5 - 20 mM], B. WP1122

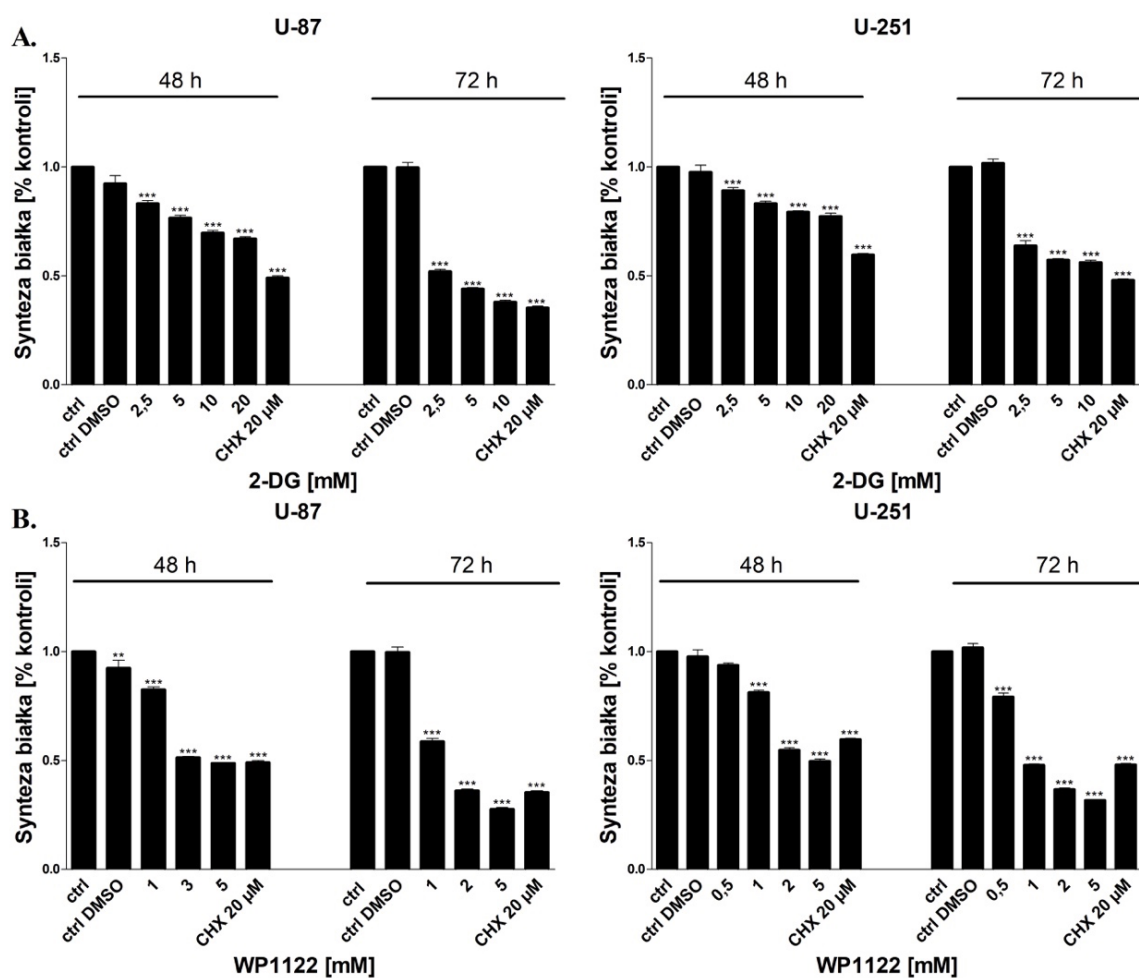
[0,25 - 5 mM], na żywotność komórek linii U-87 oraz U-251 po 48 i 72 h inkubacji. Jako kontrolę pozytywną w doświadczeniu zastosowano CHX [20 μ M]. Istotność statystyczna w odniesieniu do kontroli (ctrl) została oznaczona jako: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Zmianom żywotności komórek towarzyszyło zależne od dawki i czasu istotne statystycznie zmniejszenie proliferacji komórek, oceniane za pomocą testu z BrdU. Zmiany proliferacji komórek pod wpływem wzrastających stężeń badanych związków, po 48 i 72 h inkubacji przedstawia Rysunek 16.



Rysunek 16. Wpływ wzrastających stężeń inhibitorów glikolizy (A. 2-DG [2,5 - 20 mM], B. WP1122 [0,5 - 5 mM]) na proliferację (test BrdU) komórek linii U-87 oraz U-251 po 48 i 72 h inkubacji. Jako kontrolę pozytywną w doświadczeniu zastosowano CHX [20 μ M]. Istotność statystyczna w odniesieniu do kontroli (ctrl) została oznaczona jako: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Oddziaływanie badanych pochodnych indukowało także zmniejszenie biosyntezy białka w komórkach, oceniane za pomocą testu z sulforodaminą (SRB). Zmiany natężenia syntezy białka pod wpływem wzrastających stężeń badanych związków po 48 i 72 h inkubacji przedstawia Rysunek 17.



Rysunek 17. Wpływ wzrastających stężeń inhibitorów glikolizy **A.** 2-DG [2,5 - 20 mM], **B.** WP1122 [0,5 - 5 mM], na biosynteżę białka (barwienie SRB) w komórkach linii U-87 oraz U-251 po 48 i 72 h inkubacji. Jako kontrolę pozytywną w doświadczeniu zastosowano CHX [20 μM]. Istotność statystyczna w odniesieniu do kontroli (ctrl) została oznaczona jako: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Przeprowadzone testy wykazały spójne, korespondujące ze sobą wyniki, które potwierdziły cytotoksyczne oddziaływanie inhibitorów glikolizy względem komórek glejaka linii U-87 i U-251.

Na podstawie przeprowadzonych analiz MTS wyznaczono dla badanych pochodnych wartości IC_{50} , która oznacza stężenia związków, w których wzrost i proliferacja komórek była zahamowana w 50 % w stosunku do kontroli. W przypadku linii komórkowej U-87 uzyskano następujące wartości: 2-DG - 20 mM (48 h) oraz 5 mM (72 h); WP1122 - 3 mM (48 h) oraz 2 mM (72 h). Natomiast dla linii U-251 uzyskano wartości: 2-DG - 12 mM (48 h) oraz 5 mM (72 h); WP1122 - 1,25 mM (48 h), 0,8 mM (72 h) (Tabela VI).

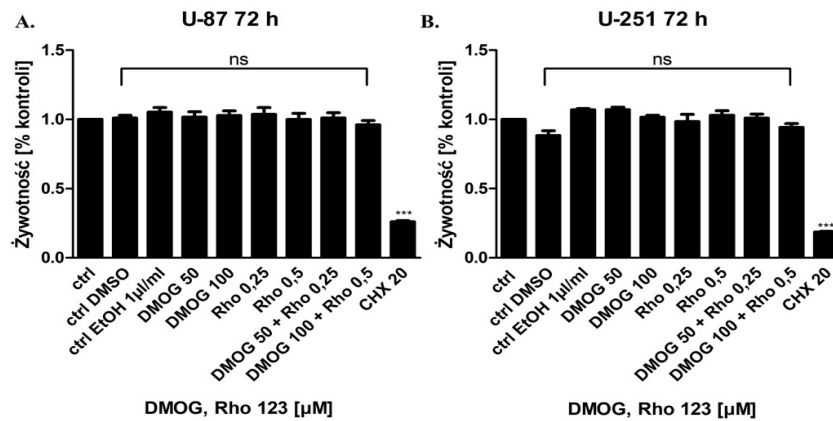
Tabela VI. Wyznaczone wartości IC_{50} 2-DG oraz WP1122 dla linii komórkowych U-87 i U-251 po 48 i 72 h inkubacji.

IC_{50} 2-DG	U-87 [mM]	U-251 [mM]
48 h	20	12
72 h	5	5
IC_{50} WP1122	U-87 [mM]	U-251 [mM]
48 h	3	1,25
72 h	2	0,8

Jak wskazują uzyskane wartości, acetylowana pochodna 2-DG - WP1122 wykazuje istotnie wyższy efekt cytotoksyczny a wartość IC_{50} WP1122 jest ponad dwukrotnie niższa niż dla 2-DG. Ciekawą obserwacją jest także wyższa wrażliwość linii U-251 na hamowanie procesu glikolizy, gdyż wartości IC_{50} wyznaczone dla tej linii są w większości punktów pomiarowych niższe niż dla linii U-87. Wskazuje to na większą zależność komórek linii U-251 od procesu glikolizy.

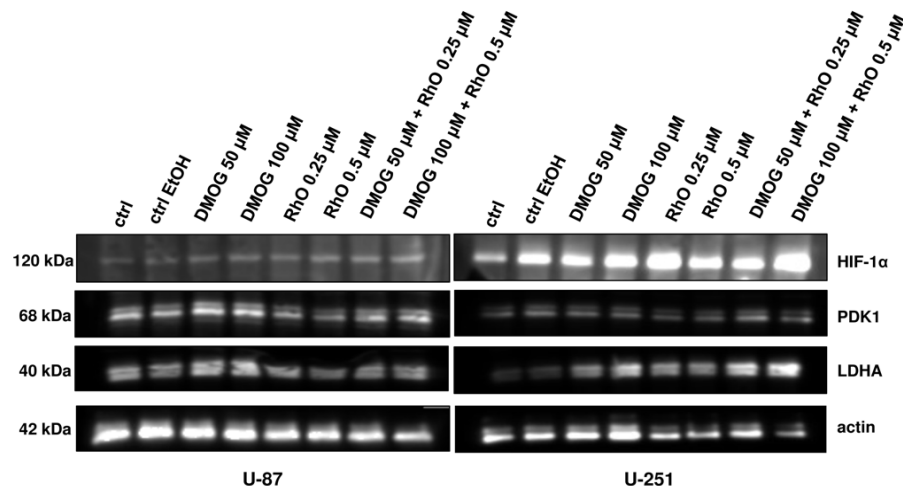
4.2. Znaczenie hipoksji dla cytotoksycznego oddziaływania inhibitorów glikolizy (2-DG, WP1122) w modelu GBM linii U-87 i U-251

Istnieje hipoteza, iż warunki niedotlenienia (hipoksji) powodują całkowitą zależność komórek glejaka wielopostaciowego od procesu glikolizy co koreluje z opornością na radio- i chemioterapię. Aby ocenić potencjał cytotoksyczny badanych inhibitorów glikolizy w warunkach niedotlenienia, zastosowano uznawany w literaturze indukowany chemicznie model naśladujący hipoksję [281, 285]. W celu zasymulowania zmian w komórkach badanych linii, charakterystycznych dla warunków hipoksji, komórki traktowano dimetylooksalicyną (DMOG), hamującą rozkład czynnika HIF-1 α [50, 100 μ M] oraz Rodaminą 123 (Rho 123), która hamuje aktywność oksydacyjną mitochondriów [0,25; 0,5 μ M]. Jak wskazuje Rysunek 18, zastosowane stężenia DMOG i Rho 123 nie były cytotoksyczne wobec komórek GBM.



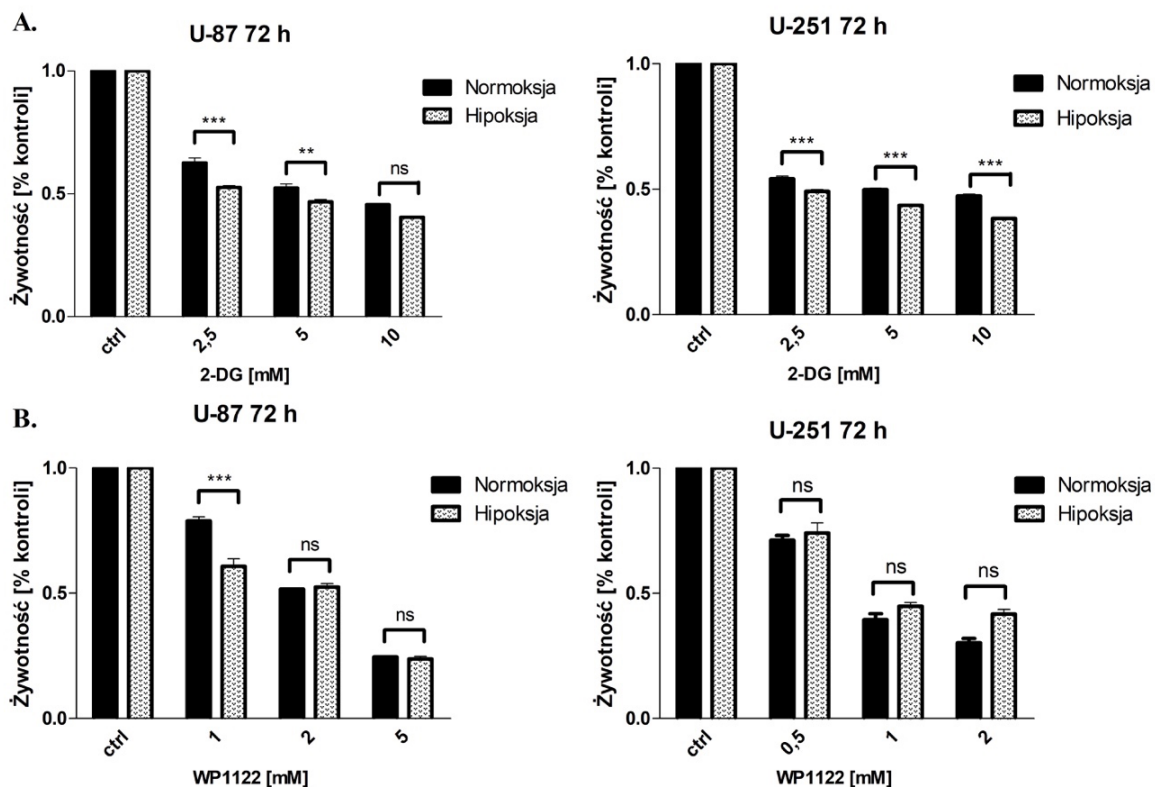
Rysunek 18. Wpływ DMOG [50, 100 μ M] i/lub Rho 123 [0,25, 0,5 μ M] na żywotność komórek linii U-87 (A) i U-251 (B) po 72 h inkubacji. Jako kontrolę pozytywną w doświadczeniu zastosowano CHX [20 μ M]. Istotność statystyczna w odniesieniu do kontroli (ctrl) została oznaczona jako: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

W celu potwierdzenia skuteczności indukcji zmian wewnątrzkomórkowych indukowanych w warunkach naśladujących hipoksję, za pomocą metody Western blot oceniono ekspresję czynnika transkrypcyjnego HIF-1 α oraz regulowanych przez niego enzymów glikolitycznych: PDK1 i LDHA. Jak ilustruje Rysunek 19, poziom białka HIF-1 α był wyższy w komórkach traktowanych DMOG + Rho w porównaniu z kontrolą, przy czym zmiany ekspresji były istotnie większe w linii U-251 niż U-87. Istotnie wyższy poziom LDHA był wykrywany w komórkach linii U-251 (Rysunek 19).



Rysunek 19. Analiza Western blot ekspresji białek HIF-1 α oraz PDK1 i LDHA po traktowaniu komórek linii U-87 oraz U-251, DMOG [50, 100 μ M] i/lub rodaminą 123 [0,25, 0,5 μ M]. Jako białko referencyjne oznaczono aktynę.

Po weryfikacji skuteczności działania zastosowanego modelu naśladującego warunki hipoksji oceniono jego znaczenie dla wrażliwości komórek na cytotoksyczne oddziaływanie badanych inhibitorów glikolizy. W tym celu wykonano ponownie analizę żywotności komórek poddanych działaniu DMOG + Rho 123 [odpowiednio: 100 μ M + 0,5 μ M] i 2-DG [2,5 - 10 mM] lub WP1122 [0,5 - 5 mM] (Rysunek 20).

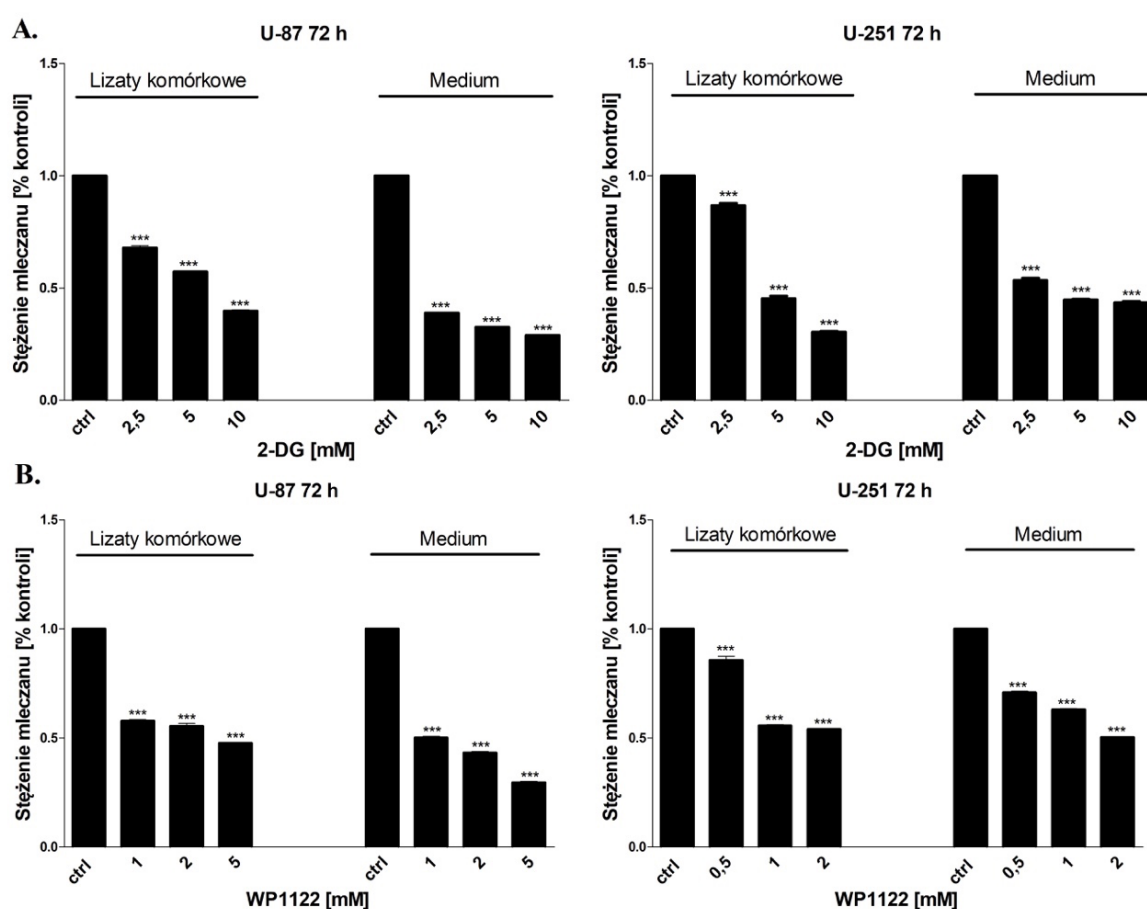


Rysunek 20. Wpływ wzrastających stężeń inhibitorów glikolizy (A. 2-DG [2,5 - 10 mM], B. WP1122 [0,5 - 5 mM]) na przeżywalność (test MTS) komórek linii U-87 oraz U-251 po 72 h inkubacji w warunkach normoksji i warunkach naśladujących hipoksję (DMOG [100 μ M] + Rho [0,5 μ M]). Istotność statystyczna w odniesieniu do kontroli (ctrl) została oznaczona jako: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Analiza żywotności wykazała, iż indukcja warunków naśladujących hipoksję nie wpływa istotnie na cytotoksyczność WP1122 w większości badanych stężeń (Rysunek 20B). W przypadku 2-DG, w warunkach naśladujących hipoksję żywotność komórek była istotnie niższa niż w warunkach normoksji, jednakże różnice nie były większe niż kilka procent (Rysunek 20A). Uzyskane wyniki wskazują na wysoce glikolityczny fenotyp komórek GBM i ich wysoką zależność od procesu glikolizy nawet w warunkach dostępności tlenu.

4.3. Inhibitory glikolizy: 2-DG i WP1122 hamują wytwarzanie kwasu mlekowego

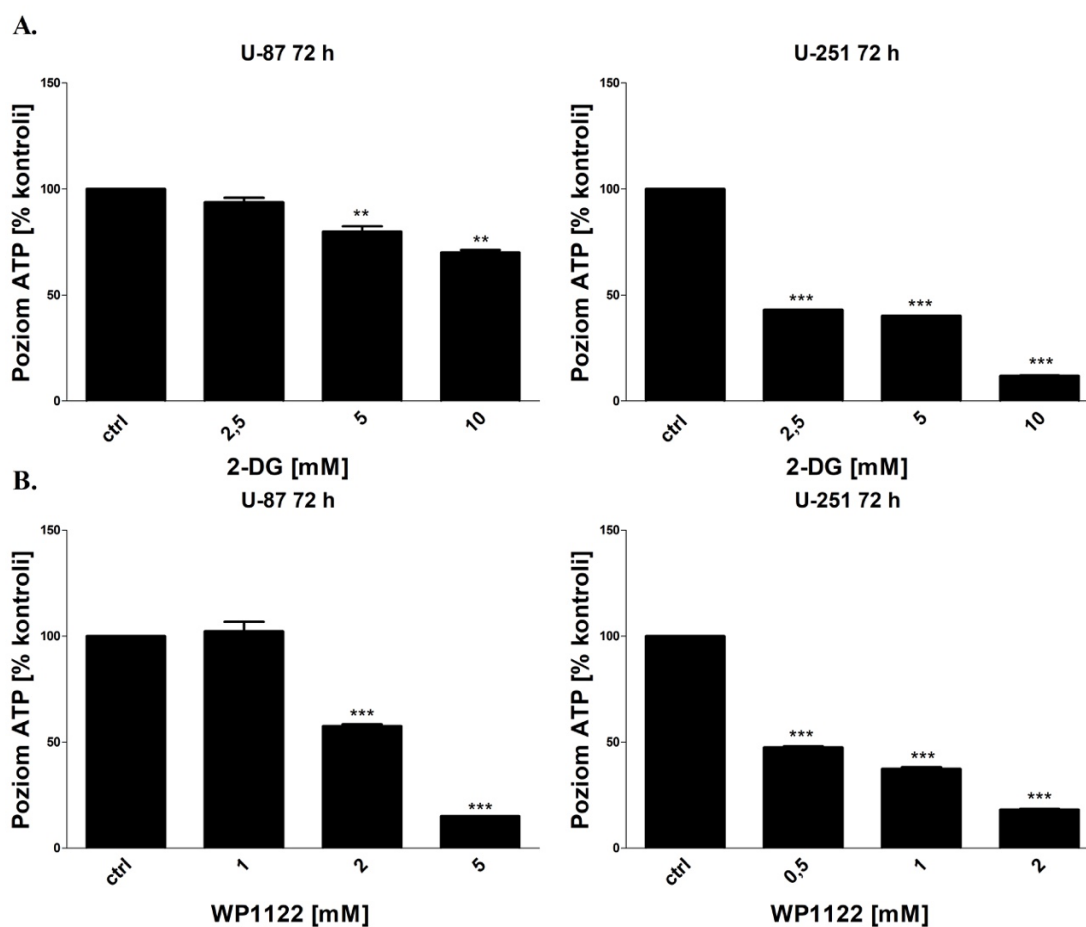
W celu potwierdzenia skuteczności hamowania procesu glikolizy przez 2-DG i WP1122, wykonano oznaczenie stężenia kwasu mlekowego w lizatach komórkowych oraz kwasu mlekowego wydzielonego do medium hodowlanego po 72 h inkubacji z 2-DG [2,5 - 10 mM] i WP1122 [0,5 - 5 mM], z wykorzystaniem komercyjnie dostępnego testu (Lactate Assay Kit). Wykonana analiza potwierdziła, iż zarówno 2-DG jak i WP1122 zależnie od dawki hamują syntezę kwasu mlekowego w odniesieniu do kontroli (Rysunek 21), co potwierdza mechanizm działania badanych związków i zmniejszenie natężenia procesu glikolizy w komórkach.



Rysunek 21. Wpływ wzrastających stężeń inhibitorów glikolizy **A.** 2-DG [2,5 - 10 mM], **B.** WP1122 [0,5 - 5 mM] na stężenie wytworzonego kwasu mlekowego w lizatach komórkowych i kwasu mlekowego wydzielonego do medium linii U-87 oraz U-251 po 72 h inkubacji. Istotność statystyczna w odniesieniu do kontroli (ctrl) została oznaczona jako: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4.4. 2-DG oraz WP1122 zmniejszają syntezę ATP

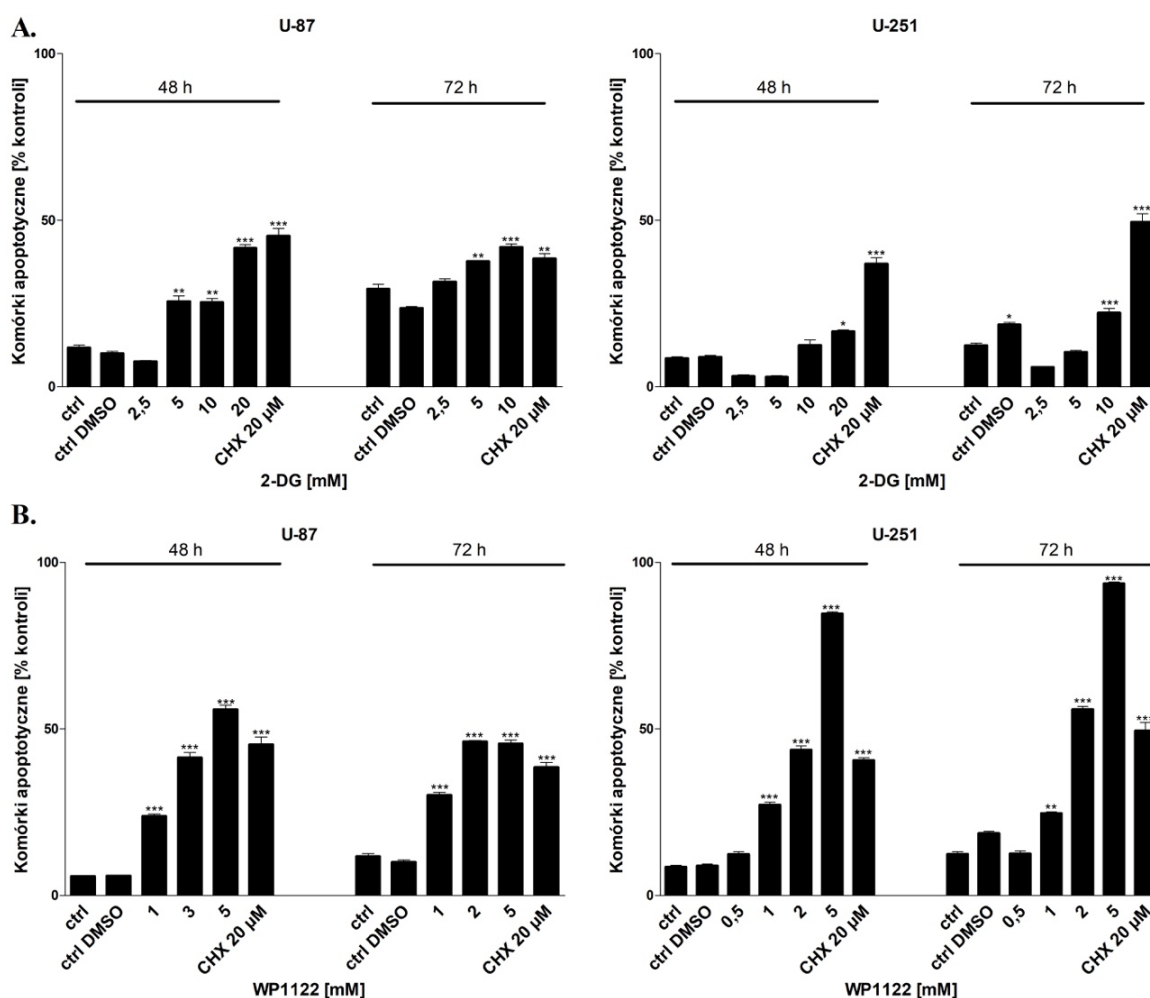
Do oceny skuteczności hamowania procesu glikolizy przez 2-DG oraz WP1122 wykonano oznaczenie stężenia ATP w komórkach linii U-87 oraz U-251 po 72 h inkubacji z 2-DG [2,5 - 10 mM] i WP1122 [0,5 - 5 mM], z wykorzystaniem komercyjnie dostępnego testu (ATP Colorimetric/Fluorometric Assay Kit). Wykonane doświadczenie potwierdziło, iż ilość ATP w komórkach linii U-87 i U-251 traktowanych inhibitorami glikolizy jest mniejsze w porównaniu do kontroli (Rysunek 22). Uzyskane wyniki stanowią dodatkowe potwierdzenie na zahamowanie procesu glikolizy w badanych liniach komórkowych w odpowiedzi na obecność 2-DG i WP1122.



Rysunek 22. Wpływ wzrastających stężeń inhibitorów glikolizy **A.** 2-DG [2,5 - 10 mM], **B.** WP1122 [0,5 - 5 mM] na syntezę ATP w komórkach linii U-87 oraz U-251 po 72 h inkubacji. Istotność statystyczna w odniesieniu do kontroli (ctrl) została oznaczona jako: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4.5. 2-DG i WP1122 indukują apoptozę komórek GBM linii U-87 i U-251

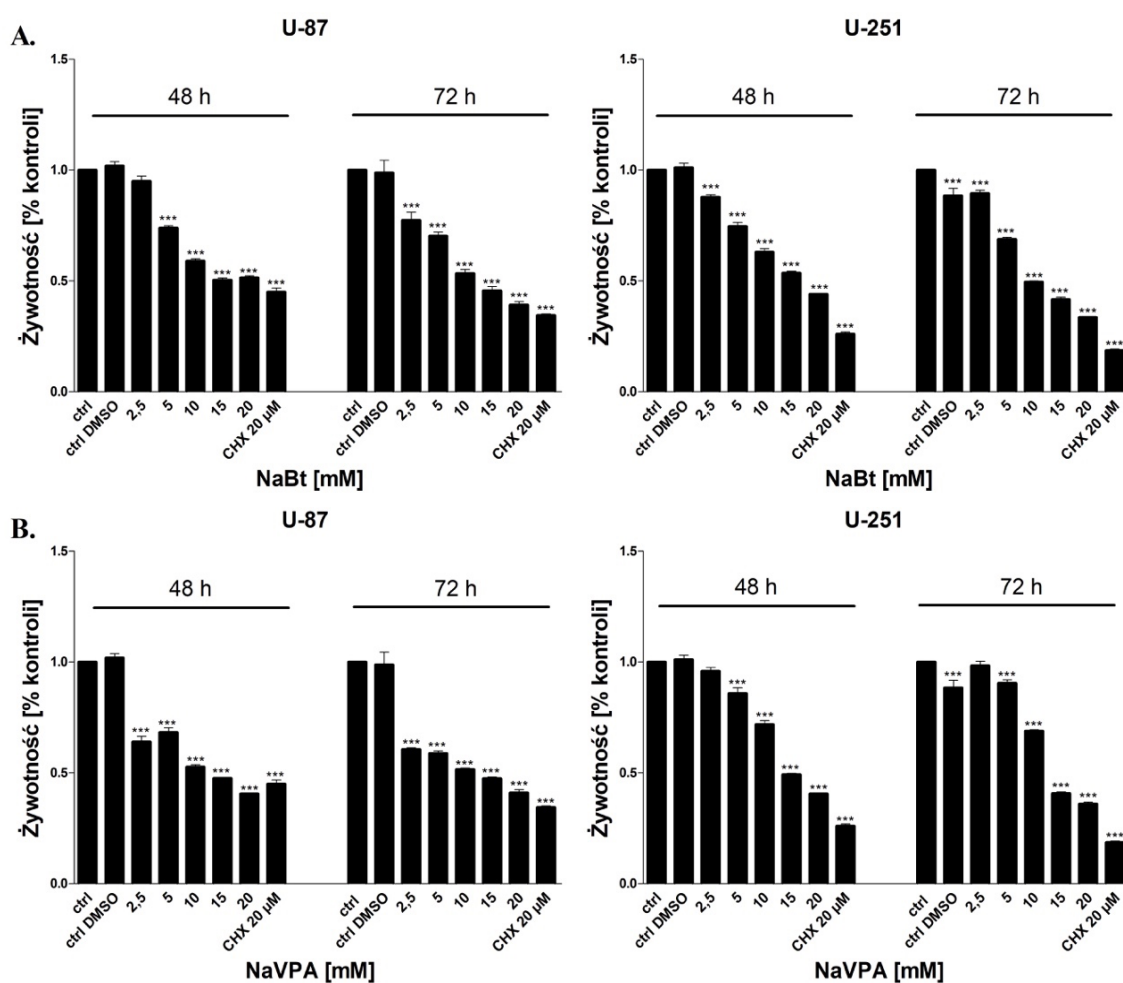
W celu weryfikacji udziału procesu apoptozy w cytotoksycznym oddziaływaniu 2-DG oraz WP1122 wykonano znakowanie komórek apoptotycznych aneksyną V i zmierzono cytometrycznie odsetek komórek pozytywnych. Jak wskazuje Rysunek 23, zmniejszenie żywotności, proliferacji, natężenia syntezy białek oraz syntezy ATP w komórkach U-87 i U-251 korelowało ze wzrostem odsetka komórek apoptotycznych wybarwionych aneksyną V.



Rysunek 23. Znakowanie komórek apoptotycznych aneksyną V. Komórki linii U-87 i U-251 znakowano po 48 i 72 h inkubacji z różnymi stężeniami **A.** 2-DG [2,5 - 20 mM] i **B.** WP1122 [0,5 - 5 mM]. Jako kontrolę pozytywną w doświadczeniu zastosowano CHX [20 μM]. Istotność statystyczna w odniesieniu do kontroli (ctrl) została oznaczona jako: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

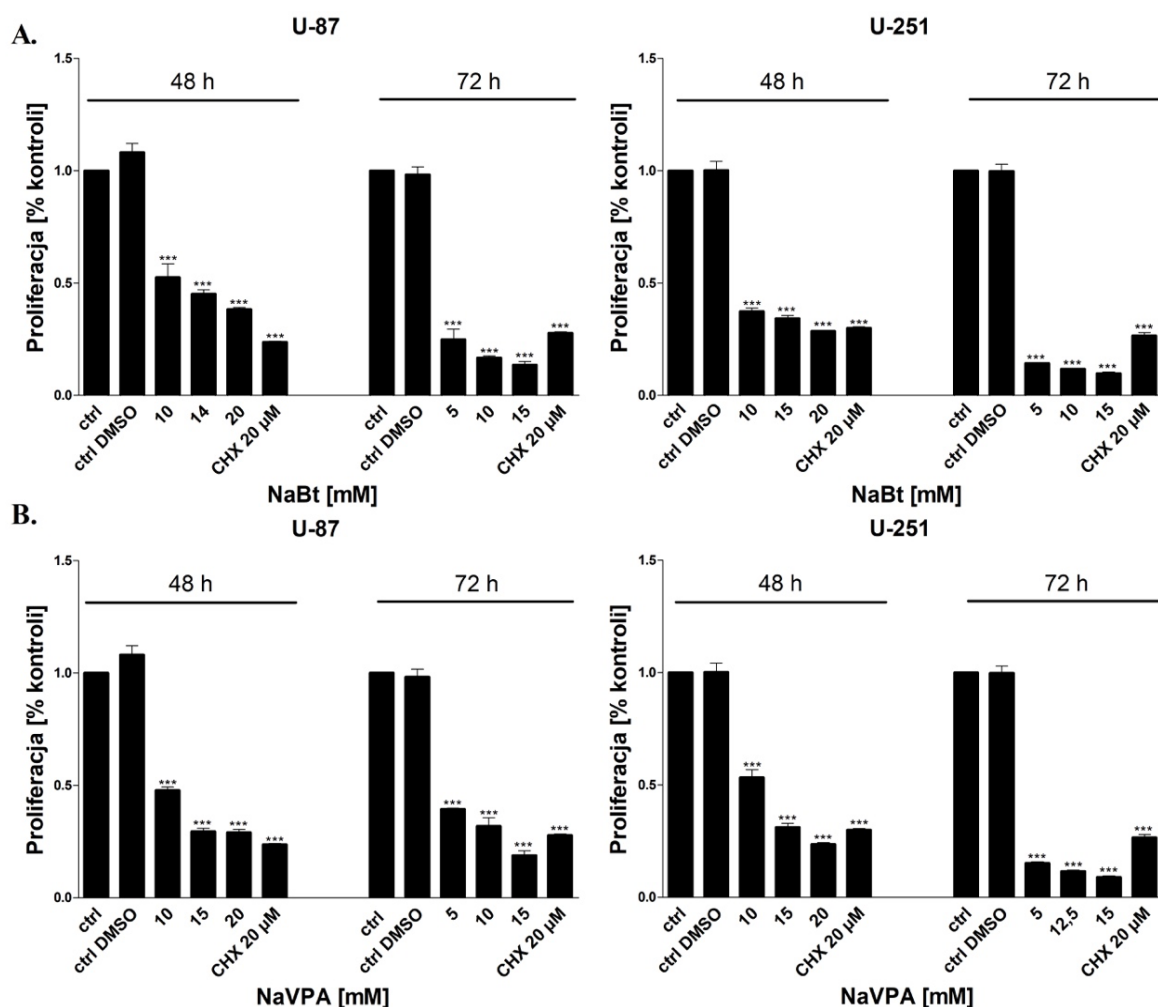
4.6. Inhibitory deacetylaz histonów wywierają cytotoksyczny wpływ na komórki GBM linii U-87 i U-251

W celu oceny wpływu hamowania aktywności deacetylaz histonów (HDAC) przez maślan sodu (NaBt) i walproinian sodu (NaVPA), komórki GBM linii U-87 i U-251 traktowano wzrastającymi stężeniami badanych związków: NaBt [2,5 - 20 mM], NaVPA [2,5 – 20 mM] przez 48 i 72 h. Po zakończeniu inkubacji oceniono żywotność komórek testem MTS. Zmiany żywotności komórek linii U-87 i U-251 pod wpływem badanych związków przedstawia Rysunek 24.



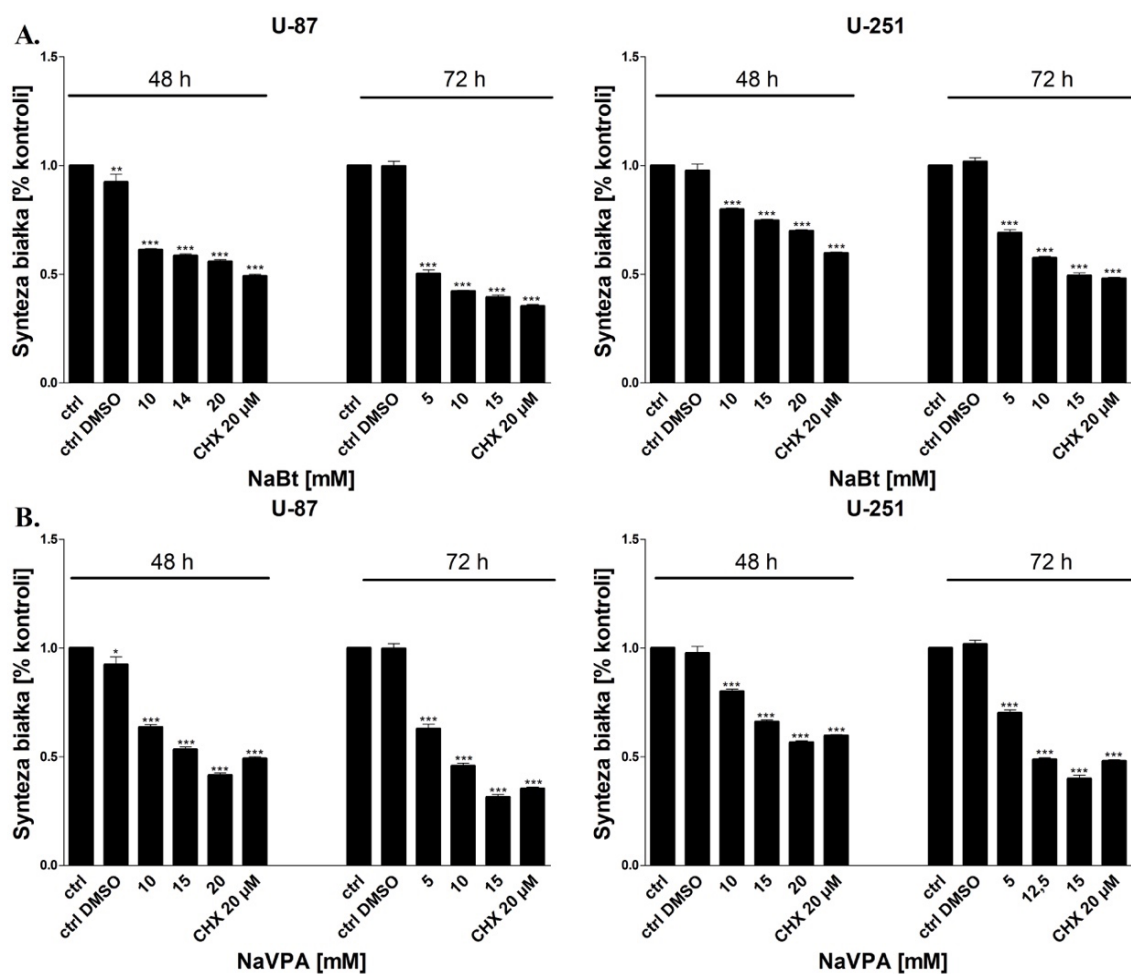
Rysunek 24. Wpływ wzrastających stężeń inhibitorów HDAC **A.** NaBt [2,5 - 20 mM], **B.** NaVPA [2,5 - 20 mM] na żywotność komórek linii U-87 oraz U-251 po 48 i 72 h inkubacji. Jako kontrolę pozytywną w doświadczeniu zastosowano CHX [20 μM]. Istotność statystyczna w odniesieniu do kontroli (ctrl) została oznaczona jako: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Zmianom żywotności komórek towarzyszyło zależne od dawki i czasu istotne statystycznie zmniejszenie proliferacji komórek, oceniane za pomocą testu z BrdU (Rysunek 25).



Rysunek 25. Wpływ wzrastających stężeń inhibitorów HDAC (A. NaBt [5 - 20 mM], B. NaVPA [5 - 20 mM]) na proliferację (test BrdU) komórek linii U-87 oraz U-251 po 48 i 72 h inkubacji. Jako kontrolę pozytywną w doświadczeniu zastosowano CHX [20 μM]. Istotność statystyczna w odniesieniu do kontroli (ctrl) została oznaczona jako: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Efekty cytotoksyczne badanych pochodnych, indukowały także zmniejszenie syntezy białka w komórkach U-87 i U-251, co ilustruje Rysunek 26.



Rysunek 26. Wpływ wzrastających stężeń inhibitorów HDAC (A. NaBt [5 - 20 mM], B. NaVPA [5 - 20 mM]) na syntezę białek w komórkach linii U-87 oraz U-251 po 48 i 72 h inkubacji z badanym związkiem. Jako kontrolę pozytywną w doświadczeniu zastosowano CHX [20 μM]. Istotność statystyczna w odniesieniu do kontroli (ctrl) została oznaczona jako: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Na podstawie przeprowadzonych analiz MTS, wyznaczono dla badanych pochodnych wartości IC_{50} , którego wartości wynosiły odpowiednio: dla komórek linii U-87: NaBt - 14 mM (48 h) i 10 mM (72 h); NaVPA - 15 mM (48 h) i 10 mM (72 h), dla komórek linii U-251: NaBt - 15 mM (48 h) oraz 10 mM (72 h); NaVPA - 15 mM (48 h) i 12,5 mM (72 h) (Tabela VII).

Tabela VII. Wyznaczone wartości IC_{50} NaBt oraz NaVPA dla linii komórkowych U-87 i U-251 po 48 i 72 h inkubacji.

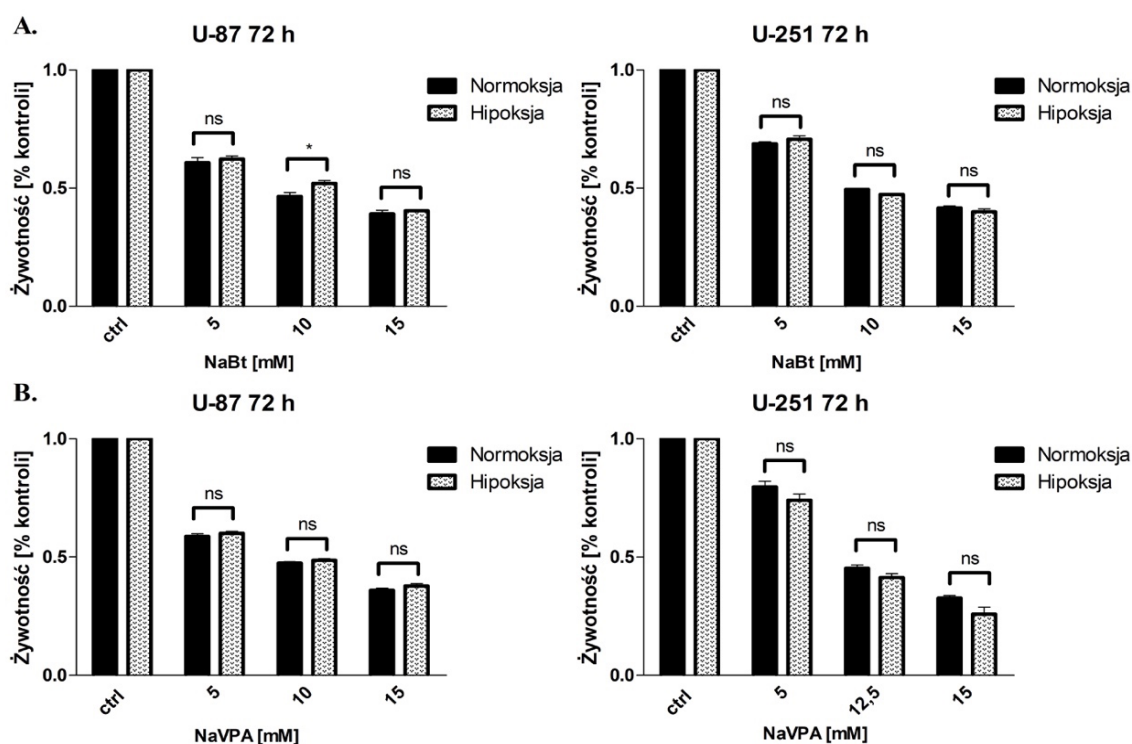
IC_{50} NaBt	U-87 [mM]	U-251 [mM]
48 h	14	15
72 h	10	10

IC ₅₀ NaVPA	U-87 [mM]	U-251 [mM]
48 h	15	15
72 h	10	12,5

Jak wskazują uzyskane wyniki, aktywność cytotoksyczna obu badanych inhibitorów HDAC była zbliżona o czym świadczą podobne wartości IC₅₀.

4.7. Znaczenie hipoksji dla cytotoksycznego oddziaływania inhibitorów deacetylaz histonów (NaBt, NaVPA) w modelu GBM linii U-87 i U-251

W celu oceny znaczenia zmian indukowanych przez warunki symulujące hipoksję dla wrażliwości komórek na cytotoksyczne oddziaływania badanych inhibitorów deacetylaz histonów, wykonano ponownie analizę żywotności testem MTS komórek poddanych działaniu DMOG + Rho 123 [odpowiednio: 100 μM + 0,5 μM] i NaBt [5 - 15 mM] lub NaVPA [5 - 15 mM] (Rysunek 27).

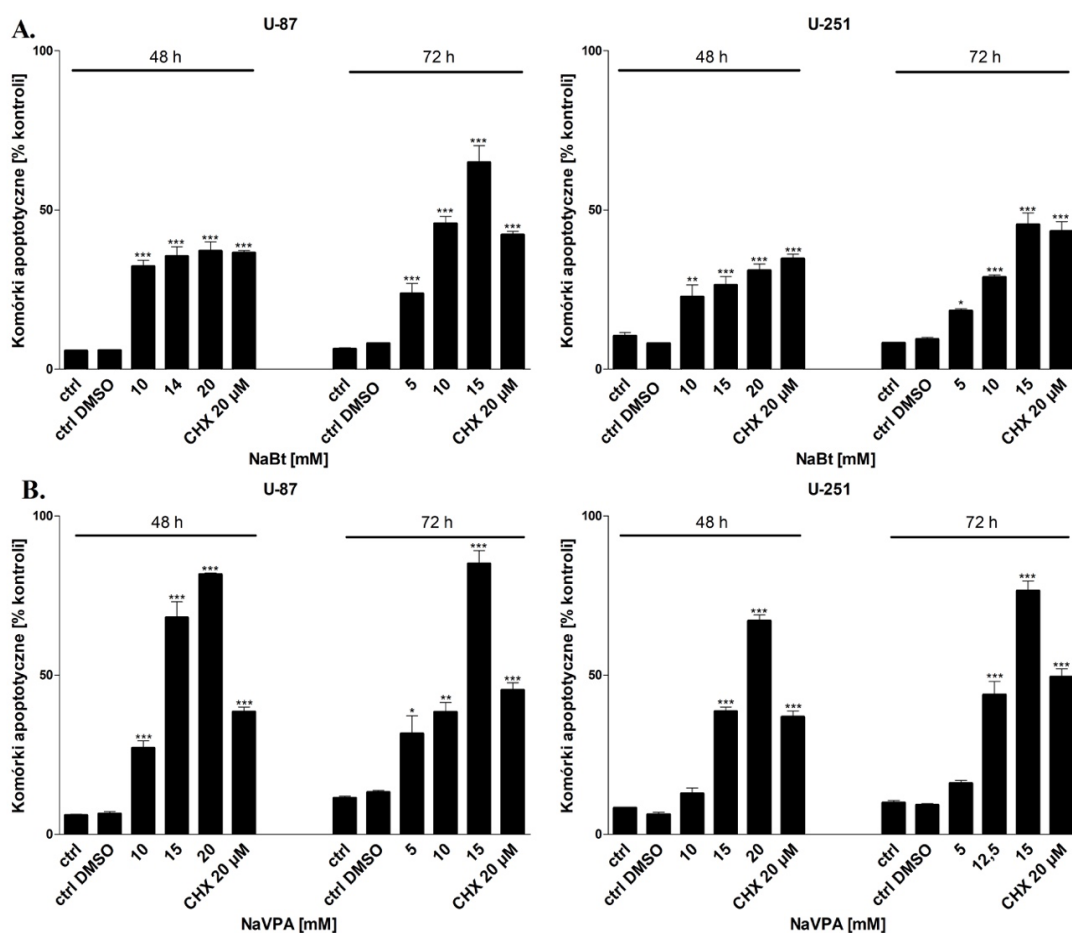


Rysunek 27. Wpływ wzrastających stężeń inhibitorów HDAC **A.** NaBt [5 - 15 mM], **B.** NaVPA [5 - 15 mM] na żywotność komórek linii U-87 oraz U-251 po 72 h inkubacji w warunkach normoksji i warunkach naśladujących hipoksję (DMOG [100 μM] + Rho 123 [0,5 μM]). Istotność statystyczna w odniesieniu do kontroli (ctrl) została oznaczona jako: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Jak wskazują uzyskane wyniki, żywotność komórek obu badanych linii traktowanych NaBt i NaVPA była zbliżona w warunkach naśladujących hipoksję do żywotności komórek traktowanych w warunkach normoksji, co wskazuje, iż aktywność szlaków zależnych od aktywności HDAC jest podobna w obu liniach komórkowych i nie jest ona zależna od nasilenia procesu glikolizy w komórkach GBM.

4.8. NaBt i NaVPA indukują apoptozę komórek GBM linii U-87 i U-251

W celu weryfikacji udziału procesu apoptozy w cytotoksycznym oddziaływaniu NaBt i NaVPA wykonano znakowanie komórek apoptotycznych aneksyną V i zmierzono cytometrycznie odsetek komórek pozytywnych. Jak wskazuje Rysunek 28, zmniejszenie żywotności, proliferacji i natężenia syntezy białek w komórkach U-87 i U-251 korelowało ze wzrostem odsetka komórek apoptotycznych, wybarwionych aneksyną V.

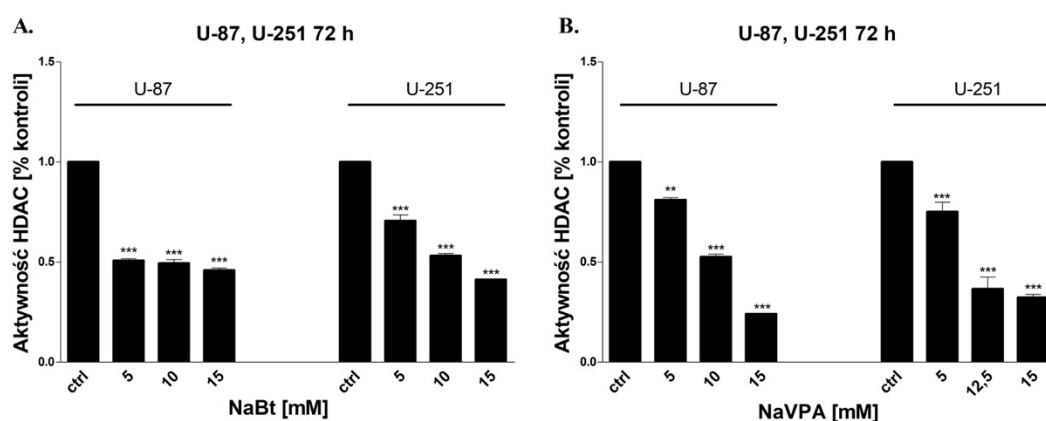


Rysunek 28. Ocena aktywacji apoptozy za pomocą znakowania komórek apoptotycznych aneksyną V. Komórki linii U-87 i U-251 znakowano po 48 i 72 h inkubacji z różnymi stężeniami A. NaBt [5 - 20

mM], **B.** NaVPA [5 - 20 mM]. Jako kontrolę pozytywną w doświadczeniu zastosowano CHX [20 μ M]. Istotność statystyczna w odniesieniu do kontroli (ctrl) została oznaczona jako: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4.9. Ocena aktywności deacetylaz histonów w komórkach GBM linii U-87 i U-251 poddanych działaniu inhibitorów HDAC

W celu potwierdzenia molekularnego mechanizmu działania NaBt i NaVPA oceniono aktywność deacetylaz histonów za pomocą komercyjnie dostępnego testu HDAC Activity Colorimetric Assay Kit. Jak wskazuje Rysunek 29, NaBt [5 - 15 mM] i NaVPA [5 - 15 mM] zależnie od dawki hamowały aktywność deacetylaz histonów w obu badanych liniach komórkowych GBM.

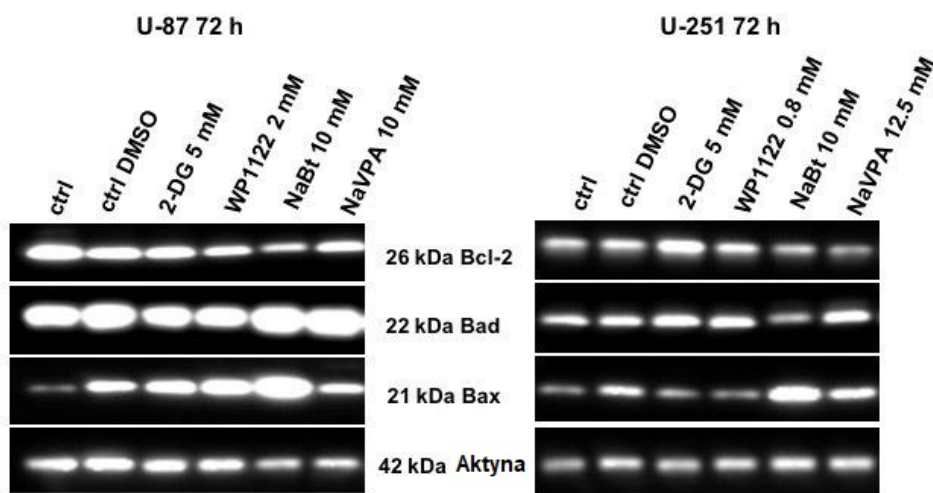


Rysunek 29. Ocena aktywności deacetylaz histonów. Komórki linii U-87 i U-251 poddano 72 h inkuacji z różnymi stężeniami HDAC – **A.** NaBt [5 - 15 mM], **B.** NaVPA [5 - 15 mM]. Istotność statystyczna w odniesieniu do kontroli (ctrl) została oznaczona jako: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Zmiany aktywności deacetylaz histonów mogą modyfikować ekspresję białek pro- i antyapoptotycznych, dlatego aby potwierdzić efektywność zahamowania aktywności HDAC przez NaBt i NaVPA (wartość IC_{50} , 72 h), oznaczono metodą Western blot ekspresję wybranych białek z rodziny Bcl-2: Bcl-2, Bad i Bax.

Jak przedstawiono na Rysunku 30, traktowanie komórek GBM wyznaczonymi eksperymentalnie wartościami IC_{50} - NaBt [10 mM dla linii komórkowej U-87 i U-251 po 72 h inkuacji] oraz NaVPA [10 mM dla linii komórkowej U-87 i 12,5 mM dla linii U-251 po 72 h inkuacji], obniżyło ekspresję antyapoptotycznego białka Bcl-2. Co więcej, w przypadku linii U-87 za-

również traktowanie NaBt, jak i NaVPA powodowało znaczące zwiększenie poziomu proapoptycznych białek Bad i Bax. Analogicznie, w linii U-251 traktowanie NaVPA spowodowało zwiększenie poziomu białek Bad oraz Bax, natomiast po traktowaniu NaBt zaobserwowano jedynie zwiększenie poziomu białka Bax. Co ważne, istotne zmiany ekspresji białek były widoczne po traktowaniu inhibitorami HDAC a nie inhibitorami glikolizy (2-DG, WP1122) co potwierdza specyficzność działania stosowanych inhibitorów.



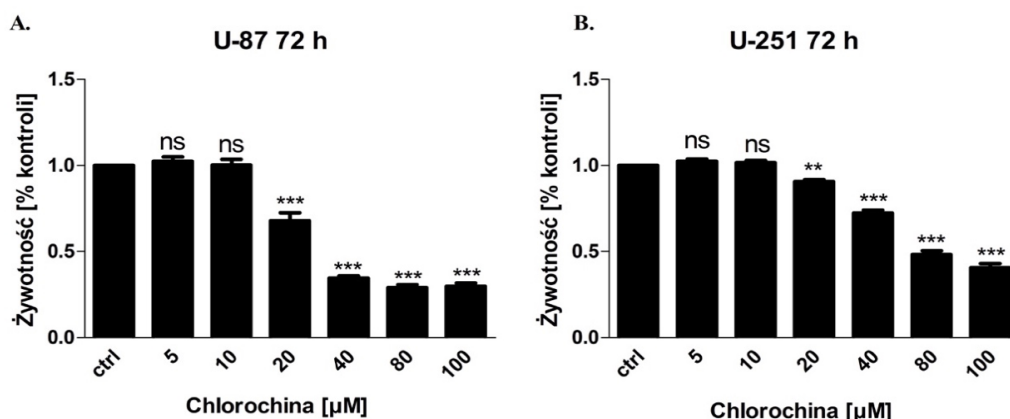
Rysunek 30. Zmiany ekspresji białek z rodziny Bcl-2 (antyapoptycznego Bcl-2 i proapoptycznych Bad i Bax) pod wpływem traktowania komórek GBM stężeniami IC_{50} 2-DG [5 mM], WP1122 [2 mM dla linii U-87 oraz 0,8 mM dla linii U-251], NaBt [10 mM] oraz NaVPA [10 mM dla linii U-87 oraz 12,5 mM dla linii U-251] po 72-godzinnej inkubacji. Jako białko referencyjne oznaczono aktynę.

4.10. Znaczenie procesu autofagii w cytotoksycznym oddziaływaniu inhibitorów glikolizy i deacetylaz histonów w komórkach GBM linii U-87 i U-251

W celu oceny znaczenia procesu autofagii, który w komórkach nowotworowych może pełnić zarówno rolę protekcyjną jak i rolę procesu śmierci komórki, dla efektów oddziaływania badanych inhibitorów glikolizy i HDAC, zastosowano chlorochinę (CQ), powszechnie stosowany w badaniach inhibitor procesu autofagii. CQ hamuje autofagię w końcowej fazie procesu, blokując wiązanie autofagosomu do lizosomu poprzez zwiększanie pH wewnątrz lizosomu i hamowanie aktywności hydrolaz. CQ blokuje tym samym degradację autolizosomów, co z kolei skutkuje nagromadzeniem wakuoli autofagowych i wzrostem ekspresji zlokalizowanego w ich błonie białka MAP-LC3.

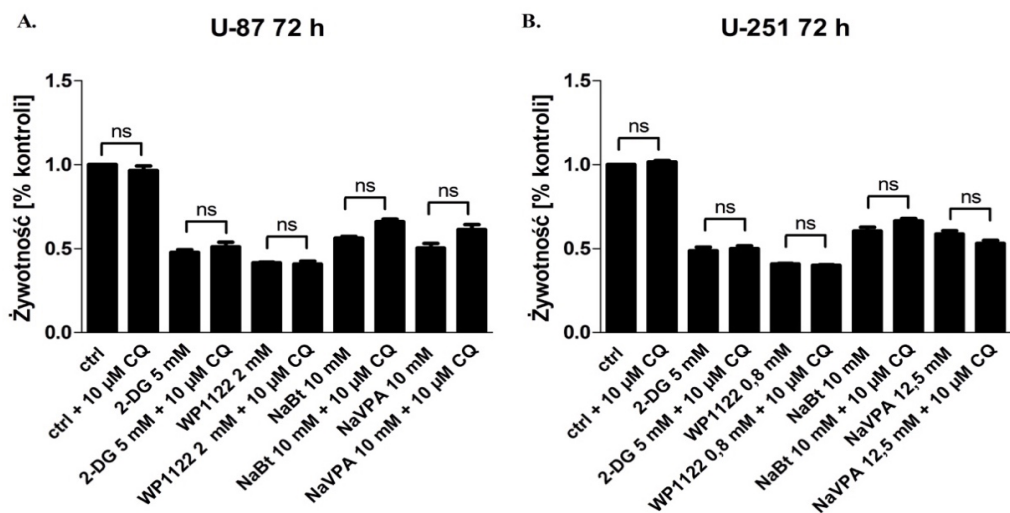
Przed zastosowaniem kombinacji CQ z badanymi substancjami, wykonano analizę dawka-odpowiedź w celu identyfikacji efektywnego stężenia CQ, które nie będzie indukować

efektów cytotoksycznych w badanych komórkach. Jak wskazują wyniki analizy MTS, przedstawione na Rysunku 31, najwyższym nietoksycznym stężeniem CQ było stężenie 10 μM .



Rysunek 31. Wpływ wzrastających stężeń chlorochiny (CQ) [5 - 100 μM] na przeżywalność komórek linii **A.** U-87 oraz **B.** U-251 po 72 h inkubacji. Istotność statystyczna w odniesieniu do kontroli (ctrl) została oznaczona jako: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

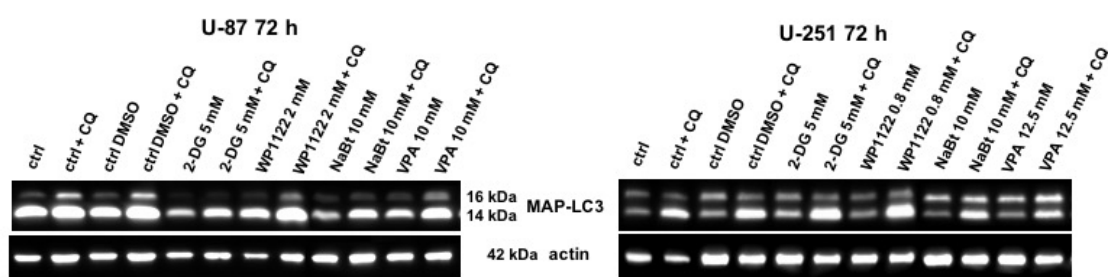
Następnie wykonano analizę oceny żywotności komórek U-87 i U-251 traktowanych inhibitorami glikolizy (2-DG, WP1122) i inhibitorami HDAC (NaBt, NaVPA) w wyznaczonym stężeniu IC_{50} w obecności lub bez CQ [10 μM]. Wyniki analizy MTS ilustruje Rycina 32.



Rysunek 32. Wpływ stężeń IC_{50} : 2-DG [5 mM], WP1122 [U-87 - 2 mM oraz U-251 - 0,8 mM], NaBt [10 mM dla obu linii GBM] oraz NaVPA [U-87 - 10 mM oraz U-251 - 12,5 mM], (72 h) w obecności/bez CQ [10 μM] na żywotność komórek GBM. Istotność statystyczna w odniesieniu do kontroli (ctrl) została oznaczona jako: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Jak wskazują uzyskane wyniki, żywotność komórek U-87 oraz U-251 poddanych działaniu badanych substancji nie była istotnie różna w obecności chlorochiny ($p < 0.05$), co wskazuje na brak istotnej roli autofagii w cytotoksycznym oddziaływaniu badanych związków.

Uzyskane obserwacje zostały następnie potwierdzone z analizą Western blot, za pomocą, której oznaczono poziom białka MAP-LC3 w analogicznych układach badawczych. Jak ilustruje Rysunek 33, traktowania stężeniami IC_{50} badanych związków nie indukowały wzrostu ekspresji białka MAP-LC3 w odniesieniu do komórek kontrolnych. Z kolei obecność CQ w wyznaczonym, nietoksycznym stężeniu 10 μ M, skutkowała akumulacją i wzrostem ekspresji MAP-LC3, co potwierdziło obecność fizjologicznego procesu autofagii w komórkach linii U-87 i U-251.



Rysunek 33. Analiza Western blot poziomu ekspresji białka MAP-LC3 w lizatach komórek U-87 i U-251 traktowanych stężeniami IC_{50} 2-DG [5 mM], WP1122 [U-87 - 2 mM oraz U-251 - 0,8 mM], NaBt [10 mM dla obu linii GBM] oraz NaVPA [U-87 - 10 mM oraz U-251 - 12,5 mM] w obecności/bez CQ [10 μ M]. Jako białko referencyjne oznaczono aktynę.

Przeprowadzone analizy wskazują, iż cytotoksyczne działanie inhibitorów glikolizy i HDAC nie jest zależne od aktywacji szlaku autofagii, gdyż zablokowanie tego procesu nie wpływało protekcyjnie na żywotności badanych komórek traktowanych inhibitorami glikolizy lub HDAC.

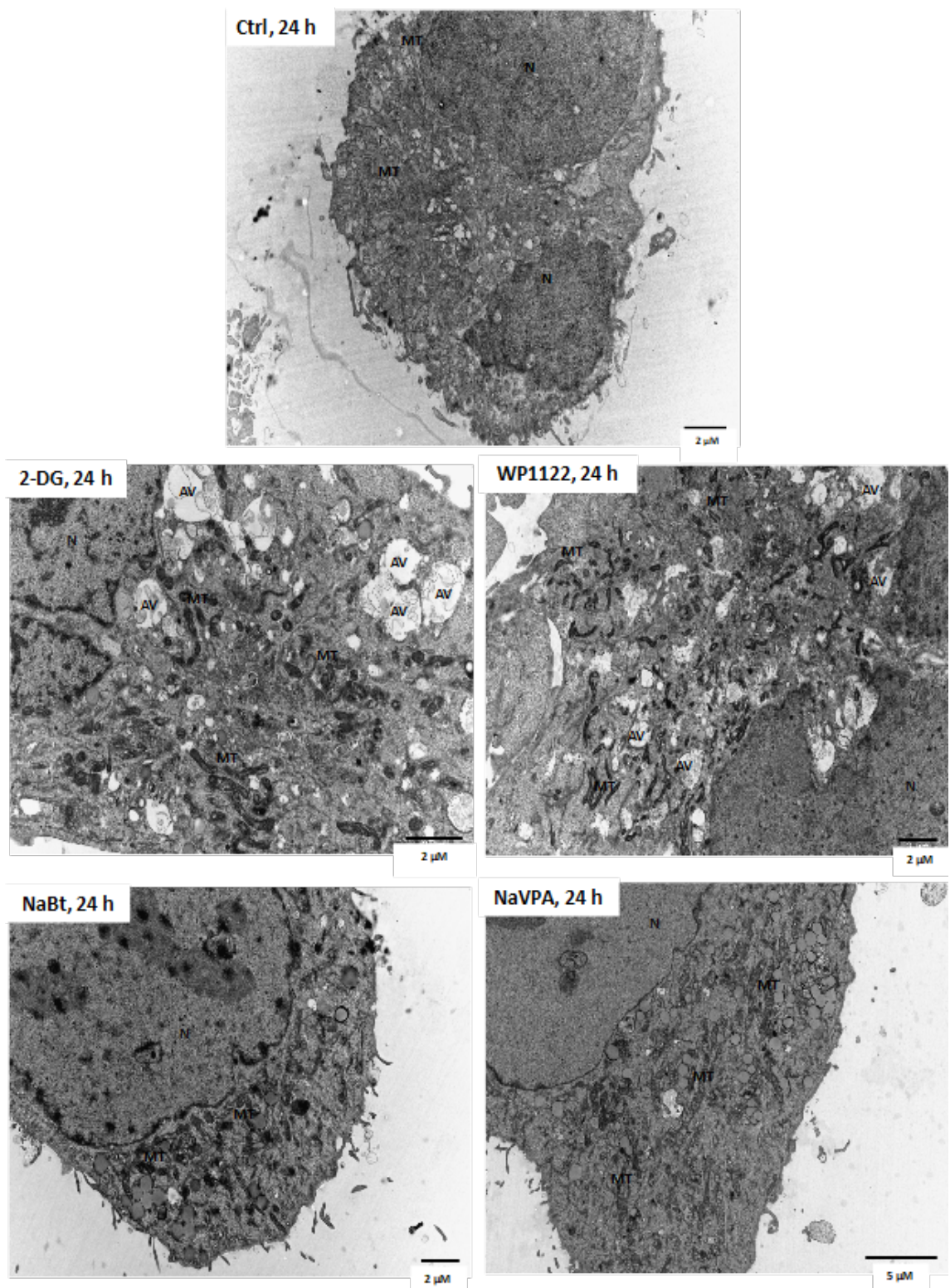
4.11. Ocena ultrastruktury komórek GBM linii U-87 i U-251 poddanych działaniu inhibitorów glikolizy i deacetylaz histonów

W celu oceny zmian morfologicznych komórek linii U-87 i U-251 poddanych działaniu badanych czynników, analizowano ultrastrukturę komórek z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM). Do analiz mikroskopowo-elektronowych komórki traktowano 2-DG [5 mM], WP1122 [2 mM], NaBt [10 mM] oraz NaVPA [10 mM] przez 24 h. Celowo

wybrano krótszy czas inkubacji, aby możliwe było zaobserwowanie zmian w ultrastrukturze komórek przed indukcją procesu apoptozy, który prowadzi do rozpadu komórek i tworzenia ciałek apoptotycznych.

Analiza ultrastruktury komórek linii U-87 uwidoczniła obecność licznych wakuol autofagowych (ang. *autophagic vacuoles*, AV), po traktowaniach 2-DG oraz WP1122, które nie były obserwowane w komórkach traktowanych NaBt i NaVPA [10 mM] (Rysunek 34). Sugeruje to, iż hamowanie glikolizy może we wczesnym etapie (do 24 h) wpływać na pobudzenie procesu autofagii ale późniejsze zmiany zachodzące w komórce, na skutek hamowania glikolizy i niedoboru ATP indukują śmierć komórki niezależną od procesu autofagii.

Ponadto, w obrazie ultrastruktury komórek traktowanych 2-DG oraz WP1122 obserwowano zmienioną morfologię mitochondriów (MT), które ulegały kondensacji i były pozbawione grzebieni mitochondrialnych, widocznych w ultrastrukturze mitochondriów komórek kontrolnych. Obserwacje te wskazują na potrzebę dalszych analiz pozwalających na identyfikację mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za zaburzenia funkcji mitochondriów po traktowaniu komórek GBM inhibitorami glikolizy.



Rysunek 34. Analiza ultrastruktury komórek linii U-87 poddanych działaniu (24 h) stężeniami IC_{50} : 2-DG [5 mM], WP1122 [2 mM], NaBt [10 mM] oraz NaVPA [10 mM]. Na rysunku oznaczono wybrane struktury: jądro komórkowe - N, mitochondria – Mt, wakuole autofagowe - AV.

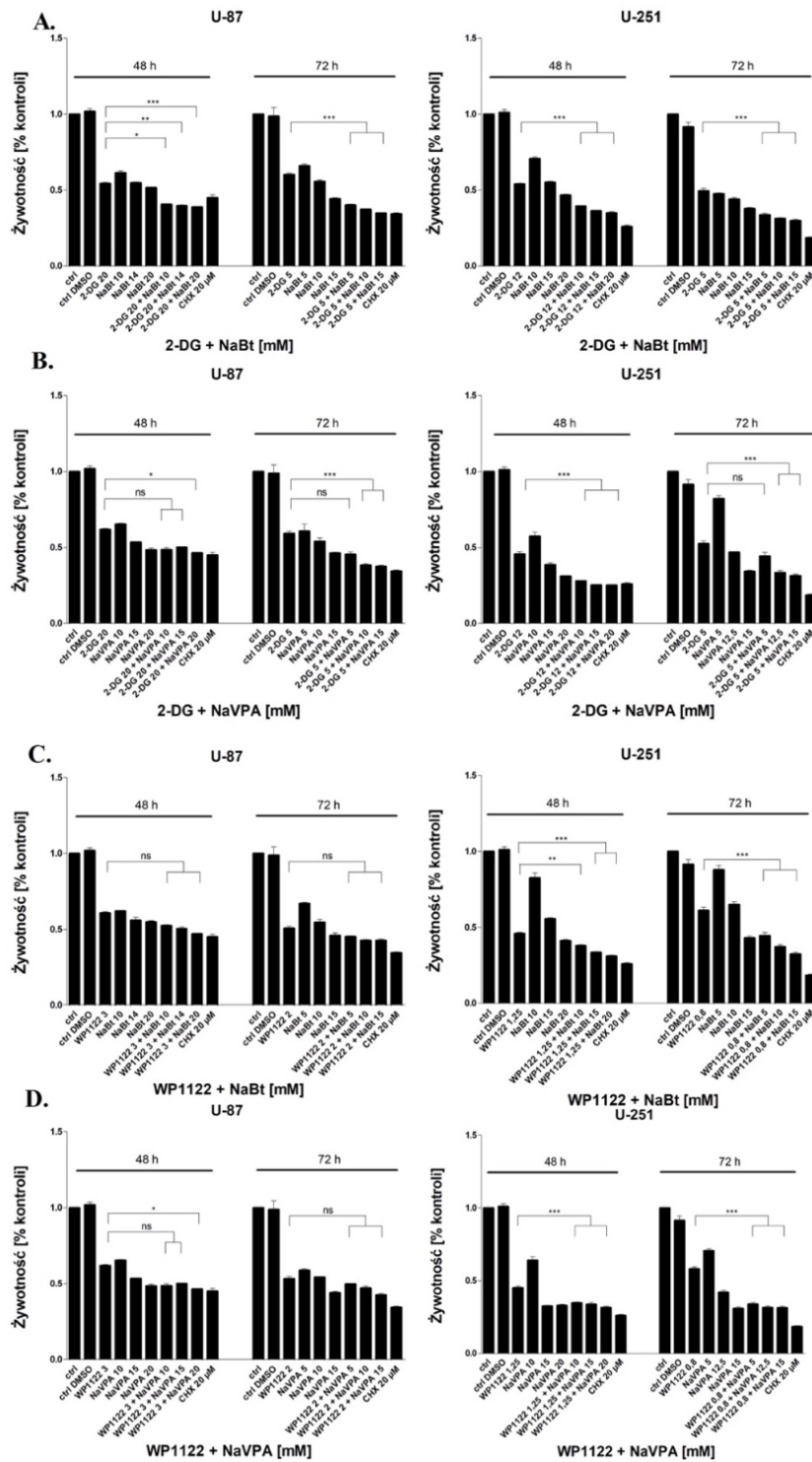
4.12. Efekty cytotoksyczne współdziałania inhibitorów glikolizy i HDAC wobec komórek GBM linii U-87 i U-251

Opisane powyżej wyniki wskazują, iż zahamowanie metabolizmu komórek GBM przez 2-DG, WP1122, jak również modulowanie procesów acetylacji/deacetylacji DNA z zastosowaniem inhibitorów HDAC – NaBt, NaVPA może skutecznie eliminować komórki GBM. Analizując jednak uzyskane wysokie wartości stężeń efektywnych wskazują, iż ich zastosowanie terapeutyczne mogłoby być problematyczne. Dlatego też, w kolejnym etapie pracy zbadano czy skojarzone traktowanie komórek glejaka inhibitorami glikolizy w połączeniu z HDAC może wzmacniać synergistycznie efekty cytotoksyczne i umożliwić obniżenie stosowanych stężeń związków. W celu weryfikacji tej hipotezy, komórki glejaka linii U-87 oraz U-251 poddano działaniu kombinacji stężenia IC_{50} 2-DG [5 - 20 mM] lub WP1122 [0,8 - 3 mM] z NaBt [5 - 20 mM] lub NaVPA [5 - 20 mM] przez 48 lub 72 h.

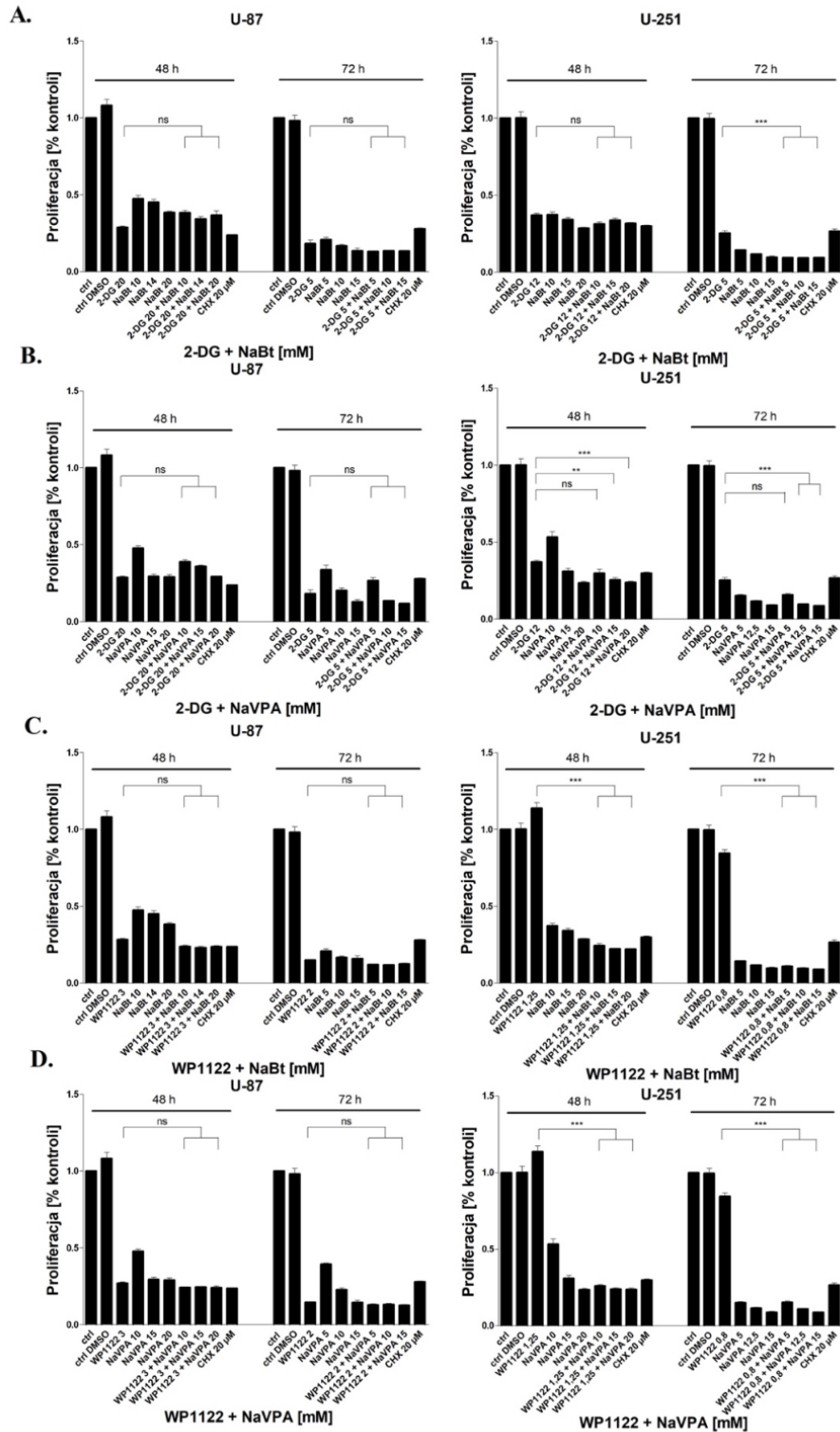
Jak wskazuje Rysunek 35, skojarzone działanie 2-DG z HDAC (NaBt lub NaVPA) indukowało istotnie statystycznie obniżenie żywotności komórek glejaka linii U-87 i U-251 w każdym z badanych kombinacji w porównaniu do 2-DG, zarówno po 48 jak i 72 h inkubacji (Rysunek 35A, 35B). W przypadku WP1122, działanie skojarzone było istotnie bardziej cytotoksyczne w odniesieniu do komórek linii U-251, ale nie U-87 (Rysunek 35C, 35D).

W przypadku zmian proliferacji komórek w analogicznych układach doświadczalnych wykazano, iż tylko skojarzone działanie WP1122 + NaBt lub NaVPA indukowało istotnie statystycznie zmniejszenie proliferacji komórek linii U-251 (Rysunek 36). Z kolei analiza natężenia biosyntezy białka testem z SRB (Rysunek 37) oraz ocena syntezy kwasu mlekowego (Rysunek 38) wykazały, iż połączone oddziaływanie 2-DG lub WP1122 z NaBt lub NaVPA, istotnie pogłębiało hamujące oddziaływania związków podawanych oddzielnie.

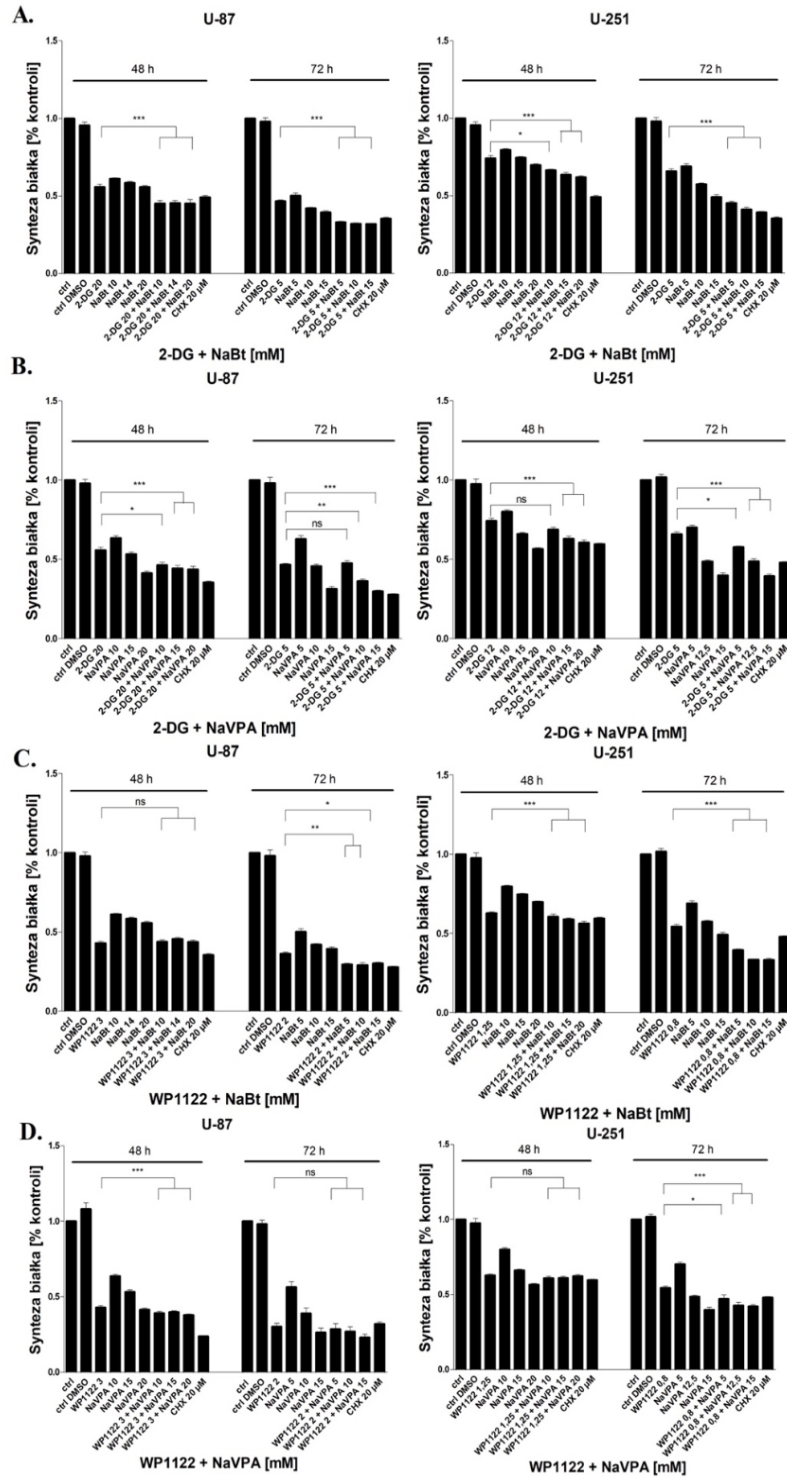
Uzyskane wyniki wskazują, iż jednoczesne modulowanie dwóch kluczowych procesów komórkowych jak proces glikolizy oraz zmian transkrypcji genów pro/antyapoptotycznych poprzez zahamowanie aktywności HDAC, zwiększa potencjał cytotoksyczny obu grup inhibitorów i skuteczniej eliminuje komórki nowotworowe GBM.



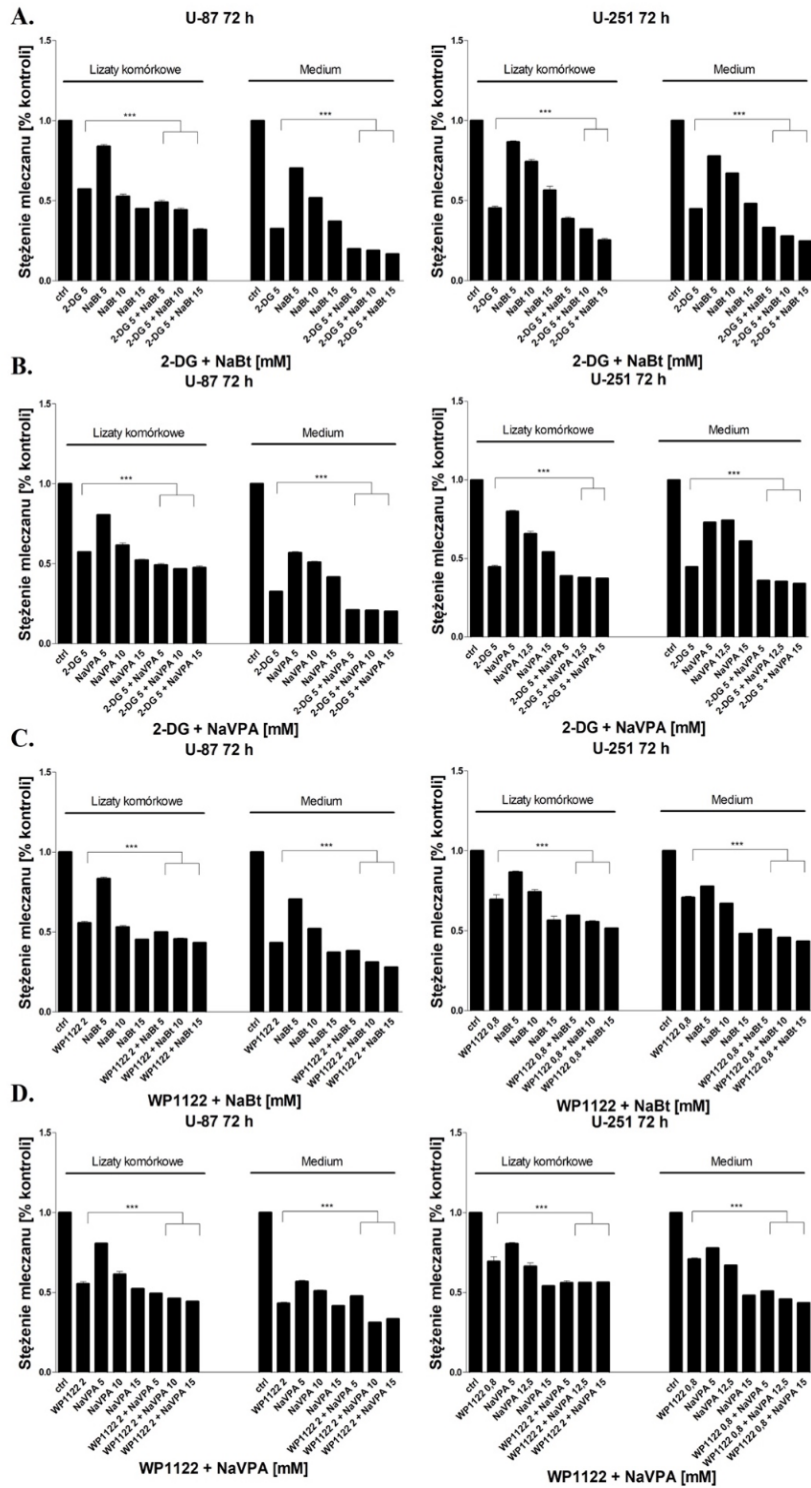
Rysunek 35. Wpływ skojarzonego działania **A.** 2-DG [5-20 mM] + NaBt [5-15 mM], **B.** 2-DG [5-20 mM] + NaVPA [5-20 mM] oraz **C.** WP1122 [0,8-3 mM] + NaBt [5-20 mM] i **D.** WP1122 [0,8-3 mM] + NaVPA [5-20 mM] na żywotność komórek U-87 i U-251 oznaczoną za pomocą testu MTS po 48 i 72 h inkubacji. Istotność statystyczna w odniesieniu do kontroli (ctrl) została oznaczona jako: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.



Rysunek 36. Wpływ skojarzonego działania **A.** 2-DG [5-20 mM] + NaBt [5-20 mM], **B.** 2-DG [5-20 mM] + NaVPA [5-20 mM] oraz **C.** WP1122 [0,8-3 mM] + NaBt [5-20 mM] i **D.** WP1122 [0,8-3 mM] + NaVPA [5-20 mM] na proliferację komórek U-87 i U-251 oznaczoną za pomocą testu z BrdU po 48 i 72 h inkubacji. Istotność statystyczna w odniesieniu do kontroli (ctrl) została oznaczona jako: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.



Rysunek 37. Wpływ skojarzonego działania **A.** 2-DG [5-20 mM] + NaBt [5-20 mM], **B.** 2-DG [5-20 mM] + NaVPA [5-20 mM] oraz **C.** WP1122 [0,8-3 mM] + NaBt [5-20 mM] i **D.** WP1122 [0,8-3 mM] + NaVPA [5-20 mM] na syntezę białka (barwienie SRB) w komórkach U-87 i U-251 oznaczoną za pomocą testu z SRB po 48 i 72 h inkubacji. Istotność statystyczna w odniesieniu do kontroli (ctrl) została oznaczona jako: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.



Rysunek 38. Wpływ skojarzonego działania **A.** 2-DG [5-20 mM] + NaBt [5-20 mM], **B.** 2-DG [5-20 mM] + NaVPA [5-20 mM] oraz **C.** WP1122 [0,8-3 mM] + NaBt [5-20 mM] i **D.** WP1122 [0,8-3 mM] + NaVPA [5-20 mM] na syntezę kwasu mlekowego w lizatach komórkowych oraz kwasu mlekowego wydzielonego do medium linii U-87 i U-251 po 72 h inkubacji. Istotność statystyczna w odniesieniu do kontroli (ctrl) została oznaczona jako: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4.13. Identyfikacja mechanizmów współdziałania inhibitorów glikolizy i HDAC wobec komórek GBM linii U-87 i U-251

Do oceny mechanizmu interakcji pomiędzy inhibitorami glikolizy i inhibitorami HDAC zastosowano metodę efektu mediany - metoda Chou-Talalay. W doświadczeniu oceniono żywotność komórek GBM (test MTS) po traktowaniu różnymi kombinacjami 2-DG lub WP1122 z NaBt lub NaVPA (1:10, 1:5, 1:2.5, 1:1.25). Na podstawie wyników żywotności komórek w badanych kombinacjach obliczono tzw. indeks kombinacji (ang. *Combination Index*, CI), który określa rodzaj interakcji pomiędzy związkami, gdzie $CI > 10$ oznacza bardzo silny antagonizm, $CI 3,31-10$ silny antagonizm, $CI 1,46-3,30$ antagonizm, $CI 1,25-1,45$ umiarkowany antagonizm, $CI 1,11-1,20$ nieznaczny antagonizm, $CI 0,91-1,10$ prawie addytywny, $CI 0,86-0,9$ niewielką synergiją, $CI 0,71-0,85$ umiarkowaną synergiją, $CI 0,31-0,7$ synergiją, $CI 0,1-0,3$ silną synergiją, $CI < 0,1$ bardzo silną synergiją. Wyniki przeanalizowano za pomocą programu CompuSyn w wersji 1,0 (ComboSyn, Inc., Paramus, NJ. 07652 USA). Program CompuSyn poza wyznaczaniem CI pozwala także określić wartości dla pojedynczych związków oraz ich kombinacji m.in. tj.: D_m – średnia skuteczna dawka, wartość IC_{50} , medialne stężenie inhibitora hamujące w 50% funkcje biologiczne i biochemiczne komórek; m – określa nachylenie wykresu, kształt krzywej dawka-odpowiedź, $m=1$, $m>1$ oraz $m<1$ oznaczają odpowiednio kształt hiperboliczny, sigmoidalny oraz płaski sigmoidalny; r – współczynnik korelacji Parsona, który przyjmuje zawsze wartość z przedziału -1 do 1, znak tego współczynnika informuje o kierunku korelacji (liniowa ujemna lub liniowa dodatnia). W terapii skojarzonej najbardziej pożądanym rodzajem współdziałania cytostatyków jest synergia, która pozwala na osiągnięcie istotnie wyższych efektów cytotoksycznych niż w monoterapii z jednoczesną redukcją stężenia efektywnego.

Uzyskane wyniki dla komórek linii U-87 przedstawiono w Tabeli VIII, natomiast dla komórek linii U-251 w Tabeli VIX. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że połączenie 2-DG z NaBt/NaVPA oraz WP1122 z NaBt/NaVPA w większości badanych proporcji stężeń wywierały różne efekty synergistyczne, od silnej synergii do umiarkowanej synergii, także w zakresach wysokich stężeń obu związków.

Uzyskane wyniki są obiecujące i wskazują, iż terapia kombinowana oparta na połączeniu inhibitorów glikolizy z inhibitorami HDAC synergistycznie eliminuje komórki glejaka i może stanowić kierunek rozwoju kandydatów na leki w tym wskazaniu.

Tabela VIII. Podsumowanie wyników interakcji inhibitorów glikolizy z inhibitorami HDAC uzyskanych za pomocą metody ChouTalalay dla linii komórkowej U-87. D_m – średnia skuteczna dawka, wartość IC_{50} , medialne stężenie inhibitora hamujące w 50% funkcje biologiczne i biochemiczne komórek; m – określa nachylenie wykresu, kształt krzywej dawka-odpowiedź, $m=1$, $m>1$ oraz $m<1$ oznaczają odpowiednio kształt hiperboliczny, sigmoidalny oraz płaski sigmoidalny; r – współczynnik korelacji Parsona, który przyjmuje zawsze wartość z przedziału -1 do 1, znak tego współczynnika informuje o kierunku korelacji (liniowa ujemna lub liniowa dodatnia). Czcionką w kolorze czerwonym zaznaczono CI świadczący o synergistycznym efekcie oddziaływania.

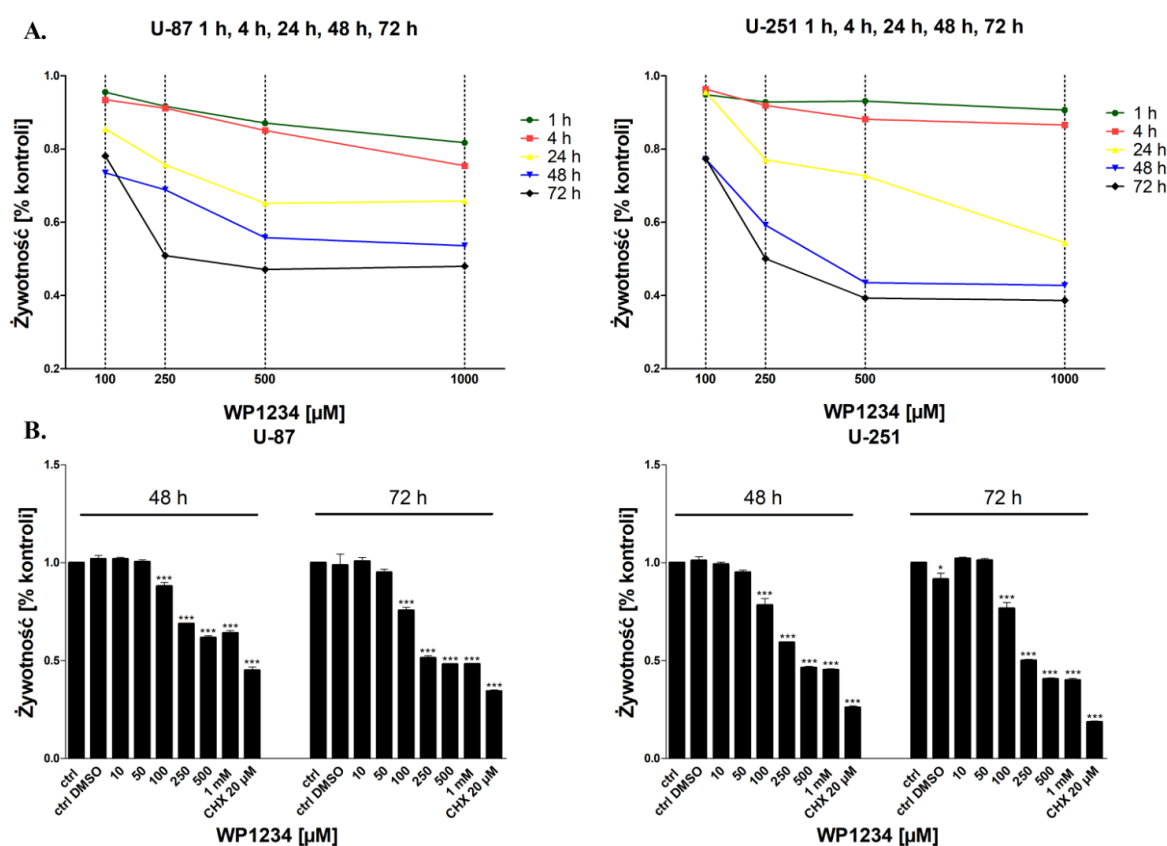
U-87					
Związek	Wartości CI				
	ED50	ED75	ED90	D_m	m
2-DG	N/A	N/A	N/A	4.31745	0.13395
NaBt	N/A	N/A	N/A	13.0742	0.45416
1:10	0.44244	3.54226	44.3666	4.05314	0.22201
1:5	0.62521	1.38854	6.55277	4.58400	0.27644
1:2.5	0.71368	0.48536	1.06754	3.98309	0.34180
1:1.25	0.78643	0.11706	0.09421	3.32910	0.49583
2-DG	N/A	N/A	N/A	6.31745	0.13534
NaVPA	N/A	N/A	N/A	13.57460	0.50279
1:10	0.34406	0.83120	2.58105	0.73077	0.33102
1:5	0.42282	0.19718	0.14435	1.46837	0.55010
1:2.5	0.37585	0.10679	0.06482	1.91260	0.55763
1:1.25	0.30591	0.10704	0.12205	2.02862	0.47307
WP1122	N/A	N/A	N/A	1.56980	1.98577
NaBt	N/A	N/A	N/A	10.4409	1.31452
1:10	0.58830	0.90167	1.40944	4.86748	0.98316
1:5	0.49502	0.82458	1.39631	3.02069	0.95186
1:2.5	0.59164	1.15578	2.28347	2.55599	0.86037
1:1.25	0.57762	1.16627	2.37075	1.79611	0.85444
WP1122	N/A	N/A	N/A	2.13384	1.43627
NaVPA	N/A	N/A	N/A	10.3325	0.46238
1:10	0.53352	3.40941	36.2360	4.08551	0.32364
1:5	0.53974	0.69884	1.31619	3.39975	0.71103
1:2.5	0.45132	0.72349	1.47499	2.22295	0.70652
1:1.25	0.51130	0.76044	1.30008	1.95115	0.81912

Tabela XIX. Podsumowanie wyników interakcji inhibitorów glikolizy z inhibitorami HDAC uzyskanych za pomocą metody ChouTalalay dla linii komórkowej U-251. D_m – średnia skuteczna dawka, wartość IC_{50} , medialne stężenie inhibitora hamujące w 50% funkcje biologiczne i biochemiczne komórek; m – określa nachylenie wykresu, kształt krzywej dawka-odpowiedź, $m=1$, $m>1$ oraz $m<1$ oznaczają odpowiednio kształt hiperboliczny, sigmoidalny oraz płaski sigmoidalny; r – współczynnik korelacji Parsona, który przyjmuje zawsze wartość z przedziału -1 do 1, znak tego współczynnika informuje o kierunku korelacji (liniowa ujemna lub liniowa dodatnia). Czcionką w kolorze czerwonym zaznaczono CI świadczący o synergistycznym efekcie oddziaływania.

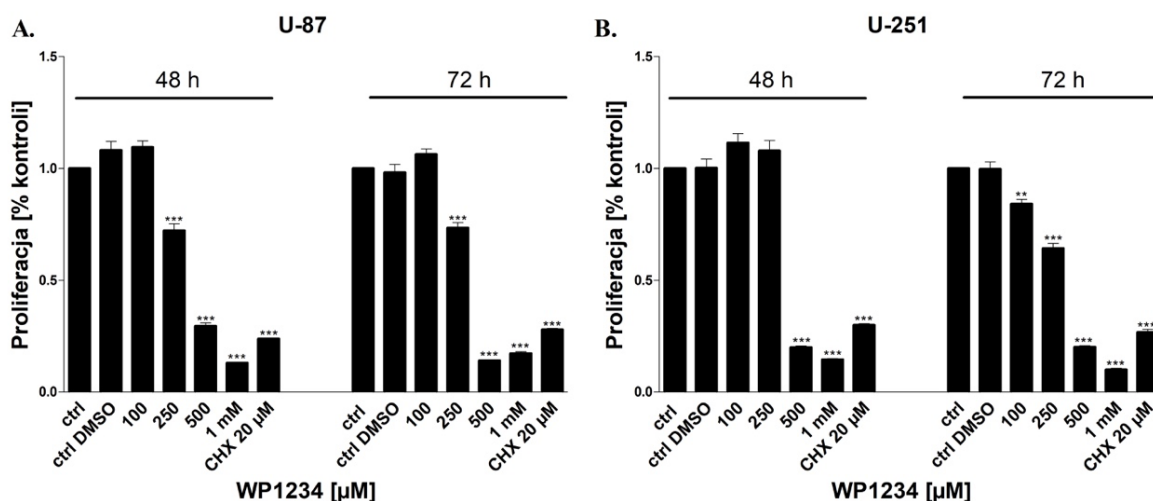
U-251					
Związek	Wartości CI				
	ED50	ED75	ED90	Dm	m
2-DG	N/A	N/A	N/A	6.81406	0.17952
NaBt	N/A	N/A	N/A	13.7716	0.52007
1:10	0.49112	0.43252	0.48777	0.96401	0.76701
1:5	0.47041	0.23307	0.17996	1.51037	1.04050
1:2.5	0.43976	0.21561	0.22270	2.06991	0.81296
1:1.25	0.40552	0.14957	0.17502	2.48856	0.73963
2-DG	N/A	N/A	N/A	5.73824	0.25737
NaVPA	N/A	N/A	N/A	11.8238	1.16732
1:10	0.92220	0.55663	0.47719	9.5427	1.36784
1:5	0.78921	0.34107	0.26731	7.1290	1.50646
1:2.5	0.71946	0.21743	0.16601	4.41457	1.49708
1:1.25	0.77658	0.17326	0.14310	3.91104	1.26125
WP1122	N/A	N/A	N/A	2.30484	0.49654
NaBt	N/A	N/A	N/A	10.0066	0.99120
1:10	0.66720	1.37522	3.60890	6.27063	0.49949
1:5	0.72596	0.48179	0.41053	5.67853	0.93625
1:2.5	0.63307	0.45967	0.44565	3.69004	0.75866
1:1.25	0.61516	0.33340	0.23728	2.67632	0.83308
WP1122	N/A	N/A	N/A	2.90504	0.76728
NaVPA	N/A	N/A	N/A	10.5045	1.42375
1:10	0.98198	1.11483	1.37766	6.9841	0.97950
1:5	0.96174	0.75293	0.65443	5.81234	1.27841
1:2.5	0.48645	0.24450	0.13629	3.65242	2.09230
1:1.25	0.69116	0.67945	0.72531	3.83795	0.85622

4.14. WP1234 wywierają cytotoksyczny wpływ na komórki GBM linii U-87 oraz U-251

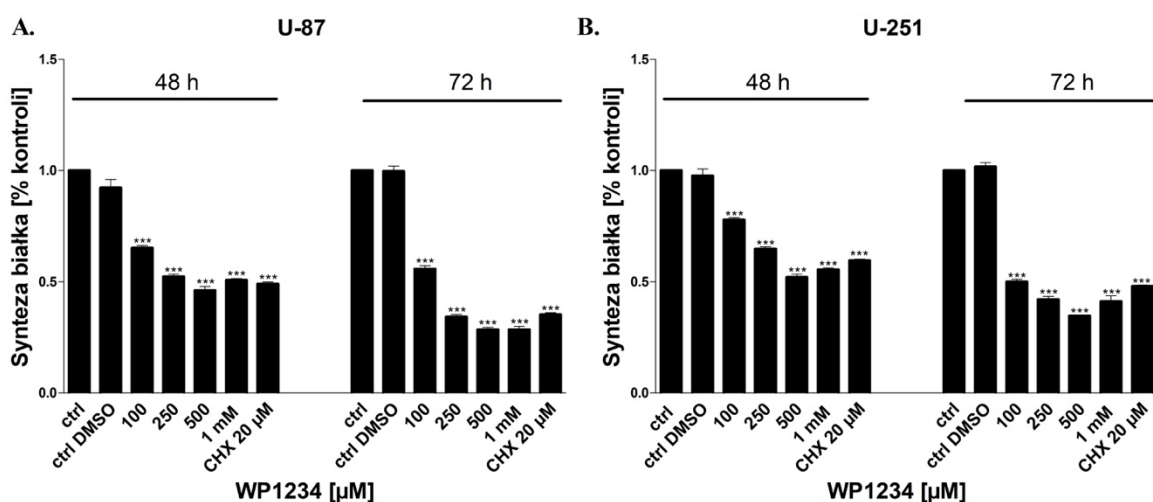
WP1234 jest pochodną 2-DG, która w swojej strukturze zawiera resztę etylomaślanu. Wewnątrz komórki, WP1234 ulega metabolizmowi uwalniając aktywną biologicznie 2-DG, hamującą proces glikolizy oraz resztę etylomaślanu, który może hamować aktywność HDAC. Analizy oddziaływania WP1234 wobec komórek GBM linii U-87 oraz U-251 wykazały, że WP1234 zależnie od dawki i czasu wywiera efekt cytotoksyczny, potwierdzony oceną żywotności komórek testem MTS (Rysunek 39), proliferacji testem z BrdU (Rysunek 40) jak również oceną biosyntezy białka z wykorzystaniem SRB (Rysunek 41). Kontrolą pozytywną w eksperymentach był inhibitor syntezy białek - cykloheksymid (CHX) [20 μ M].



Rysunek 39. Wpływ wzrastających stężeń WP1234 [100 μ M - 1 mM] na żywotność (test MTS) komórek linii U-87 oraz U-251 po inkubacji 1, 4, 24, 48 i 72 – godzinnej (A) oraz po 48 i 72 h [100 μ M - 1 mM] (B). Jako kontrolę pozytywną w doświadczeniu zastosowano CHX [20 μ M]. Istotność statystyczna w odniesieniu do kontroli (ctrl) została oznaczona jako: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.



Rysunek 40. Wpływ wzrastających stężeń WP1234 [100 μM - 1 mM] na proliferację (test BrdU) komórek linii U-87 (A) oraz U-251 (B) po 48 i 72 h inkubacji z badanym związkiem. Jako kontrolę pozytywną w doświadczeniu zastosowano CHX [20 μM]. Istotność statystyczna w odniesieniu do kontroli (ctrl) została oznaczona jako: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.



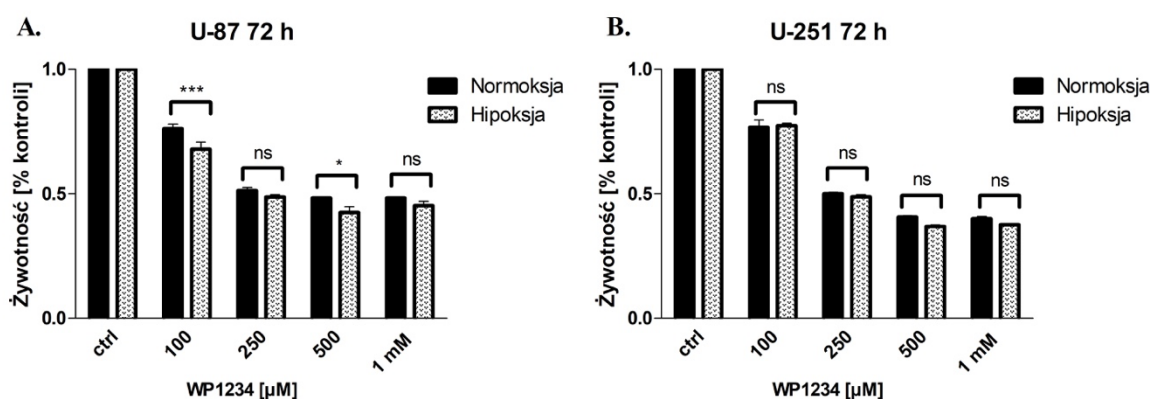
Rysunek 41. Wpływ wzrastających stężeń WP1234 [100 μM - 1 mM] na biosyntezę białka (barwienie SRB) komórek linii U-87 (A) oraz U-251 (B) po 48 i 72 h inkubacji z badanym związkiem. Jako kontrolę pozytywną w doświadczeniu zastosowano CHX [20 μM]. Istotność statystyczna w odniesieniu do kontroli (ctrl) została oznaczona jako: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Na podstawie oceny żywotności komórek testem MTS, wyznaczono wartości IC_{50} WP1234. Wartości IC_{50} wynosiły odpowiednio: dla komórek linii U-87: 750 μM (48 h) i 500 μM (72 h), dla komórek linii U-251 – 500 μM (48 h) oraz 250 (72 h) (Tabela X).

Tabela X. Wyznaczone wartości IC_{50} pochodnej WP1234 dla linii komórkowych U-87 oraz U-251 po 48 i 72 h inkubacji.

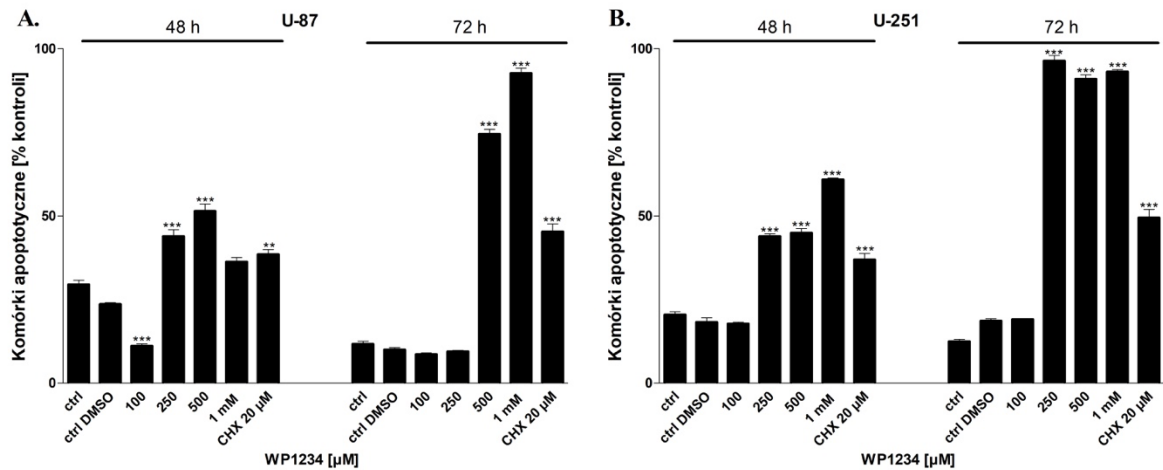
IC_{50} WP1234	U-87 [μ M]	U-251 [μ M]
48 h	750	500
72 h	500	250

Analogicznie do opisanych uprzednio analiz 2-DG, WP1122, NaBt oraz NaVPA, oceniono wpływ warunków naśladujących hipoksję na efekty oddziaływania WP1234. Podobnie jak dla analizowanych powyżej związków, także cytotoksyczne oddziaływanie WP1234 w warunkach naśladujących niedotlenienie nie różniło się istotnie od parametrów żywotności oznaczanych w warunkach normoksji (Rysunek 42).



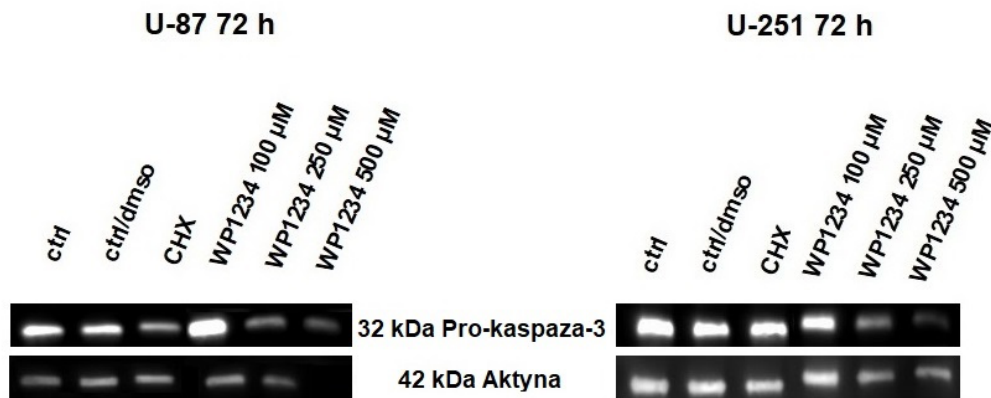
Rysunek 42. Wpływ wzrastających stężeń WP1234 [100 μ M - 1 mM] na przeżywalność (test MTS) komórek linii U-87 (A) oraz U-251 (B) po 72 h inkubacji z badanym związkiem w warunkach normoksji i warunkach naśladujących hipoksję (DMOG [100 μ M] + Rho 123 [0,5 μ M]). Istotność statystyczna w odniesieniu do kontroli (ctrl) została oznaczona jako: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

W celu weryfikacji udziału procesu apoptozy w cytotoksycznym oddziaływaniu WP1234 wykonano znakowanie komórek apoptotycznych aneksyną V i zmierzono cytometrycznie odsetek komórek pozytywnych. Jak wskazuje Rysunek 43, zmniejszenie żywotności, proliferacji, natężenia syntezy białek oraz syntezy ATP w komórkach U-87 i U-251 korelowało ze wzrostem odsetka komórek apoptotycznych wybarwionych aneksyną V.



Rysunek 43. Znakowanie komórek apoptotycznych aneksyną V. Komórki linii U-87 (A) i U-251 (B) znakowano po 48 i 72 h inkubacji z różnymi stężeniami WP1234 [100 μM - 1 mM]. Jako kontrolę pozytywną w doświadczeniu zastosowano CHX [20 μM]. Istotność statystyczna w odniesieniu do kontroli (ctrl) została oznaczona jako: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

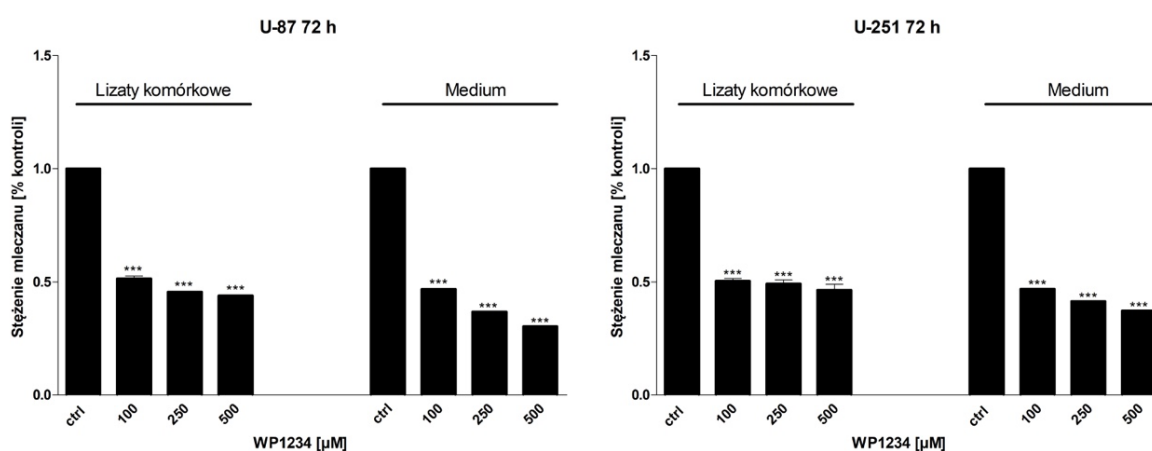
Indukcję procesu apoptozy potwierdzono dodatkowo analizą ekspresji prekursorowej (nieaktywnej) formy kaspazy 3, która jest wykonawczą kaspazą w przebiegu procesu apoptozy. Jak wskazuje Rysunek 44, traktowanie komórek linii U-87 i U-251 kolejnymi stężeniami WP1234 [100 – 500 μM], indukowało zależne od dawki zmniejszenie poziomu prokaspazy 3, które oznacza jej aktywację i przebieg procesu apoptozy.



Rysunek 44. Zmiany ekspresji białka pro-kaspazy-3 pod wpływem traktowania komórek GBM wzrastającymi stężeniami WP1234 [100 - 500 μM] po 72 h inkubacji. Jako białko referencyjne oznaczono aktynę.

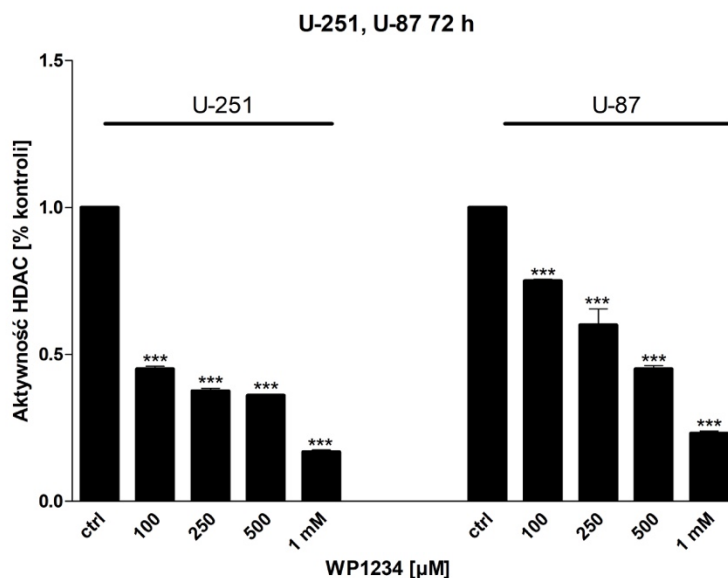
4.15. Dwutorowe oddziaływanie WP1234 na komórki GBM - WP1234 łączy właściwości inhibitorów glikolizy z inhibitorami deacetylaz histonów

W celu weryfikacji hipotezy o dwutorowym oddziaływaniu WP1234, wykonano oznaczenie stężenia kwasu mlekowego w lizatach komórkowych oraz kwasu mlekowego wydzielonego do medium hodowlanego po 72 h inkubacji z WP1234 [100 - 500 μM] (Lactate Assay Kit), jako markera natężenia procesu glikolizy w komórkach. Wykonana analiza potwierdziła, iż WP1234 zależnie od dawki hamuje syntezę kwasu mlekowego w odniesieniu do kontroli (Rysunek 45), co potwierdza zdolność WP1234 do hamowania procesu glikolizy w komórkach linii U-87 i U-251.



Rysunek 45. Wpływ wzrastających stężeń inhibitorów WP1234 [100 - 500 μM] na stężenie wytworzonego kwasu mlekowego w lizatach komórkowych i kwasu mlekowego wydzielonego do medium linii U-87 oraz U-251 po 72 h inkubacji. Istotność statystyczna w odniesieniu do kontroli (ctrl) została oznaczona jako: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

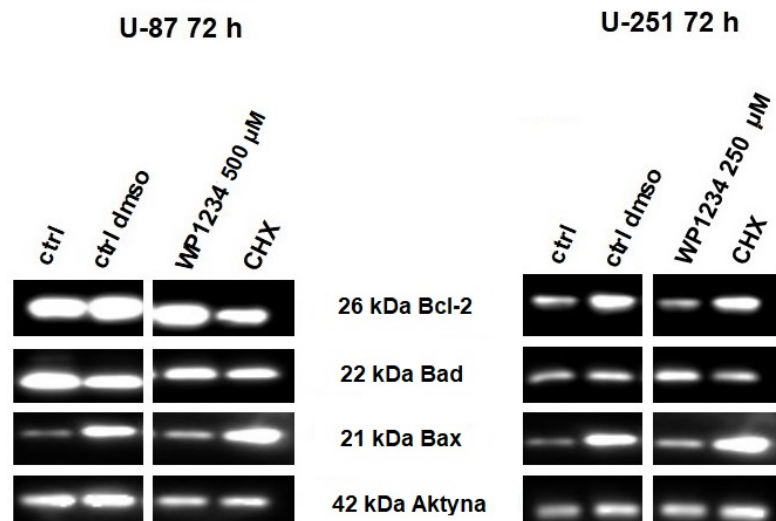
Następnie, w celu weryfikacji zdolności WP1234 do modulowania aktywności deacetylaz histonów oceniono aktywność HDAC w lizatach komórek U-87 i U-251 traktowanych WP1234 [100 μM - 1 mM] przez 72 h. Jak wskazuje Rysunek 46, WP1234 zależnie od dawki hamował aktywność deacetylaz histonów w obu badanych liniach komórkowych GBM.



Rysunek 46. Ocena aktywności deacetylaz histonów. Komórki linii U-87 i U-251 poddano 72 h inkubacji z różnymi stężeniami WP1234 [100 μM - 1 mM]. Istotność statystyczna w odniesieniu do kontroli (ctrl) została oznaczona jako: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Zmiany aktywności deacetylaz histonów mogą modyfikować ekspresję białek pro- i antyapoptotycznych, dlatego aby potwierdzić efektywność zahamowania aktywności HDAC przez WP1234 (wartość IC_{50} , 72 h), oznaczono metodą Western blot ekspresję wybranych białek z rodziny Bcl-2: Bcl-2, Bad i Bax.

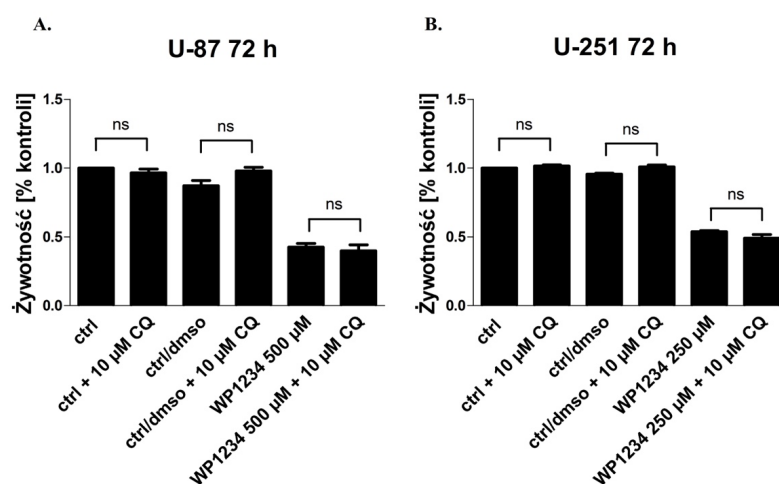
Jak przedstawiono na Rysunku 47, traktowanie komórek GBM wyznaczonymi eksperymentalnie wartościami IC_{50} WP1234 [U-87 - 500 μM i U-251 - 250 μM po 72 h inkubacji] obniżyło ekspresję antyapoptotycznego białka Bcl-2 w komórkach linii U-251. Ponadto w linii U-251 traktowanie WP1234 spowodowało zwiększenie poziomu białka Bad i Bax. Z kolei w linii U-87 traktowanie WP1234 indukowało nieznaczne zwiększenie poziomu białka Bax przy czym zmniejszenie poziomu Bad, jednak zmiany te nie były istotne.



Rysunek 47. Zmiany ekspresji białek z rodziny Bcl-2 (antyapoptotycznego Bcl-2 i proapoptotycznych Bad i Bax) pod wpływem taktowania komórek GBM stężeniami IC_{50} WP1234 [U-87 – 500 μ M i U-251 – 250 μ M] po 72-godzinnej inkubacji. Jako białko referencyjne oznaczono aktynę.

4.16. Znaczenie procesu autofagii w cytotoksycznym oddziaływaniu WP1234 w komórkach GBM linii U-87 i U-251

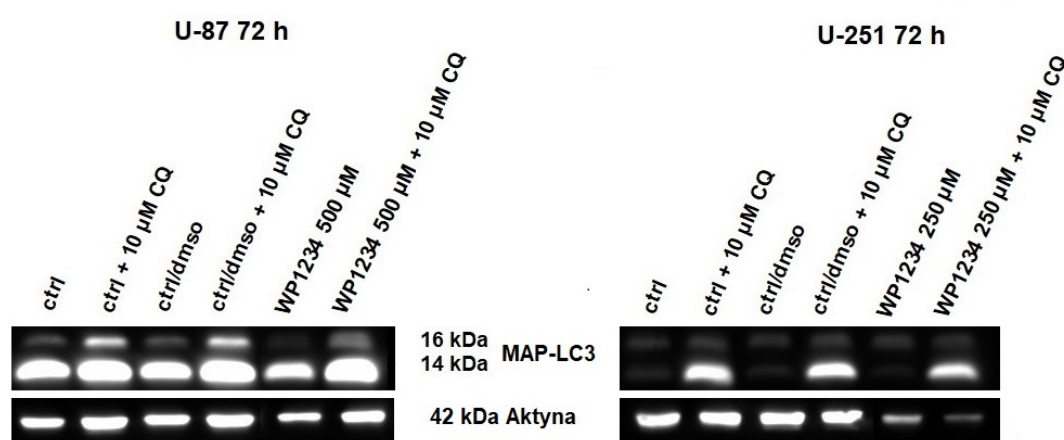
W celu oceny znaczenia procesu autofagii, wykonano analizę oceny żywotności komórek U-87 i U-251 traktowanych WP1234 w wyznaczonym stężeniu IC_{50} [500 μ M dla U-87 i 250 μ M dla U-251] w obecności lub bez CQ [10 μ M]. Wyniki analizy MTS ilustruje Rycina 48.



Rysunek 48. Wpływ stężeń IC_{50} WP1234 [500 μ M dla U-87 (A) i 250 μ M dla U-251 (B)] (po 72 h) w obecności/bez CQ [10 μ M] na żywotność komórek GBM. Istotność statystyczna w odniesieniu do kontroli (ctrl) została oznaczona jako: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Analogicznie do wcześniej uzyskanych obserwacji, żywotność komórek U-87 oraz U-251 poddanych działaniu WP1234 nie była istotnie różna w obecności chlorochiny ($p < 0.05$), co wskazuje na brak istotnej roli autofagii w cytotoksycznym oddziaływaniu WP1234.

Uzyskane obserwacje zostały następnie potwierdzone analizą Western blot, za pomocą, której oznaczono poziom ekspresji białka MAP-LC3 w analogicznych układach badawczych. Jak ilustruje Rysunek 49, traktowanie stężeniem IC_{50} WP1234 nie indukowało wzrostu ekspresji białka MAP-LC3 w odniesieniu do komórek kontrolnych. Z kolei obecność CQ w wyznaczonym, nietoksycznym stężeniu 10 μ M, skutkowała akumulacją i wzrostem ekspresji MAP-LC3, co potwierdziło obecność fizjologicznego procesu autofagii w komórkach linii U-87 i U-251.



Rysunek 49. Wpływ taktowania komórek GBM za pomocą WP1234 [500 μ M dla U-87 i 250 μ M dla U-251] (po 72 h) z/bez CQ na ekspresję markera autofagii – białka MAP-LC3. Zdjęcie prezentuje wyniki analizy Western Blot. Jako białko odniesienia użyto aktyne.

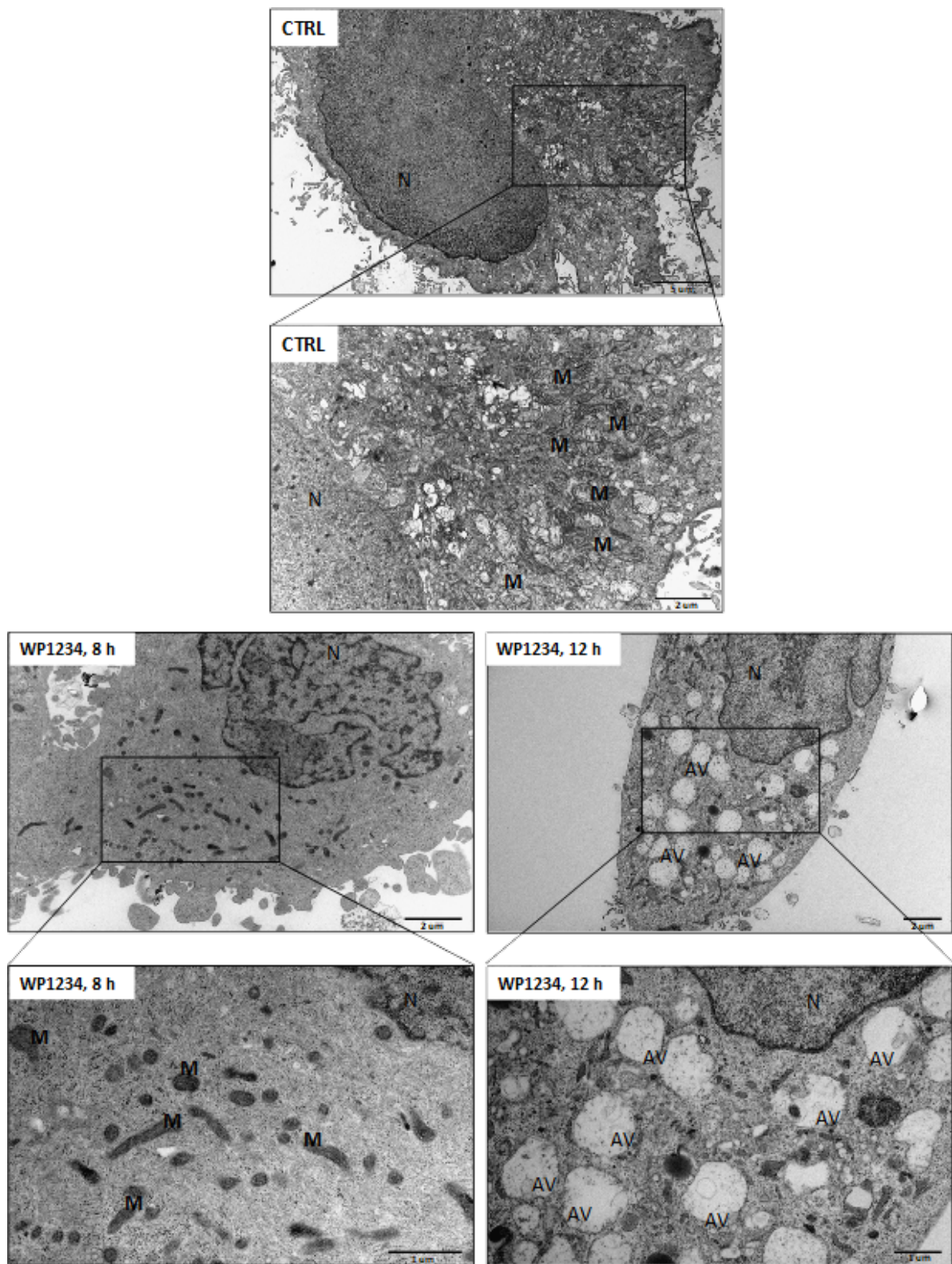
4.17. Ocena ultrastruktury komórek GBM linii U-87 i U-251 poddanych działaniu WP1234

W celu oceny zmian morfologicznych komórek linii U-87 i U-251 poddanych działaniu WP1234, analizowano ultrastrukturę komórek z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM). Do analiz mikroskopowo-elektronowych komórki traktowano WP1234 [U-87 – 500 μ M] przez 8 i 12 h. Krótszy czas inkubacji został wybrany celowo, aby możliwe było zaobserwowanie zmian w ultrastrukturze komórek przed indukcją zaawansowanego procesu apoptozy, który prowadzi do rozpadu komórek i tworzenia ciałek apoptotycznych.

Analiza ultrastruktury komórek linii U-87 po 8 h inkubacji z WP1234 uwidoczniła zmienioną morfologię mitochondriów (MT), które ulegały kondensacji i były pozbawione grzebieni mitochondrialnych, widocznych w ultrastrukturze mitochondriów komórek kontrolnych. Z kolei po 12 h inkubacji zaobserwowano obecność licznych wakuol autofagowych (AV) (Rysunek 50). Uzyskane wyniki wskazują, że we wczesnym etapie oddziaływania (do 8 h), WP1234 zaburza funkcję mitochondriów. Przedłużające się działanie WP1234 (do 12 h) pobudza z kolei proces autofagii. Uzyskane obserwacje wskazują na potrzebę dalszych analiz pozwalających na identyfikację mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za zaburzenia funkcji mitochondriów po traktowaniu komórek GBM WP1234.

4.18. Podsumowanie wyników

Podsumowując przedstawione wyniki wykazano, że wszystkie badane związki (2-DG, WP1122, NaBt, NaVPA, WP1234) zależnie od dawki i czasu istotnie statystycznie obniżają żywotność, proliferację i biosyntezę białek w komórkach GBM zarówno linii U-87 jak i U-251. Ponadto skojarzone traktowanie komórek GBM związkami o odmiennych mechanizmach działania potęguje efekt cytotoksyczny. Wrażliwość komórek na cytotoksyczne oddziaływanie badanych związków nie była istotnie różna w warunkach normoksji oraz warunkach naśladujących hipoksję, co świadczy o silnie glikolitycznym metabolizmie komórek GBM. Analiza stężenia mleczanu oraz ATP potwierdziła, iż 2-DG i WP1122 zależnie od dawki hamują syntezę kwasu mlekowego oraz ATP, co potwierdza mechanizm działania badanych związków i obniżenie natężenia procesu glikolizy w komórkach. Analiza aktywności deacetylaz histonów potwierdziła, iż NaBt i NaVPA zależnie od dawki hamują aktywność deacetylaz histonów, co potwierdza mechanizm działania analizowanych związków. Analiza mechanizmów cytotoksycznego oddziaływania badanych związków wykazała, iż inhibitory glikolizy oraz HDAC indukują proces apoptozy w komórkach GBM. Ponadto wykazano, iż eliminowanie komórek GBM nie przebiega przy udziale procesu autofagii. Nowa pochodna 2-DG – WP1234 łączy działanie inhibitorów glikolizy oraz inhibitorów HDAC i dwutorowo indukuje apoptozę komórek GBM.



Rysunek 50. Obraz z mikroskopu elektronowego przedstawiający ultrastrukturę komórek linii U-87 po 8 i 12 h inkubacji z wyznaczonym IC_{50} WP1234 [$500 \mu M$]. Na rysunku oznaczono wybrane struktury: mitochondria – M, wakuole autofagowe - AV.

5. Dyskusja

5.1. Metabolizm komórek nowotworowych

Niemal 100 lat temu Otto Warburg zauważył, że komórki nowotworowe przeprogramują metabolizm utylizacji glukozy z fosforylacji oksydacyjnej do procesu glikolizy nawet w obecności tlenu (tzw. glikoliza tlenowa) [57]. Wytwarzanie mleczanu w komórkach nowotworowych, w warunkach normoksji Warburg tłumaczył dysfunkcją mitochondriów, ale obecnie wiadomo, że może on powstawać nie tylko na drodze glikolizy tlenowej, ale też w szlaku glutaminolizy, który jest aktywowany przez tlen [286]. Pomimo tego, wykorzystanie szlaku glikolizy jako potencjalnego celu w opracowaniu leków przeciwnowotworowych nie zostało klinicznie wdrożone. Jak opisuje m.in. Drake i wsp. [56], zależność komórek nowotworowych od procesu glikolizy wykorzystano w diagnostyce nowotworowej oraz ocenie postępów leczenia metodą PET [56].

Metabolizm glukozy jest kluczowym procesem w onkogenezie a inhibitory glikolizy są grupą związków intensywnie badanych w terapii przeciw nowotworom różnego typu, w tym GBM [287]. Ostatnie dekady przyniosły intensywny rozwój leków przeciwnowotworowych w tym celowanych inhibitorów kinaz, przeciwciał monoklonalnych czy leków biologicznych. Żaden z nich nie jest jednak przełomem w terapii GBM, gdyż lokalizacja nowotworu oraz obecność bariery krew-mózg, skutecznie ogranicza możliwość ich penetracji do mózgu i guzów tam zlokalizowanych. Stąd, wydaje się, że w przypadku GBM, stara koncepcja celowania w metabolizm komórek nowotworowych może być dobrym sposobem wdrażania nowych leków.

5.2. Inhibitory glikolizy jako kandydaci na leki przeciwnowotworowe

Jednym z intensywnie badanych inhibitorów glikolizy jest kwas dichlorooctowy (DCA) działający jako inhibitor enzymu PDK. Michelakis i wsp. [289], opisali wpływ doustnego podania DCA u pacjentów z GBM (dawka 15,5 mg/kg, dwa razy dziennie). W badaniu tym wykazano, że długotrwałe (do 15 miesięcy) podawanie DCA powodowało obniżenie proliferacji, indukcję apoptozy, depolaryzację mitochondriów, wzrost ROS oraz obniżoną ekspresję HIF-1 α , co skutkowało istotnym zmniejszeniem unaczynienia guza [288]. DCA jest obecnie w fazie IIA badań klinicznych u pacjentów z nawracającym GBM po leczeniu chirurgicznym (zakończenie badań planowane w 2025 roku, NCT05120184).

Z kolei Ruban i wsp. [289], wykazali, że OAA (metabolit bezwodnego enolo-szczawiooctanu, AEO) może hamować wzrost guza u zwierząt [289]. Co więcej, AEO jest obecnie testowany w II fazie badań klinicznych u pacjentów z nowo zdiagnozowanym GBM (zakończenie badania planowane na koniec 2022 roku, NCT04450160). Dodatkowo, Sourbier i wsp. [290], przedstawił w badaniach, że metabolizm komórek nowotworowych może być zaburzany przez hamowanie czynnika transkrypcyjnego HIF-1 α . Sourbier i wsp. [290], wykazali, że związek MBM-02 (4-hydroksy-2,2,6,6-tetrametylopiperydyno-N-oksyl) hamuje aktywność HIF-1/2 i prowadzi do eliminacji komórek nowotworowych [290].

Intensywnie badanymi związkami celującymi w kluczowy enzym procesu glikolizy (heksokinazę II) są lonidamina, 3-bromopirogronian (3-BrPA) oraz 2-deoxy-D-glukoza. Davidescu i wsp. [291], zbadali efekty działania lonidaminy i 3-BrPA oraz leżące u ich podstaw mechanizmy biochemiczne w komórkach glejaka GL15. W przypadku traktowania komórek GBM za pomocą 3-BrPA już po 1 h następował istotny spadek poziomu ATP. Następnie opisywano degradację cytochromu c i heksokinazy I, obniżenie ekspresji markerów autofagii (białek LC3I/II, p62) oraz defosforylację Akt i p53 i śmierć komórek. W przypadku lonidaminy traktowanie komórek GBM indukowało zanik fosfatydyloinozytolu i aktywności pAkt, co sprzyjało translokacji p53 do mitochondriów i indukcji zależnej od p53 apoptozy [291]. Pomimo obiecujących wyników, Kunjithapatham i wsp. [292], wykazali, że 3-BrPA nie przekracza BBB, a Čuperlović-Culf i wsp. [293], że lonidamina w wielu przypadkach leczenia wywołuje poważne skutki uboczne, stąd ich rozwój kliniczny został ograniczony. Przedstawione problemy nie są natomiast opisywane w przypadku stosowania 2-DG, która ze względu na wysokie podobieństwo struktury do glukozy [92] z łatwością penetruje barierę krew-mózg, oraz jak wykazały liczne badania, również kliniczne, jest dobrze tolerowana i nie wywołuje poważnych efektów ubocznych [93].

5.3. Przeciwnowotworowe oddziaływanie 2-DG

2-DG to syntetyczny analog glukozy, który hamuje enzym szlaku glikolizy (HK II) katalizujący fosforylację glukozy do 2-deoxy-D-glukozy-6-fosforanu (2-DG-6-P), co skutkuje wewnątrzkomórkową akumulacją 2-DG-6P, indukując w konsekwencji śmierć komórki [74, 90]. Literaturowe doniesienia opisują skuteczność 2-DG w eliminacji komórek wielu typów

nowotworów, w tym GBM [74]. Wyniki uzyskane w ramach realizacji niniejszej pracy doktorskiej potwierdzają te obserwacje. Laussel i wsp. [93], wspomina, że pierwsze opisy na temat hamującego wpływu 2-DG na proliferację linii komórkowej mięsaka szczura pochodzą już z 1952 roku [93]. Od tego czasu przeprowadzono wiele badań z użyciem 2-DG w monoterapii, jak również w połączeniu 2-DG z innymi związkami o działaniu cytotoksycznym (Tabela II). Zhang i wsp. [294], udowodnili, że 2-DG w stężeniu 5 mM wywołuje efekt cytotoksyczny w stosunku do dwunastu złośliwych linii komórek nowotworowych różnego pochodzenia (nowotwór jajnika, płaskonabłonkowy nowotwór głowy i szyi, międzybłoniak opłucnej, nowotwór wątroby, okrężnicy oraz GBM). Wykazano, że 2-DG w różnym stopniu obniża żywotność, proliferację oraz wywołuje apoptozę badanych linii komórkowych [294]. Co więcej, analizy przeprowadzone przez Shah i wsp. [84], wykazały, że 2-DG obniża żywotność i indukuje proces UPR oraz apoptozę komórek macierzystych glejaka [84]. W niniejszej pracy uzyskano analogiczne wyniki, które potwierdzają, że 2-DG obniża żywotność, proliferację i syntezę białka w komórkach GBM (Rys. 15A, 16A, 17A). Aby zweryfikować mechanizm działania 2-DG oznaczono stężenie kwasu mlekowego oraz poziom ATP, który jak wskazuje Rys. 21A i 22A, został istotnie zmniejszony w badanych liniach komórkowych pod wpływem 2-DG. Uzyskane wyniki korespondują z wynikami przedstawionymi przez Wanyan i wsp. [295], analizujących w swoich doświadczeniach wpływ 2-DG na uwrażliwienie komórek nowotworu prostaty linii DU145 na buforynę Iib. Monotraktowanie komórek DU145 2-DG [2 mM] lub buforyną Iib [2 μ M] skutkowało znaczącym zmniejszeniem wytwarzania mleczanu do medium oraz syntezą ATP w stosunku do komórek kontrolnych [295]. W badaniach opublikowanych przez Singh i wsp. [296], wykazano, że 2-DG zależnie od dawki zmniejsza wytwarzanie mleczanu oraz ATP komórek nowotworu płuc Lewisa i HUVEC (po 24 h), ograniczając wzrost guza oraz proces angiogenezy [296]. Z kolei Kurtoglu i wsp. [107], uważają, że cytotoksyczne działanie inhibitorów glikolizy w warunkach normoksji wynika głównie z zaburzania procesu N-glikozylacji białek a nie procesu glikolizy [107].

Pomimo licznych badań, 2-DG do dziś nie uzyskała rejestracji jako lek w terapii przeciwnowotworowej. Wynika to przede wszystkim ze słabych właściwości farmakokinetycznych tego związku - szybkiego metabolizmu i krótkiego okresu półtrwania (według Hansen i wsp. [297], po podaniu 2-DG w dawce 50 mg/kg okres połowicznego rozpadu w osoczu wynosi około 50 min.) oraz konieczności stosowania wysokich stężeń efektywnych (powyżej 5

mmol/L), tak aby konkurować z dostępną we krwi glukozą [74]. W celu poprawy farmakokinetyki 2-DG i umożliwienia dalszego rozwoju cząsteczki w badaniach przeciwnowotworowych, zsyntetyzowano nowe pochodne 2-DG i jej proleki.

5.4. Acetylowana pochodna 2-DG i jej oddziaływanie

W laboratorium Profesora W. Priebe zsyntetyzowano nowe, obiecujące grupy pochodnych 2-DG, w tym acetylowane analogi 2-DG. Pośród zsyntetyzowanych pochodnych do dalszych badań wybrano najbardziej rokujący związek – 2-deoksy-3,6-di-O-acetylo-D-glukozę (WP1122). Jak opisuje Priebe i wsp. [208], WP1122 wnika do komórek i przekracza BBB na drodze dyfuzji biernej, a nie przez transportery glukozy GLUT, które wykorzystuje 2-DG. We wnętrzu komórki WP1122 ulega deacetylacji przez esterazy i w efekcie uwalniana jest aktywna cząsteczka 2-DG. Wykazano, że podczas gdy 2-DG jest szybko metabolizowany przez komórki, prolek WP1122 uwalnia 2-DG i wydłuża jej okres półtrwania, a także zwiększa działanie terapeutyczne [208]. Doświadczenia przeprowadzone przez zespół Priebe i wsp. [208], wskazały na hamowanie glikolizy i wysoką wrażliwość szerokiego spektrum komórek nowotworowych na cytotoksyczne oddziaływanie WP1122 (IC_{50} w zakresie 1–10 mM) w normoksji i hipoksji [208]. Obserwacje te potwierdzają przedstawione w niniejszej pracy wyniki wykazujące, że stężenie IC_{50} WP1122 (po 72 h) w modelach linii komórkowych GBM (U-87 oraz U-251) było znacząco niższe (2 mM dla komórek linii U-87 i 0,8 mM dla komórek linii U-251) w porównaniu do 2-DG (5 mM dla obu linii komórkowych) (Rys. 15A,B; Tabela VI). Analogicznie do 2-DG, w przypadku WP1122 efekt cytotoksyczny oceniano na podstawie parametrów zmian żywotności (Rys. 15), proliferacji (Rys. 16), natężenia syntezy białka (Rys. 17). Mechanizm działania i hamowanie procesu glikolizy weryfikowano na podstawie ilości wytworzonego kwasu mlekowego (Rys. 21) i poziomu ATP (Rys. 22) w obu liniach komórek GBM. Ponadto, Priebe i wsp., zbadali, że WP1122 jest dobrze tolerowany (nawet przy przedłużonej ekspozycji) i wydłuża przeżywalność myszy w ortotopowym modelu U-87 GBM. Co więcej, wstępne eksperymenty *in vivo* wykazały, że WP1122 po podaniu doustnym jest szybko wychwytywany przez komórki docelowe, co daje możliwość osiągnięcia dwukrotnie wyższego maksymalnego stężenia 2-DG w osoczu w porównaniu do podanej równomolowej dawki 2-DG. Zaobserwowano także istotnie wyższe stężenie 2-DG w mózgach myszy leczonych WP1122 w porównaniu do myszy leczonych taką samą dawką 2-DG. Strózik i wsp. [299], na

podstawie analiz cytometrycznych i testów cytotoksyczności potwierdzili, że WP1122 ma większy potencjał apoptotyczny niż 2-DG w odniesieniu do komórek GBM linii U-87MG, U-118 MG, A172, H4 oraz SW1088. Co więcej, badania te wskazały istotną rolę heksokinazy jako mediatora glikolizy tlenowej, zapewniającym większą przeżywalność komórek [298]. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki korelują z wynikami uzyskanymi w modelu *in vitro* GBM przedstawionymi przez Priebe i wsp. [208], oraz Strózik i wsp. [299]. W pracy Michel i wsp. [209], przedstawili wyniki uzyskane po traktowaniu trzynastu myszy z GBM (40 dni po implantacji komórek U-87) i pięciu zdrowych za pomocą WP1122. Myszy poddano anatomicznemu rezonansowi magnetycznemu i spektroskopii hiperpolaryzowanego [^{1-13}C] – pirogromianu. Po 30 minutach od doustnego podania WP1122 zauważono spadek poziomu mleczanu u myszy z ortotopowymi GBM podczas gdy nie stwierdzono znaczącego spadku u myszy kontrolnych (zdrowych) [209]. Wyniki te są wysoce obiecujące i wskazują na specyficzność oddziaływania WP1122 oraz jego wysoki profil bezpieczeństwa. Zastosowanie WP1122 w klinice jest zatem wysoce obiecujące. Warto wspomnieć, że w grudniu 2021 roku firma Moleculin Biotech uzyskała akceptację FDA na rozpoczęcie I fazy badań klinicznych z użyciem WP1122 w leczeniu nawrotowego GBM [300].

Postuluje się, iż obecność hipoksji w środowisku guza, jest jednym z czynników wysokiej oporności na terapię GBM [301]. Dlatego w celu oceny znaczenia wpływu dostępności tlenu dla efektów cytotoksycznych badanych pochodnych zastosowano model chemicznie indukowanych warunków naśladujących hipoksję, z wykorzystaniem DMOG (inhibitora rozkładu czynnika HIF-1 α) oraz Rodaminy 123 (hamuje aktywność oksydacyjną mitochondriów). W pracy opublikowanej przez Maher i wsp. [280], analizowano różne modele warunków hipoksji i wykazano, że zastosowanie Rodaminy 123 skutecznie naśladuje warunki hipoksji w komórkach kostniakomięsaka [280]. Ponadto Zhdanov i wsp. [281], wykazali, zależną od DMOG aktywację szlaków regulowanych przez HIF-1 α , co zostało potwierdzone w niniejszej pracy w odniesieniu do komórek GBM (Rys. 19) [281]. Priebe i wsp. [302] udowodnili, że 2-DG hamuje żywotność wielu linii komórkowych glejaka zarówno w normoksji, jak i hipoksji [302]. Jak wynika z danych uzyskanych w ramach realizacji niniejszej pracy, stworzenie warunków naśladujących warunki hipoksji nie wpłynęło istotnie na cytotoksyczność 2-DG i WP1122 (Rys. 20A, 21A). Na tej podstawie można wnioskować, że komórki GBM wykazują wysoką zależność od procesu glikolizy nawet w warunkach dostępności tlenu.

5.5. Znaczenie autofagii w cytotoksycznym oddziaływaniu inhibitorów glikolizy

Zahamowanie syntezy ATP i deficyt energetyczny w komórce jest jednym z induktorów procesu autofagii [95, 113]. Jak wspomniano we Wstępie, proces autofagii w komórkach nowotworowych może pełnić zarówno funkcję ochronną jak również być mechanizmem śmierci komórek. Z tego względu w niniejszej pracy oceniono udział procesu autofagii w cytotoksycznym oddziaływaniu 2-DG i WP1122. Jak wykazała analiza Western blot poziomu ekspresji białka MAP-LC3, traktowanie komórek 2-DG lub WP1122 nie wpłynęło istotnie na jego poziom w odniesieniu do komórek kontrolnych (Rys. 33). Z kolei zahamowanie procesu autofagii z wykorzystaniem inhibitora chlorochiny, nie chroniło komórek linii U-87 i U-251 przed śmiercią indukowaną przez badane inhibitory glikolizy (Rys. 32). Co ciekawe, analizy ultrastruktury komórek prowadzone z wykorzystaniem TEM ujawniły obecność licznych wakuoli autofagowych w komórkach traktowanych 2-DG i WP1122 (Rys. 34). Należy zaznaczyć, iż obserwacje TEM były wykonywane po 24 h inkubacji, podczas gdy analizy Western blot i MTS po 72 h oddziaływania. Nie można zatem wykluczyć, iż autofagia jest aktywowana we wczesnym etapie działania inhibitorów glikolizy, lecz nie jest kluczowa dla indukcji śmierci badanych komórek GBM. Można zatem przypuszczać, że aktywacja autofagii miała charakter ochronny, lecz przedłużające się działanie czynników cytotoksycznych przełamywało jej działanie na rzecz indukcji śmierci komórek. Analogicznie do prowadzonych w niniejszej pracy obserwacji, Priebe i wsp. [302], zauważyli obecność wakuoli autofagowych w ultrastrukturze komórek glejaka (linii U-87 i D54), traktowanych 2-DG [2 mM]. Autorzy nie oceniali jednak żywotności komórek po zablokowaniu przebiegu autofagii, zatem nie można ostatecznie wnioskować o roli tego procesu w opisywanych przez autorów efektach cytotoksycznych [302].

Indukcja procesu autofagii w odpowiedzi na oddziaływanie 2-DG była także opisywana przez Wu i wsp. [303]. Badacze wykazali, iż traktowanie komórek glejaka linii T98G i LN-229 za pomocą 2-DG [12,5 mmol/L, 24 h] indukuje proces autofagii co ilustrował zwiększony poziom białka MAPLC3-II (po 24 h) oraz ocena ultrastruktury komórek z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego, która uwidoczniała obecność charakterystycznych struktur autofagowych: autofagosomów i autofagolizosomów [303]. Wyniki przedstawione przez Wu i wsp. [303], korelują z wynikami przedstawionymi w niniejszej pracy, gdzie aktywacja procesu autofagii została uwidoczniiona w obrazach TEM. Według Wu i wsp. [303], proces aktywowanej przez 2-DG autofagii był zależny od aktywności kinazy eEF2. Wyciszenie ekspresji kinazy

eEF2 hamowało proces autofagii oraz potęgowało aktywację kaspazy 3, co wskazuje na ochronną rolę autofagii w odpowiedzi na działanie 2-DG [303].

Dane literaturowe wskazują, iż indukcja procesu autofagii w odpowiedzi na działanie 2-DG jest zależna od rodzaju komórek nowotworowych oraz obecności innych cząsteczek terapeutycznych w środowisku komórek. Jalota i wsp. [163], przeprowadzili badania wpływu 2-DG oraz połączenia 2-DG z cisplatiną na proces autofagii i apoptozy w komórkach glejaka IV stopnia linii LN229 oraz A172. Wykazano, że monotraktowanie 2-DG powoduje wzrost ekspresji białka Bekliny 1 oraz konwersję formy białka LC3 I do II w porównaniu do kontroli zarówno w warunkach normoksji jak i hipoksji. Z kolei połączenie 2-DG z cisplatiną powodowało obniżenie ekspresji Bekliny 1 oraz przekształcenie formy LC3 I do II zarówno w linii LN229 oraz A172. Zmiany w ekspresji opisanych białek w przypadku monotraktowania oraz kombinacji związków różniły się, zarówno w normoksji jak i hipoksji. Ponadto, poziom białek markerów apoptozy (Bax, kaspazy 3 oraz cytochromu c) był znacząco wyższy w komórkach traktowanych kombinacją 2-DG + cisplastyne w porównaniu do komórek kontrolnych lub traktowanych pojedynczo [163].

Z badań opublikowanych przez Xi i wsp. [100], wynika, że 2-DG aktywuje proces autofagii przez stres ER/UPR a nie poprzez obniżenie poziomu ATP w modelu *in vitro* raka trzustki (CTL1420), czerniaka (MDA-MB-435) oraz nowotworu piersi (SKBR3). Wykazano, że dodanie egzogennej mannozy odwraca indukowany przez 2-DG proces autofagii i stres ER, ale nie przywraca poziomu ATP. Ponadto wykazano, iż w warunkach hipoksji 2-DG w bardziej istotny sposób powoduje zmniejszenie poziomu ATP w porównaniu do warunków normoksji a proces autofagii jest raczej wygaszony niż aktywowany. Ponadto, zablokowanie procesu autofagii techniką siRNA i wyciszenie ekspresji białka Atg7 i lucyferazy (kontrola negatywna) zwiększyło wrażliwość komórek na 2-DG poprzez aktywację procesu apoptozy zależnej od stresu ER [100]. Dodatkowo Shutt i wsp. [304], wskazali, że traktowanie komórek neuroblastomy (linie komórkowe SK-N-SH i SH-SY5Y) za pomocą 2-DG stymuluje produkcję reaktywnych form tlenu (ROS) skorelowanych z aktywacją procesu. Traktowanie komórek przeciwutleniaczem tiolowym, N-acetylocysteiną lub glikolem polietylenowym sprzężonym z dysmutazą lub katalazą ponadtlenkową, chroniło komórki przed cytotoksycznym działaniem 2-DG [304].

5.6. Zmiany ultrastruktury mitochondriów pod wpływem działania inhibitorów glikolizy

Analizując obrazy mikroskopowo-elektronowe komórek linii U-87 i U-251 traktowanych zarówno 2-DG jak i WP1122 identyfikowano zmienioną w odniesieniu do komórek kontrolnych morfologię mitochondriów (Rys. 34). W komórkach poddanych działaniu inhibitorów glikolizy obserwowano kondensację mitochondriów i zanik grzebieni mitochondrialnych. Możliwe skutki hamowania procesu glikolizy przez 2-DG i WP1122 w badanym modelu GBM, na strukturę i funkcje mitochondriów, nie zostały jeszcze wystarczająco zbadane i wymagają dalszych prac w tym zakresie. Jak przedstawia Kuznetsov i wsp. [305], traktowanie komórek ludzkiego nowotworu jelita grubego (DLD-1) za pomocą 2-DG [16 mM, 48 h] powoduje znaczące różnice w strukturze i organizacji mitochondriów. Zdjęcia wykonane za pomocą fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego uwiarygodniły bardziej skondensowaną sieć mitochondrialną w komórkach traktowanych 2-DG w porównaniu z bardziej odseparowanymi mitochondriami w komórkach kontrolnych. Ponadto, bardziej szczegółowe badania molekularne wykazały zwiększony poziom białka fuzyjnego - mitofuzyny 1 i 2 (Mfn1, Mfn2), przy jednoczesnym obniżeniu ekspresji białka rozszczepienia (Drp1) w komórkach DLD-1 traktowanych 2-DG [305]. Co ciekawe, wspomniane obserwacje były specyficzne dla nowotworowych linii komórkowych. W przypadku linii reprezentujących komórki prawidłowe (HL-1, HUVEC i SMC), nie stwierdzono analogicznych zmian w strukturze mitochondriów ani ekspresji białek Mfn1, Mfn2, Drp1, opisywanych w linii DLD-1 [305]. Wskazuje to na różną odpowiedź na traktowanie 2-DG pomiędzy komórkami prawidłowymi a nowotworowymi. Wyniki sugerują silny związek między funkcją oddechową a strukturalną organizacją mitochondriów w komórkach i ich adaptację do zmian metabolicznych [305].

5.7. Inhibitory deacetylaz histonów w terapii przeciwnowotworowej GBM

Niezależnie od specyfiki metabolizmu komórek nowotworowych, także epigenetyczna regulacja ekspresji genów, szczególnie równowaga i kontrola aktywności pomiędzy acetylotransferazami i deacetylazami histonów (HAT/HDAC) odgrywa istotną rolę w inicjacji i progresji nowotworów. Jak opisano przez Hassell i wsp. [225], acetylacja histonów wiąże się z rozluźnieniem chromatyny podczas gdy deacetylacja powoduje jej kondensację i tworzenie heterochromatyny. W rejonach heterochromatyny proces transkrypcji jest ograniczony, co ma wpływ na ekspresję genów [225]. W onkogenezie, precyzyjny proces acetylacji na poziomie

całego proteomu jest zaburzony przez deacetylazy, a poziom deacetylaz histonów (HDAC), szczególnie klasy I i II, jest znacząco podwyższony w przypadku nowotworu piersi, prostaty, płuc czy mózgu [224]. Według Waś i wsp. [306], glejaki charakteryzuje zwiększona ekspresja HDAC I, II, III oraz VII [306]. Jak opisano w publikacji Pająk i wsp. [287], zmienione funkcje HDAC komórek GBM determinują nieprawidłową aktywację RTK-PI3K, p53, Rb, EGFR oraz PTEN. Wielu badaczy postuluje, iż blokowanie HDAC skutkuje hamowaniem wzrostu guza oraz indukcją procesu apoptozy w komórkach nowotworowych przy ograniczonym oddziaływaniu na tkanki prawidłowe [287]. Jak opisuje Suraweera i wsp. [244], obecnie w praktyce klinicznej stosuje się pięć inhibitorów HDAC z czego kwas Suberanilohydroksamowy/Vorinostat (SAHA), Belinostat, Romidepsyna, oraz Chidamid zostały zatwierdzone do leczenia chłoniaka skórno-T-komórkowego lub z obwodowych limfocytów T a Panobinostat do leczenia szpiczaka mnogiego [244]. Ponadto, prowadzonych jest wiele badań klinicznych, w których inhibitory HDAC są podawane w monoterapii lub terapii kombinowanej. Inhibitory HDAC stają się także obiecującą strategią leczenia GBM. Wykazano, iż Vorinostat ma zdolność przenikania BBB, co czyni go obiecującym kandydatem w terapii GBM [287]. Z kolei Gurbani i wsp. [307], przeprowadzili badania na modelu szczurzym z wprowadzonymi stereotaktycznie komórkami glejaka (9L), którym podawano Belinostat [25 mg/kg - 100 mg/kg]. Wykazano, że po 13 dniach leczenia Belinostatem objętość guza zmniejszyła się zależnie od dawki. Co więcej, zauważono także przywrócenie aktywności i poprawę nastroju u zwierząt [307]. Z kolei Yang i wsp. [308], wykazali, iż traktowanie komórek GBM linii U-87 i U-251 Vorinostatem [3-10 μ M], skutkuje zależnym od dawki i czasu hamowaniem żywotności i proliferacji komórek. Ponadto, Vorinostat hamował metabolizm energetyczny, migrację i inwazję komórek GBM, jak również indukował hamowanie cyklu komórkowego w fazie G2 i indukcję apoptozy [308]. Z kolei w badaniu in vivo zaobserwowano, iż Vorinostat hamuje wzrost guza przez indukcję apoptozy i zahamowanie proliferacji [309]. Obiecujące dane przedkliniczne dały możliwość wprowadzenie Vorinostatu do II fazy badań klinicznych, które wykazały, iż jego zastosowanie w monoterapii jest dobrze tolerowane przez pacjentów z GBM, ale ma niestety nieznaczną skuteczność jednoskładnikową. Uzyskane wyniki zachęciły do połączenia Vorinostatu z zaaprobowanym obecnie w terapii GBM Bevacizumabem, jednakże, kombinacja związków nie wpłynęła na wydłużenie czasu przeżycia bez progresji ani mediany całkowitego przeżycia w porównaniu do leczenia chorych jedynie Bevacizumabem [309]. Według pracy Iwamoto i wsp. [310],

innym podejściem do leczenia GBM z użyciem inhibitora HDAC było zastosowanie Romidepsyny, która była dobrze tolerowana jednak jako pojedynczy lek nie wykazywała znaczącej aktywności przeciwnowotworowej u pacjentów [310]. Jak wskazuje Chen i wsp. [311], w badaniu klinicznym weryfikuje się obecnie skuteczność innego inhibitora HDAC – Panobinostatu, zarówno w kombinacji z Bevacizumabem jak i radioterapią stereotaktyczną [311]. Co ciekawe Waś i wsp. [306], opisują wyniki, które wskazują, że nowe inhibitory HDAC tj.: Mocetinostat i MC2129, indukują zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M skuteczniej niż klinicznie stosowany Vorinostat [306]. Z kolei Krauze i wsp. [312], opisali, obiecujące wyniki II fazy badań klinicznych z użyciem kwasu walproinowego (VPA) w połączeniu z Temozolomidem i radioterapią u pacjentów z GBM [312].

Do często stosowanych i efektywnych inhibitorów HDAC należą także maślan sodu (NaBt) i kwas walproinowy (VPA). Cytotoksyczne działanie tych związków zostało wcześniej opisane w literaturze. Engelhard i wsp. [258], zbadali wpływ NaBt w modelach *in vitro* oraz *in vivo* GBM. W badaniach *in vitro*, NaBt powodował zmiany w morfologii oraz ekspresję kwaśnych białek fibrylarnych gleju, hamując proliferację różnych linii komórkowych glejaka [258]. Ponadto, doguzowa infuzja NaBt powodowała wydłużenie życia szczurów Wistar-Furth z guzami śródmózgowymi bez objawów toksyczności [258]. Co więcej, Nakagawa i wsp. [255], wykazali, że NaBt [2 mM, 7 dni] w odwracalny sposób hamuje proliferację komórek linii A172 i powoduje starzenie się komórek przez wzmożoną ekspresję białek regulujących cykl komórkowy: p21, 27, 53. Ponadto, NaBt odwracalnie hamował migrację i inwazję komórek [255]. Yao i wsp. [257], opisują, iż NaBt powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego przez stabilizację mRNA genów *p21* i aktywację *p16* oraz *p21* [257]. Z kolei Qin i wsp. [313], przeprowadzili analizę wpływu NaBt [0 - 20 mM] na proces apoptozy w komórkach glejaka linii U-251 i szczurzych miocytach linii L6. Wykazano, że NaBt powoduje zależny od dawki wzrost odsetka komórek apoptotycznych i aktywację kaspazy 3. W komórkach GBM linii U-251, zależna od NaBt indukcja apoptozy korelowała z obniżeniem poziomu antyapoptotycznego białka Bcl-2 oraz zwiększeniem poziomu proapoptotycznego białka Bax, i ANT. Ponadto, Qin i wsp. [313], wykazali, że NaBt powoduje otwarcie MPTP, co prowadziło do obniżenia potencjału błony mitochondrialnej i wewnątrzpochođną apoptozę. Kolejne badania opublikowane przez Sawa i wsp. [256], potwierdziły zależne od dawki hamowanie żywotności i indukcję apoptozy ludzkich komórek glejaka linii U-87, U-251 oraz T98G, po traktowaniu NaBt lub trichostatyną A

(TSA) [256]. Ponadto, analogicznie do danych Qin i wsp. [313], zmianie ulegała ekspresja białek z rodziny Bcl-2. Obserwacje dotyczące modyfikacji poziomu białek pro- i antyapoptotycznych z rodziny Bcl-2 zostały również potwierdzone przez wyniki zawarte w niniejszej pracy (Rys. 28, 30). Zmniejszenie poziomu białek antyapoptotycznych (Bcl-2) i wzrost ekspresji białek proapoptotycznych (Bad, Bax) korelował z indukcją apoptozy komórek linii U-87 i U-251 w odpowiedzi na działanie NaBt.

Wiele danych literaturowych dotyczy również cytotoksycznego oddziaływania VPA wobec komórek nowotworowych. Jak opisuje Han i wsp. [314], VPA jest powszechnie stosowany do kontrolowania napadów padaczkowych wywołanych przez guzy mózgu, w tym glejaki [314]. Tseng i wsp. [315] wykazali, że VPA zależnie od dawki [5-20 mM] i czasu (48, 72 h) znacząco zmniejsza proliferację komórek linii U-87, GBM8401 i DBTRG-05 MG. Ponadto wykazano, że VPA indukuje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M, zwiększa produkcję ROS i indukuje ekspresję proapoptotycznego białka Bim oraz hamuje progresję GBM przez kaskadę PON2-Bim [316]. Z kolei Zhang i wsp. [316], wykazali, że VPA [2-16 mM, 72 h], zależnie od dawki aktywuje w komórkach linii U-87 wewnętrzny szlak apoptozy (blokuje ekspresję białek Bcl-2, Bcl-x i aktywuje ekspresję proapoptotycznego białka Bax) poprzez aktywację kinaz Akt i ERK i hamowanie GSK-3 β . Ponadto, traktowanie komórek GBM za pomocą VPA [4 mM], wywoływało podobne efekty cytotoksyczne jak stosowany jako standard terapii GBM TMZ [50 μ M], wyrażone jako obniżenie żywotności, uwalnianie LDH czy obecność komórek apoptotycznych [316]. Także Ryu i wsp. [317], udowodnili hamowanie żywotności komórek glejaka linii TP365 MG, U118 MG, U251 MG, U373 MG, HS683 poprzez zastosowanie różnych stężeń VPA [0 – 16 mM, 72 h] [317].

Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie potwierdzają, że inhibitory HDAC (NaBt i NaVPA) hamują aktywność HDAC (Rys. 29), prowadząc do zwiększenia poziomu proapoptotycznych białek Bad i Bax przy równoczesnym obniżeniu poziomu antyapoptotycznego białka Bcl-2 w komórkach linii U-87 i U-251 (Rys. 30). W konsekwencji opisanych zmian obserwowano obniżenie żywotności (Rys. 24), proliferacji (Rys. 25) i syntezy białek (Rys. 26) oraz aktywację wewnątrzpochodnego szlaku apoptozy (Rys. 28).

5.8. Leczenie skojarzone w terapii przeciwnowotworowej

Standardem leczenia przeciwnowotworowego jest terapia kombinowana. Liczne prace opisywały korzystne działanie zarówno inhibitorów glikolizy oraz inhibitorów HDAC w połączeniu z innymi lekami lub substancjami bioaktywnymi. Idealnym współdziałaniem leków jest osiągnięcie efektów synergistycznych, które pozwalają na wyższą skuteczność terapeutyczną przy zmniejszeniu stężeń stosowanych w kombinacji, w porównaniu do monoterapii. Przykładowo, Majchrzak-Celińska i wsp. [318], wykazali, że kurkuminoidey (CCM) w skojarzonym traktowaniu z NaBt synergistycznie zmniejszają żywotność komórek GBM indukując apoptozę i zatrzymanie cyklu komórkowego. W efektach tych pośredniczy generowanie ROS oraz zmiany ekspresji genów. Ponadto stwierdzono, że NaBt poprawia przepuszczalność CCM przez BBB i jamę nosową [318]. Z kolei, badania opublikowane przez Taylor i wsp. [319], wykazały synergistyczną indukcję apoptozy przez kwercetynę (QCT) i NaBt w linii T98G oraz modelu mysim, na drodze hamowania autofagii. Skojarzone traktowanie QCT + NaBt skutkowało nasileniem morfologicznych cech apoptozy (fragmentacja jądra, kondensacja chromatyny), zwiększeniem odsetka komórek apoptotycznych (barwienie aneksyną V), zmianami ekspresji białek z rodziny Bcl-2 (wzrost ekspresji białka Bax, zmniejszenie ekspresji białka Bcl-2, surwiwiny), aktywacją kaspazy 3 oraz degradacją PARP [319]. Ponadto, Ryu i wsp. [317], wykazali, iż połączenie VPA i TMZ nasila śmierć komórek opornych na TMZ na drodze apoptozy/autofagii [317]. Kolejnym przykładem kombinacji z zastosowaniem VPA są wyniki badań opublikowane przez Chang i wsp. [320]. Badacze wykazali synergistyczne oddziaływanie apoptogenne VPA i fluwastatyny (inhibitora reduktazy 3-hydroksy-3-metylo-glutarylo-koenzymu) na komórki linii GBM8401 [320]. Z kolei Barker i wsp. [321], opisali wyniki badań prowadzonych na grupie 544 dorosłych pacjentów z GBM, które wykazały, że stosowanie VPA podczas radioterapii wiąże się z wydłużeniem całkowitego czasu przeżycia, niezależnie od historii napadów padaczkowych, stosowania innych leków antyepileptycznych czy efektów leczenia TMZ [321]. Pozytywne efekty terapii z zastosowaniem VPA opisali także Krauze i wsp. [312]. Badania kliniczne II fazy skojarzonego leczenia VPA, RT i TMZ u pacjentów z nowo rozpoznanym GBM, wykazały, iż kombinacja wydłuża średni czas przeżycia, średni czas przeżycia wolnego od progresji oraz ma tolerowaną toksyczność [312].

Także inhibitory glikolizy, zwłaszcza 2-DG, były wielokrotnie stosowane jako elementy terapii skojarzonej w badaniach przeciwnowotworowych. 2-DG łączono zarówno z radioterapią jak i stosowanymi powszechnie cytostatykami tj.: adriamycyną, cisplatyną, doksorubicyną, daunorubicyną, gemcytabiną czy sorafenibem (Tabela II). Shah i wsp. [84], wykazali, że terapia 2-DG skojarzona z radioterapią znacząco zmniejszyła skuteczną dawkę (wartość IC_{50}) 2-DG w porównaniu do traktowania samą 2-DG. Ponadto połączenie 2-DG z radioterapią powodowało zależną od CHOP indukcję apoptozy w komórkach glejaka [84]. Z kolei, jak opisał Jalota i wsp. [163], 2-DG w połączeniu z cisplatyną istotnie bardziej efektywnie indukowało apoptozę komórek GBM. Analogicznie, skojarzone traktowanie 2-DG i Metforminy istotnie skuteczniej hamowało rozwój organoidów GBM w porównaniu do 2-DG [170].

Te optymistyczne obserwacje dotyczące adjuwantowego działania inhibitorów HDAC i glikolizy były podstawą do weryfikacji potencjału skojarzonego oddziaływania dwóch grup związków razem, które dotychczas nie były opisywane w literaturze. Przedstawione w niniejszej pracy wyniki potwierdziły, że skojarzone działanie 2-DG, WP1122 z inhibitorami HDAC (NaBt lub NaVPA) synergistycznie indukują apoptozę komórek GBM linii U-87 i U-251. Z danych literaturowych wynika, że dane te są pierwszym doniesieniem potwierdzającym, iż jednoczesne celowanie w metabolizm GBM i proces transkrypcji genów jest skuteczną strategią przeciwnowotworową. Należy jednak zauważyć, iż prezentowane w niniejszej pracy wyniki uzyskano z badań *in vitro* i wymagają one dalszej weryfikacji na modelach zwierzęcych.

5.9. Potencjał przeciwnowotworowy nowej pochodnej 2-DG – WP1234

Jednoczesne hamowanie aktywności deacetylaz histonów oraz procesu glikolizy jest obiecującą strategią, która powinna być rozwijana w kierunku klinicznego wdrożenia. Należy jednak podkreślić, iż wdrożenie w klinice terapii kombinowanej jest wysoce czasochłonne i kosztowne, ze względu na konieczność uprzedniej monoterapii dwóch nowych leków a następnie ich podawania skojarzonego. Dlatego też, wydaje się, że wykorzystanie połączenia omawianych związków jest atrakcyjną perspektywą o wyższym prawdopodobieństwie wprowadzenia do terapii pacjentów. Zespół Profesora W. Pribe zsyntetyzował nową, dotychczas nie badaną pochodną 2-DG - WP1234 (3,6-di-O-(2-Ethyl)butyryl-D-glukopiranoza), w strukturze której podstawiono dodatkowo resztę etylomaślanu. Zgodnie z założeniem, WP1234 po wnikięciu do komórek nowotworowych ulega rozszczepieniu enzymatycznemu i uwalnia aktywną

biologicznie 2-DG oraz resztę etylomaślanu, przez co działa jako inhibitor glikolizy (2-DG) oraz modyfikuje aktywność deacetylaz histonów (reszta etylomaślanu) i ekspresję genów pro- i antyapoptotycznych.

W niniejszej pracy wykazano efekt cytotoksyczny nowej pochodnej WP1234 wobec komórek GBM poprzez istotne statystycznie obniżenie żywotności (Rys. 39), proliferacji (Rys. 40) oraz syntezy białek (Rys. 41) w porównaniu do komórek nietraktowanych. Ponadto, oznaczenie stężenia kwasu mlekowego potwierdziło, iż WP1234 zależnie od dawki hamuje syntezę kwasu mlekowego (Rys. 45), co koreluje ze zmniejszeniem natężenia procesu glikolizy w komórkach. Dane te stanowią potwierdzenie molekularnego mechanizmu działania WP1234 jako inhibitora glikolizy. Ponadto, oznaczenia aktywności HDAC wykazały, że WP1234 zależnie od dawki hamuje aktywność deacetylaz histonów (Rys. 46). W efekcie opisanych zmian molekularnych, zaobserwowano aktywację procesu apoptozy (Rys. 43, 44, 47). Na podstawie zdjęć mikroskopowo-elektronowych zaobserwowano zależne od WP1234 pobudzenie procesu autofagii oraz obecność licznych wakuoli autofagowych (Rys. 50). Co ciekawe, analiza ultrastruktury komórek linii U-87 po 8 h inkubacji z WP1234 uwidoczniała zmienioną morfologię mitochondriów (MT), które ulegały kondensacji i były pozbawione grzebieni mitochondrialnych, widocznych w ultrastrukturze mitochondriów komórek kontrolnych (Rys. 50). Obserwacje te są zbieżne z wynikami TEM opisywanymi dla zmian indukowanych przez 2-DG i WP1122. Uzyskane wyniki wskazują na dwutorowe, cytotoksyczne działanie WP1234 w komórkach GBM, zarówno jako inhibitora glikolizy jak i inhibitora HDAC.

Dotychczas nie ma dostępnych prac opisujących oddziaływanie WP1234 a uzyskane w niniejszej pracy wyniki są przygotowywane do publikacji. Jedyne dostępne dane są zawarte w zgłoszonym patencie i dotyczą aktywności WP1234 w modelu raka trzustki [322]. W badaniach przedklinicznych WP1234 od 20 do 50-krotnie efektywniej indukował śmierć komórek w porównaniu z 2-DG [322]. Obecnie WP1234 jest cząsteczką licencjonowaną przez firmę Moleculin Biotech., która planuje rozwój kliniczny cząsteczki.

5.10. Podsumowanie

Pomimo ogromnego postępu w rozwoju nowych leków przeciwnowotworowych, w tym inhibitorów kinaz, leków biologicznych i przeciwciał monoklonalnych, od ponad 20 lat brak jest znaczącego postępu w terapii glejaka. Przyczyną jest specyficzna lokalizacja nowotworu i

obecność bariery krew-mózg, która skutecznie uniemożliwia penetrację nowych leków do mózgu. Pomimo, iż koncepcja hamowania metabolizmu glukozy wydaje się być nie nową ideą w rozwoju terapii przeciwnowotworowych, to zdolność pochodnych glukozy do przenikania bariery krew-mózg sprawia, iż ten kierunek zyskuje nowe znaczenie i może stanowić proste, ale skuteczne narzędzie do ograniczenia proliferacji komórek glejaka i ich eliminacji. Co więcej, niektóre inhibitory deacetylaz histonów, w tym NaBt i VPA, są prostymi związkami, które także mogą oddziaływać na komórki zlokalizowane w mózgu. Właściwość ta sprawiła, iż liczne cząsteczki o charakterze inhibitorów glikolizy lub deacetylaz histonów są obecnie rozwijane na różnych etapach badań klinicznych w terapii wielu typów nowotworów.

Koncepcja terapii skojarzonej kandydatami na lek z obu klas jest nowym podejściem do eliminacji komórek nowotworowych GBM i jak wskazują przeprowadzone w niniejszej pracy badania, jej efektywność jest obiecująca. Co ważne, wykazano, że pochodne glikolizy i HDAC mogą oddziaływać synergistycznie, co jest najbardziej pożądanym schematem współdziałania leków. Mając na uwadze złożoność procesu rozwoju leków, zwłaszcza terapii skojarzonych, potwierdzenie dwutorowego oddziaływania WP1234 jest atrakcyjną koncepcją, która wymaga dalszego rozwoju przedklinicznego i klinicznego.

Wyniki uzyskanych badań na modelach *in vitro* potwierdzają zasadność dalszego analizowania działania skojarzonego 2-DG/WP1122 + NaBt/NaVPA lub WP1234 lub poszukiwania nowych pochodnych ukierunkowanych na hamowanie glikolizy i aktywność HDAC przeciwko GBM. W ramach niniejszej pracy doktorskiej nie prowadzono badań na modelach zwierzęcych, ale projekt OPUS, którego częścią jest niniejsza rozprawa, przewiduje weryfikację najbardziej obiecujących cząsteczek na mysim modelu GBM.

6. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych prac badawczych sformułowano następujące wnioski:

1. Jednoczesne hamowanie procesu glikolizy (2-DG i WP1122) oraz aktywności deacetylaz histonów (NaBt i NaVPA) wysoce efektywnie eliminuje komórki nowotworowe glejaka wielopostaciowego linii U-87 i U-251 na drodze fizjologicznego procesu apoptozy.
2. Skojarzone działanie inhibitorów glikolizy i inhibitorów deacetylaz histonów indukuje synergistyczne efekty cytotoksyczne wobec komórek GBM.
3. Nowa pochodna 2-DG – WP1234, zawierająca podstawnik etylomaślanu, wywiera cytotoksyczny wpływ wobec komórek GBM poprzez dwutorowe oddziaływanie wewnątrzkomórkowe jako czynnika hamującego proces glikolizy i aktywność deacetylaz histonów.
4. Wrażliwość komórek linii U-87 i U-251 na cytotoksyczne oddziaływanie inhibitorów glikolizy (2-DG, WP1122), inhibitorów deacetylaz histonów (NaBt, NaVPA) oraz WP1234 nie różni się istotnie w warunkach normoksji oraz warunkach naśladujących hipoksję, co świadczy o silnie glikolitycznym fenotypie komórek GBM.

7. Piśmiennictwo

- [1] Gladson, C.L.; Prayson, R.A.; Liu, W.M. The pathobiology of glioma tumors. *Ann. Rev. Pathol.* **2010**, *5*, 33–50.
- [2] Hanif, F.; Muzaffar, K.; Perveen, K.; Malhi, S.M.; Simjee, S. Glioblastoma multiforme: a review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev.* **2017**, *18*(1), 3–9.
- [3] Louis, D.N.; Perry, A.; Reifenberger, G.; von Deimling, A.; Figarella-Branger, D.; Cavenee, W.K.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Kleihues, P.; Ellison, D.W. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol.* **2016**, *131*(6), 803–820.
- [4] Jovčevska, I. Genetic secrets of long-term glioblastoma survivors. *Bosn J Basic Med Sci.* **2019**, *19*(2), 116–124.
- [5] Simińska, D.; Korbecki, J.; Kojder, K.; Kapczuk, P.; Fabiańska, M.; Gutowska, I.; Machoy-Mokrzyńska, A.; Chlubek, D.; Baranowska-Bosiacka, I. Epidemiology of anthropometric factors in glioblastoma multiforme-literature review. *Brain Sci.* **2021**, *11*(1), 116.
- [6] D'Alessio, A.; Proietti, G.; Sica, G.; Scicchitano, B.M. Pathological and molecular features of glioblastoma and its peritumoral tissue. *Cancers.* **2019**, *11*(4), 469.
- [7] Grech, N.; Dalli, T.; Mizzi, S.; Meilak, L.; Calleja, N.; Zrinzo, A. Rising incidence of glioblastoma multiforme in a well-defined population. *Cureus.* **2020**, *12*(5), e8195.
- [8] Verdecchia, A.; De Angelis, G.; Capocaccia, R. Estimation and projections of cancer prevalence from cancer registry data. *Stat Med.* **2002**, *21*(22), 3511–3526.
- [9] Religioni, U. Cancer incidence and mortality in Poland. *Clin Epidemiol Glob Health.* **2020**, *8*(2), 329-334.
- [10] Cegła, P.; Adamska, K.; Smoleń, M.; Pachowicz, M. PET/CT imaging in the diagnosis of brain tumors. *Inż. Fiz. Med.* **2018**, *7*(5), 305-309.
- [11] Bigos, E.; Szych, M.; Masłowski, M.; Gottwald1, M.; Fijuth, J. Glioblastoma - the topical problem. *Med. Pal.* **2014**, *6*(1), 7-13.
- [12] Rugała, Z. Długoletnie przeżycie chorego na glejaka wielopostaciowego mózgu oraz raka nerki rozpoznanych i leczonych jednocześnie. *Biuletyn Polskiego Towarzystwa Onkologicznego Nowotwory.* **2018**, *3*(5-6), 315-319.

- [13] Thakkar, J.P.; Dolecek, T.A.; Horbinski, C.; Ostrom, Q.T.; Lightner, D.D.; Barnholtz-Sloan, J.S.; & Villano, J.L. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **2014**, 23(10), 1985–1996.
- [14] Davis M.E. Glioblastoma: overview of disease and treatment. *Clin J Oncol Nurs.* **2016**, 20(5 Suppl), S2–S8.
- [15] Tamimi, A.F.; Juweid, M. Epidemiology and outcome of glioblastoma. *Glioblastoma.* **2017**, Codon Publications. Chapter 8.
- [16] Didkowska, J.; Wojciechowska, U.; Czaderny, K.; Olasek, P.; Ciuba, A. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2017 roku. *Krajowy Rejestr Nowotworów Zakład Epidemiologii i Prewencji Nowotworów.* **2019**.
- [17] Ohgaki, H. Epidemiology of brain tumors. *Methods Mol Biol.* **2009**, 472, 323–342.
- [18] Derakhshan, N.; Azadeh, N.; Saffarian, A.; Taghipour, M.; Eghbal, K.; Dehghanian, A. Cerebellar glioblastoma multiforme in an adult patient with neurofibromatosis type 1: an extremely rare report with review of literature. *Egypt J Neurol Psychiatry Neurosurg.* **2019**, 55, 85.
- [19] Dipro, S.; Al-Otaibi, F.; Alzahrani, A.; Ulhaq, A.; Al Shail, E. Turcot syndrome: a synchronous clinical presentation of glioblastoma multiforme and adenocarcinoma of the colon. *Case Rep Oncol Med.* **2012**, 720273.
- [20] Khattab, A.; Monga, D.K. Turcot syndrome. *StatPearls, Treasure Island, FL.* (2018).
- [21] Rutz, H.P.; de Tribolet, N.; Calmes, J.M.; Chapuis, G. Long-time survival of a patient with glioblastoma and Turcot's syndrome. case report. *J Neurosurg.* **1991**, 74(5), 813–815.
- [22] Kyritsis, A.P.; Bondy, M.L.; Rao, J.S.; Sioka, C. Inherited predisposition to glioma. *Neuro Oncol.* **2010**, 12(1), 104–113.
- [23] Vijapura, C.; Saad Aldin, E.; Capizzano, A.A.; Policeni, B.; Sato, Y.; Moritani, T. Genetic syndromes associated with central nervous system tumors. *Radiographics.* **2017**, 37(1), 258–280.
- [24] Söderberg-Nauclér, C.; Johnsen, J.I. Cytomegalovirus in human brain tumors: role in pathogenesis and potential treatment options. *World J Exp Med.* **2015**, 5(1), 1–10.
- [25] Carrano, A.; Juarez, J.J.; Incontri, D.; Ibarra, A.; Guerrero Cazares, H. Sex-specific differences in glioblastoma. *Cells.* **2021**, 10(7), 1783.

- [26] Costanza, M.; Finocchiaro, G. Allergic signs in glioma pathology: current knowledge and future perspectives. *Cancers*. **2019**, 11(3), 404.
- [27] Urbańska, K.; Sokołowska, J.; Szmidt, M.; Sysa, P. Glioblastoma multiforme-an overview. *Contemp Oncol (Pozn)*. **2014**, 18(5), 307–312.
- [28] Lacruz, C.R.; Catalina-Fernández, I.; Bardales, R.H.; Pimentel, J.; López-Presa, D.; Sáenz-Santamaría, J. Intraoperative consultation on pediatric central nervous system tumors by squash cytology. *Cancer Cytopathol*. **2015**, 123(6), 331–346.
- [29] Richard, S.A.; Ye, Y.; Li, H.; Ma, L.; You, C. Glioblastoma multiforme subterfuge as acute cerebral hemorrhage: a case report and literature review. *Neurol Int*. **2018**, 10(1), 7558.
- [30] Weis, S.; Sonnberger, M.; Dunzinger, A.; Voglmayr, E; Aichholzer, M.; Kleiser, R.; Strasser, P. Glioblastoma. in: imaging brain diseases. *Springer (Vienna)*. **2019**, 1403-1415.
- [31] Rong, Y.; Durden, D.L.; Van Meir, E.G.; Brat, D.J. 'Pseudopalisading' necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol*. **2006**, 65(6), 529–539.
- [32] Oronsky, B.; Reid, T.R.; Oronsky, A.; Sandhu, N.; Knox, S.J. A review of newly diagnosed glioblastoma. *Front Oncol*. **2021**, 10, 574012.
- [33] Russo, M.; Villani, V.; Taga, A.; Genovese, A.; Terrenato, I.; Manzoni, G.C.; Servadei, F.; Torelli, P.; Pace, A. Headache as a presenting symptom of glioma: a cross-sectional study. *Cephalalgia*. **2018**, 38(4), 730–735.
- [34] Fritz, L.; Dirven, L.; Reijneveld, J.C.; Koekkoek, J.A.; Stiggelbout, A.M.; Pasman, H.R.; Taphoorn, M.J. Advance care planning in glioblastoma patients. *Cancers*. **2016** 8(11), 102.
- [35] Valentini, M.C.; Mellai, M.; Annovazzi, L.; Melcarne, A.; Denysenko, T.; Cassoni, P.; Casalone, C.; Maurella, C.; Grifoni, S.; Fania, P.; Cistaro, A.; Schiffer, D. Comparison among conventional and advanced MRI, ¹⁸F-DG PET/CT, phenotype and genotype in glioblastoma. *Oncotarget*. **2017**, 8(53), 91636–91653.
- [36] Tsiouris, S.; Bougias, C.; Fotopoulos, A. Principles and current trends in the correlative evaluation of glioma with advanced MRI techniques and PET. *Helv J Nucl Med*. **2019**, 22(3), 206–219.
- [37] Osawa, S.; Tosaka, M.; Horiguchi, K.; Tokue, A.; Higuchi, T.; Tsushima, Y.; Yoshimoto, Y. Usefulness of dual isotope ¹²³I-IMP and ²⁰¹Tl SPECT for the diagnosis of primary central

nervous system lymphoma and glioblastoma. *Int J Clin Oncol.* **2022**, 10.1007/s10147-022-02171-3.

[38] Delgado-Martín, B.; Medina, M.Á. Advances in the knowledge of the molecular biology of glioblastoma and its impact in patient diagnosis, stratification, and treatment. *Adv Sci (Weinh).* **2020**, 7(9), 1902971.

[39] Tomar, M.S.; Shrivastava, A. Tert promoter mutations correlate with IDJs, MGMT and EGFR in glioblastoma multiforme. *Neurol India.* **2021**, 69(1), 135–136.

[40] Weller, M.; Stupp, R.; Hegi, M.E.; van den Bent, M.; Tonn, J. C.; Sanson, M.; Wick, W.; Reifenberger, G. Personalized care in neuro-oncology coming of age: why we need MGMT and 1p/19q testing for malignant glioma patients in clinical practice. *Neuro Oncol.* **2012**, 14 Suppl 4(Suppl 4), iv100–iv108.

[41] Yu, L.; Zhang, G.; Qi, S. Aggressive treatment in glioblastoma: what determines the survival of patients? *J Neurol Surg Cent Eur Neurosurg.* **2021**, 82(2), 112–117.

[42] Weathers, S.P.; de Groot, J. VEGF manipulation in glioblastoma. *Oncology (Williston Park).* **2015**, 29(10), 720–727.

[43] Lathia, J.D.; Mack, S.C.; Mulkearns-Hubert, E.E.; Valentim, C.L.; Rich, J.N. Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev.* **2015**, 29(12), 1203–1217.

[44] Zhang, H.; Wang, R.; Yu, Y.; Liu, J.; Luo, T.; Fan, F. Glioblastoma treatment modalities besides surgery. *J Cancer.* **2019**, 10(20), 4793–4806.

[45] Pessina, F.; Navarria, P.; Cozzi, L.; Tomatis, S.; Riva, M.; Ascolese, A.M.; Santoro, A.; Simonelli, M.; Bello, L.; Scorsetti, M. Role of surgical resection in recurrent glioblastoma: prognostic factors and outcome evaluation in an observational study. *J Neurooncol.* **2017**, 131(2), 377–384.

[46] Lukas, R.V.; Wainwright, D.A.; Ladomersky, E.; Sachdev, S.; Sonabend, A.M.; Stupp, R. Newly diagnosed glioblastoma: a review on clinical management. *Oncology* **2019**, 33(3), 91–100.

[47] Singh, N.; Miner, A.; Hennis, L.; Mittal, S. Mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma—a comprehensive review. *Cancer Drug Resist.* **2021**, 4, 17–43.

[48] Lee, S.Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes Dis.* **2016**, 3(3), 198–210.

- [49] Perry, J.R.; Laperriere, N.; O'Callaghan, C.J.; Brandes, A.A.; Menten, J.; Phillips, C.; Fay, M.; Nishikawa, R.; Cairncross, J.G.; Roa, W.; Osoba, D.; Rossiter, J.P.; Sahgal, A.; Hirte, H.; Laigle-Donadey, F.; Franceschi, E.; Chinot, O.; Golfopoulos, V.; Fariselli, L.; Wick, A.; Feuvret, L.; Back, M.; Tills, M.; Winch, C.; Baumert, B.G.; Wick, W.; Ding, K.; Mason, W.P. Trial investigators. short-course radiation plus temozolomide in elderly patients with glioblastoma. *N Engl J Med.* **2017**, *376*(11), 1027–1037.
- [50] Winkler, F.; Osswald, M.; Wick, W. Anti-angiogenics: their role in the treatment of glioblastoma. *Oncol Res Treat.* **2018**, *41*(4), 181–186.
- [51] Reardon, D.A.; Brandes, A.A.; Omuro, A.; Mulholland, P.; Lim, M.; Wick, A.; Baehring, J.; Ahluwalia, M.S.; Roth, P.; Bähr, O.; Phuphanich, S.; Sepulveda, J.M.; De Souza, P.; Saheb-jam, S.; Carleton, M.; Tatsuoka, K.; Taitt, C.; Zwiertes, R.; Sampson, J.; Weller, M. Effect of nivolumab vs bevacizumab in patients with recurrent glioblastoma: the checkmate 143 phase 3 randomized clinical trial. *JAMA Oncol.* **2020**, *6*(7), 1003–1010.
- [52] Gramatzki, D.; Roth, P.; Rushing, E. J.; Weller, J.; Andratschke, N.; Hofer, S.; Korol, D.; Regli, L.; Pangalu, A.; Pless, M.; Oberle, J.; Bernays, R.; Moch, H.; Rohrman, S.; Weller, M. Bevacizumab may improve quality of life, but not overall survival in glioblastoma: an epidemiological study. *Ann Oncol.* **2018**, *29*(6), 1431–1436.
- [53] Arthurs, A.L.; Keating, D.J.; Stringer, B.W.; Conn, S.J. The suitability of glioblastoma cell lines as models for primary glioblastoma cell metabolism. *Cancers.* **2020**, *12*(12), 3722.
- [54] Wang, G.; Fu, X.L.; Wang, J.J.; Guan, R.; Sun, Y.; Tony To, S.S. Inhibition of glycolytic metabolism in glioblastoma cells by PT3GLC combined with PI3K inhibitor via Sirt3-mediated mitochondrial and PI3K/Akt-MAPK pathway. *J Cell Physiol.* **2019**, *234*(5), 5888–5903.
- [55] Zhou, W.; Wahl, D.R. Metabolic abnormalities in glioblastoma and metabolic strategies to overcome treatment resistance. *Cancers.* **2019**, *11*(9), 1231.
- [56] Drake, L.R.; Hillmer, A.T.; Cai, Z. Approaches to PET imaging of glioblastoma. *Molecules (Basel).* **2020**, *25*(3), 568.
- [57] Warburg, O, Minami, S. Versuche an uberlebendem carcinomgewebe. *Klin Wochenschr.* **1923**, *2*(17), 776–7.
- [58] Al Tameemi, W.; Dale, T.P.; Al-Jumaily, R.; Forsyth, N.R. Hypoxia-modified cancer cell metabolism. *Front Cell Dev Biol.* **2019**, *7*, 4.

- [59] Liberti, M.V.; Locasale, J.W. The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? *Trends Biochem Sci.* **2016**, 41(3), 211–218.
- [60] Vander Heiden, M.G.; Cantley, L.C.; Thompson, C.B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* **2009**, 324(5930), 1029–1033.
- [61] DeBerardinis, R.J.; Chandel, N.S. We need to talk about the Warburg effect. *Nat Metab.* **2020**, 2(2), 127–129.
- [62] Epstein, T.; Gatenby, R.A.; Brown, J.S. The Warburg effect as an adaptation of cancer cells to rapid fluctuations in energy demand. *PloS One.* **2017**, 12(9), e0185085.
- [63] Lin, X.; Xiao, Z.; Chen, T.; Liang, S.H.; Guo, H. Glucose metabolism on tumor plasticity, diagnosis, and treatment. *Front Oncol.* **2020**, 10, 317.
- [64] Vaupel, P.; Schmidberger, H.; Mayer, A. The Warburg effect: essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression. *Int J Radiat Biol.* **2019**, 95(7), 912-919.
- [65] Kalyanaraman, B. Teaching the basics of cancer metabolism: developing antitumor strategies by exploiting the differences between normal and cancer cell metabolism. *Redox Biol.* **2017**, 12, 833–842.
- [66] Berger, C.; Zdzienbilo, D. Glucose transporters in pancreatic islets. *Pflugers Arch.* **2020**, 472(9), 1249–1272.
- [67] Botha, H.; Farah, C.S.; Koo, K.; Cirillo, N.; McCullough, M.; Paolini, R.; Celentano, A. The role of glucose transporters in oral squamous cell carcinoma. *Biomolecules.* **2021**, 11(8), 1070.
- [68] Barbosa, A.M.; Martel, F. Targeting glucose transporters for breast cancer therapy: the effect of natural and synthetic compounds. *Cancers.* **2020**, 12(1), 154.
- [69] Reckzeh, E.S.; Waldmann, H. Small-molecule inhibition of glucose transporters GLUT1-4. *Chembiochem.* **2020**, 21(1-2), 45–52.
- [70] Kroemer, G.; Pouyssegur, J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell.* **2008**, 13(6), 472–482.
- [71] Hamanaka, R.B.; Chandel, N.S. Targeting glucose metabolism for cancer therapy. *J Exp Med.* **2012**, 209(2), 211–215.
- [72] Christofk, H.R.; Vander Heiden, M.G.; Harris, M.H.; Ramanathan, A.; Gerszten, R.E.; Wei, R.; Fleming, M.D.; Schreiber, S.L.; Cantley, L.C. The M2 splice isoform of pyruvate

kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*. **2008**, 452(7184), 230–233.

[73] Zhang, D.; Li, J.; Wang, F.; Hu, J.; Wang, S.; Sun, Y. 2-deoxy-d-glucose targeting of glucose metabolism in cancer cells as a potential therapy. *Cancer Lett*. **2014**, 355(2), 176–183.

[74] Pająk, B.; Siwiak, E.; Sołtyka, M.; Priebe, A.; Zieliński, R.; Fokt, I.; Ziemniak, M.; Jaśkiewicz, A.; Borowski, R.; Domoradzki, T.; Priebe, W. 2-deoxy-d-glucose and its analogs: from diagnostic to therapeutic agents. *Int J Mol Sci*. **2019**, 21(1), 234.

[75] Mole, D.R.; Blancher, C.; Copley, R.R.; Pollard, P.J.; Gleadle, J.M.; Ragoussis, J.; Ratcliffe, P.J. Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J Biol Chem*. **2009**, 284(25), 16767–16775.

[76] Iyer, N.V.; Kotch, L.E.; Agani, F.; Leung, S.W.; Laughner, E.; Wenger, R.H.; Gassmann, M.; Gearhart, J.D.; Lawler, A.M.; Yu, A.Y.; Semenza, G.L. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev*. **1998**, 12(2), 149–162.

[77] Masoud, G.N.; Li, W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. **2015**, 5(5), 378–389.

[78] Varghese, E.; Samuel, S.M.; Lišková, A.; Samec, M.; Kubatka, P.; Büsselberg, D. Targeting glucose metabolism to overcome resistance to anticancer chemotherapy in breast cancer. *Cancers*. **2020**, 12(8), 2252.

[79] Wei, J.; Huang, K.; Chen, Z.; Hu, M.; Bai, Y.; Lin, S.; Du, H. Characterization of glycolysis-associated molecules in the tumor microenvironment revealed by pan-cancer tissues and lung cancer single cell data. *Cancers*. **2020**, 12(7), 1788.

[80] Strickland, M.; Stoll, E.A. Metabolic reprogramming in glioma. *Front Cell Dev Biol*. **2017**, 5, 43.

[81] Agnihotri, S.; Zadeh, G. Metabolic reprogramming in glioblastoma: the influence of cancer metabolism on epigenetics and unanswered questions. *Neuro Oncol*. **2016**, 18(2), 160–172.

[82] Potemski, P. The molecular basis for treatment of gliomas. *Onkol Prakt Klin*. **2010**, 6(2), 73–78.

[83] Chen, C.; Shi, Y.; Li, Y.; He, Z.C.; Zhou, K.; Zhang, X.N.; Yang, K.D.; Wu, J.R.; Kung, H.F.; Ping, Y.F.; Bian, X.W. A glycolysis-based ten-gene signature correlates with the clinical

outcome, molecular subtype and *IDH1* mutation in glioblastoma. *J Gent Genomics*. **2017**, 44(11), 519–530.

[84] Shah, S.S.; Rodriguez, G.A.; Musick, A.; Walters, W.M.; de Cordoba, N.; Barbarite, E.; Marlow, M.M.; Marples, B.; Prince, J.S.; Komotar, R.J.; Vanni, S.; Graham, R.M. Targeting glioblastoma stem cells with 2-deoxy-d-glucose (2-DG) potentiates radiation-induced unfolded protein response (UPR). *Cancers*. **2019**, 11(2), 159.

[85] Coleman, M.C.; Asbury, C.R.; Daniels, D.; Du, J.; Aykin-Burns, N.; Smith, B.J.; Li, L.; Spitz, D.R.; Cullen, J.J. 2-deoxy-d-glucose causes cytotoxicity, oxidative stress, and radiosensitization in pancreatic cancer. *Free Radic Biol Med*. **2008**, 44(3):322-331.

[86] Dwarakanath, B.; Jain, V. Targeting glucose metabolism with 2-deoxy-d-glucose for improving cancer therapy. *Future Oncol*. **2009**, 5(5), 581–585.

[87] Wokoun, U.; Hellriegel, M.; Emons, G.; Gründker, C. Co-treatment of breast cancer cells with pharmacologic doses of 2-deoxy-d-glucose and metformin: starving tumors. *Oncol Rep*. **2017**, 37(4), 2418–2424.

[88] Maximchik, P.; Abdrakhmanov, A.; Inozemtseva, E.; Tyurin-Kuzmin, P.A.; Zhivotovsky, B.; Gogvadze, V. 2-deoxy-d-glucose has distinct and cell line-specific effects on the survival of different cancer cells upon antitumor drug treatment. *FEBS J*. **2018**, 285(24), 4590–4601.

[89] Matsuo, T.; Konya, Y.; Hirayama, E.; Sadzuka, Y. 2-deoxy-d-glucose enhances the anti-cancer effects of idarubicin on idarubicin-resistant p388 leukemia cells. *Oncol Lett*. **2020**, 20(1), 962–966.

[90] O'Neill, S.; Porter, R.K.; McNamee, N.; Martinez, V.G.; O'Driscoll, L. 2-deoxy-d-glucose inhibits aggressive triple-negative breast cancer cells by targeting glycolysis and the cancer stem cell phenotype. *Sci Rep*. **2019**, 9(1), 3788.

[91] Aft, R.L.; Zhang, F.W.; Gius, D. Evaluation of 2-deoxy-d-glucose as a chemotherapeutic agent: mechanism of cell death. *Br J Cancer*. **2002**, 87(7), 805–812.

[92] Ziemniak, M.; Zawadzka-Kazimierczuk, A.; Pawlędzio, S.; Malinska, M.; Sołtyka, M.; Trzybiński, D.; Koźmiński, W.; Skora, S.; Zieliński, R.; Fokt, I.; Priebe, W.; Woźniak, K.; Pa-
jąk, B. Experimental and computational studies on structure and energetic properties of halogen derivatives of 2-deoxy-d-glucose. *Int J Mol Sci*. **2021**, 22(7), 3720.

[93] Laussel, C.; Léon, S. Cellular toxicity of the metabolic inhibitor 2-deoxyglucose and associated resistance mechanisms. *Biochem Pharmacol*. **2020**, 182, 114213.

- [94] Cirillo, V.P. Relationship between sugar structure and competition for the sugar transport system in bakers' yeast. *J Bacteriol.* **1968**, 95(2), 603–611.
- [95] Xi, H.; Kurtoglu, M.; Lampidis, T.J. The wonders of 2-deoxy-d-glucose. *IUBMB Life.* **2014**, 66(2), 110–121.
- [96] Koepsell, H. Glucose transporters in the small intestine in health and disease. *Pflugers Arch.* **2020**, 472(9), 1207–1248.
- [97] Ralser, M.; Wamelink, M.M.; Struys, E.A.; Joppich, C.; Krobitch, S.; Jakobs, C.; Lehrach, H. A catabolic block does not sufficiently explain how 2-deoxy-d-glucose inhibits cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2008**, 105(46), 17807–17811.
- [98] Nile, D.L.; Rae, C.; Walker, D.J.; Waddington, J.C.; Vincent, I.; Burgess, K.; Gaze, M.N.; Mairs, R.J.; Chalmers, A.J. Inhibition of glycolysis and mitochondrial respiration promotes radiosensitisation of neuroblastoma and glioma cells. *Cancer Metab.* **2021**, 9(1), 24.
- [99] Bost, F.; Decoux-Poullot, A.G.; Tanti, J.F.; Clavel, S. Energy disruptors: rising stars in anticancer therapy? *Oncogenesis.* **2016**, 5(1), e188.
- [100] Xi, H.; Kurtoglu, M.; Liu, H.; Wangpaichitr, M.; You, M.; Liu, X.; Savaraj, N.; Lampidis, T.J. 2-deoxy-d-glucose activates autophagy via endoplasmic reticulum stress rather than ATP depletion. *Cancer Chemother Pharmacol.* **2011**, 67(4), 899–910.
- [101] Kavaliauskiene, S.; Skotland, T.; Sylvänne, T.; Simolin, H.; Klok, T.I.; Torgersen, M.L.; Lingelem, A.B.; Simm, R.; Ekroos, K.; Sandvig, K. Novel actions of 2-deoxy-d-glucose: protection against shiga toxins and changes in cellular lipids. *Biochem J.* **2015**, 470(1), 23–37.
- [102] Ishino, K.; Kudo, M.; Peng, W.X.; Kure, S.; Kawahara, K.; Teduka, K.; Kawamoto, Y.; Kitamura, T.; Fujii, T.; Yamamoto, T.; Wada, R.; Naito, Z. 2-deoxy-d-glucose increases GFAT1 phosphorylation resulting in endoplasmic reticulum-related apoptosis via disruption of protein N-glycosylation in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **2018**, 501(3), 668–673.
- [103] Andresen, L.; Skovbakke, S.L.; Persson, G.; Hagemann-Jensen, M.; Hansen, K.A.; Jensen, H.; Skov, S. 2-deoxy-d-glucose prevents cell surface expression of NKG2D ligands through inhibition of n-linked glycosylation. *J Immunol.* **2012**, 188(4), 1847–1855.
- [104] Berthe, A.; Zaffino, M.; Muller, C.; Foulquier, F.; Houdou, M.; Schulz, C.; Bost, F.; De Fay, E.; Mazerbourg, S.; Flament, S. Protein n-glycosylation alteration and glycolysis inhibition

both contribute to the antiproliferative action of 2-deoxyglucose in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* **2018**, 171(3), 581–591.

[105] Gu, L.; Yi, Z.; Zhang, Y.; Ma, Z.; Zhu, Y.; Gao, J. Low dose of 2-deoxy-d-glucose kills acute lymphoblastic leukemia cells and reverses glucocorticoid resistance via N-linked glycosylation inhibition under normoxia. *Oncotarget.* **2017**, 8(19), 30978–30991.

[106] Leni, Z.; Ćwiek, P.; Dimitrova, V.; Dulcey, A.S.; Zamboni, N.; Simillion, C.; Rossi, G.; Leibundgut, K.; Arcaro, A. 2-deoxy-d-glucose restore glucocorticoid sensitivity in acute lymphoblastic leukemia via modification of N-linked glycosylation in an oxygen tension-independent manner. *Oxid Med Cell Longev.* **2017**, 2487297.

[107] Kurtoglu, M.; Gao, N.; Shang, J.; Maher, J.C.; Lehrman, M.A.; Wangpaichitr, M.; Sava-raj, N.; Lane, A.N.; Lampidis, T.J. Under normoxia, 2-deoxy-d-glucose elicits cell death in select tumor types not by inhibition of glycolysis but by interfering with N-linked glycosylation. *Mol Cancer Ther.* **2007**, 6(11), 3049–3058.

[108] Hu, X.; Chen, F. Targeting on glycosylation of mutant FLT3 in acute myeloid leukemia. *Hematology.* **2019**, 24(1), 651–660.

[109] Merchan, J.R.; Kovács, K.; Railsback, J.W.; Kurtoglu, M.; Jing, Y.; Piña, Y.; Gao, N.; Murray, T.G.; Lehrman, M.A.; Lampidis, T.J. Antiangiogenic activity of 2-deoxy-d-glucose. *PloS One.* **2010**, 5(10), e13699.

[110] Ahadova, A.; Gebert, J.; von Knebel Doeberitz, M.; Kopitz, J.; Kloor, M. Dose-dependent effect of 2-deoxy-d-glucose on glycoprotein mannosylation in cancer cells. *IUBMB Life.* **2015**, 67(3), 218–226.

[111] Kaluza, G.; Schmidt, M.F.G.; Scholtissek, C. Effect of 2-deoxy-d-glucose on the multiplication of semliki forest virus and the reversal of the block by mannose. *Virology.* **1973**, 54(1), 179-189.

[112] Payne, L.G.; Kristensson, K. Effect of glycosylation inhibitors on the release of enveloped vaccinia virus. *J Virol.* **1982**, 41(2), 367–375.

[113] Feng, X.; Shi, Y.; Xie, L.; Zhang, K.; Wang, X.; Liu, Q.; Wang, P. 2-deoxy-d-glucose augments photodynamic therapy induced mitochondrial caspase-independent apoptosis and energy-mediated autophagy. *Lasers Surg Med.* **2019**, 51(4), 352–362.

[114] Barialai, L.; Strecker, M.I.; Luger, A.L.; Jäger, M.; Bruns, I.; Sittig, A.; Mildenerger, I.C.; Heller, S.M.; Delaidelli, A.; Lorenz, N.I.; Voss, M.; Ronellenfitsch, M.W.; Steinbach, J.P.;

- Burger, M.C. AMPK activation protects astrocytes from hypoxia-induced cell death. *Int J Mol Med.* **2020**, 45(5), 1385–1396.
- [115] Yun, H.R.; Jo, Y.H.; Kim, J.; Shin, Y.; Kim, S.S.; Choi, T.G. Roles of autophagy in oxidative stress. *Int J Mol Sci.* **2020**, 21(9), 3289.
- [116] Jeon, J.Y.; Kim, S.W.; Park, K.C.; Yun, M. The bifunctional autophagic flux by 2-deoxyglucose to control survival or growth of prostate cancer cells. *BMC Cancer.* **2015**, 15, 623.
- [117] Chu, Y.; Chang, Y.; Lu, W.; Sheng, X.; Wang, S.; Xu, H.; Ma, J. Regulation of autophagy by glycolysis in cancer. *Cancer Manag Res.* **2020**, 12, 13259–13271.
- [118] Yu, L.; Chen, Y.; Tooze, S.A. Autophagy pathway: cellular and molecular mechanisms. *Autophagy.* **2018**, 14(2), 207–215.
- [119] Yun, C.W.; Lee, S.H. The roles of autophagy in cancer. *Int J Mol Sci.* **2018**, 19(11), 3466.
- [120] Singh, S.S.; Vats, S.; Chia, A.Y.; Tan, T.Z.; Deng, S.; Ong, M.S.; Arfuso, F.; Yap, C.T.; Goh, B.C.; Sethi, G.; Huang, R.Y.; Shen, H.M.; Manjithaya, R.; Kumar, A.P. Dual role of autophagy in hallmarks of cancer. *Oncogene.* **2018**, 37(9), 1142–1158.
- [121] Xie, Q.; Liu, Y.; Li, X. The interaction mechanism between autophagy and apoptosis in colon cancer. *Transl Oncol.* **2020**, 13(12), 100871.
- [122] Cristofani, R.; Montagnani Marelli, M.; Cicardi, M.E.; Fontana, F.; Marzagalli, M.; Limonta, P.; Poletti, A.; Moretti, R.M. Dual role of autophagy on docetaxel-sensitivity in prostate cancer cells. *Cell Death Dis.* **2018**, 9(9), 1-19.
- [123] Yang, K.; Niu, L.; Bai, Y.; Le, W. Glioblastoma: targeting the autophagy in tumorigenesis. *Brain Res Bull.* **2019**, 153, 334–340.
- [124] Xu, Z.; Han, X.; Ou, D.; Liu, T.; Li, Z.; Jiang, G.; Liu, J.; Zhang, J. Targeting PI3K/Akt/mTOR-mediated autophagy for tumor therapy. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2020**, 104(2), 575–587.
- [125] Menon, M.B.; Dhamija, S. Beclin 1 phosphorylation - at the center of autophagy regulation. *Front Cell Dev Biol.* **2018**, 6, 137.
- [126] Jhanwar-Uniyal, M.; Wainwright, J.V.; Mohan, A.L.; Tobias, M.E.; Murali, R.; Gandhi, C.D.; Schmidt, M.H. Diverse signaling mechanisms of mTOR complexes: mtorc1 and mTORC2 in forming a formidable relationship. *Adv Biol Regul.* **2019**, 72, 51–62.

- [127] Chang, C.H.; Lee, C.Y.; Lu, C.C.; Tsai, F.J.; Hsu, Y.M.; Tsao, J.W.; Juan, Y.N.; Chiu, H.Y.; Yang, J.S.; Wang, C.C. Resveratrol-induced autophagy and apoptosis in cisplatin-resistant human oral cancer cells: a key role of AMPK and Akt/mTOR signaling. *Int J Oncol.* **2017**, *50*(3), 873–882.
- [128] Zhou, X.; Chen, Y.; Wang, F.; Wu, H.; Zhang, Y.; Liu, J.; Cai, Y.; Huang, S.; He, N.; Hu, Z.; Jin, X. Artesunate induces autophagy dependent apoptosis through upregulating ROS and activating AMPK-mTOR-ULK1 axis in human bladder cancer cells. *Chem Biol Interact.* **2020**, *331*, 109273.
- [129] Sundarraj, K.; Raghunath, A.; Panneerselvam, L.; Perumal, E. Fisetin inhibits autophagy in HEPG2 cells via PI3K/Akt/mTOR and AMPK pathway. *Nutr Cancer.* **2021**, *73*(11-12), 2502–2514.
- [130] Tian, T.; Li, X.; Zhang, J. mTOR signaling in cancer and mTOR inhibitors in solid tumor targeting therapy. *Int J Mol Sci.* **2019**, *20*(3), 755.
- [131] Corona Velazquez, A.F.; Jackson, W.T. So many roads: the multifaceted regulation of autophagy induction. *Mol Cell Biol.* **2018**, *38*(21), e00303-18.
- [132] Savitskaya, M.A.; Onishchenko, G.E. Mechanisms of apoptosis. *Biochemistry (Mosc).* **2015**, *80*(11), 1393–1405.
- [133] Jan, R.; Chaudhry, G.E. Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. *Adv Pharm Bull.* **2019**, *9*(2), 205–218.
- [134] Kretz, A.L.; von Karstedt, S.; Hillenbrand, A.; Henne-Bruns, D.; Knippschild, U.; Trauzold, A.; Lemke, J. Should we keep walking along the trail for pancreatic cancer treatment? revisiting TNF-related apoptosis-inducing ligand for anticancer therapy. *Cancers.* **2018**, *10*(3), 77.
- [135] Xu, P.; Sun, Y.; Song, Y.; Jiao, J.; Shen, B.; Li, W.; Jiang, C.; Li, Y.; Zhang, X.; Yu, J.; Fu, L.; Guo, X. Atm kinase regulates tumor immunoreactions in lymphocyte-predominant breast cancer through modulation of NKG2D ligand and TNF cytokines on tumor cells. *Med Mol Morphol.* **2020**, *53*(4), 210–220.
- [136] Ang, R.L.; Ting, A.T. Detection of ripk1 in the FADD-containing death inducing signaling complex (disc) during necroptosis. *Methods Mol Biol.* **2018**, *1857*, 101–107.
- [137] Mouasni, S.; Tourneur, L. FADD at the crossroads between cancer and inflammation. *Trends Immunol.* **2018**, *39*(12), 1036–1053.

- [138] Feltham, R.; Vince, J.E.; Lawlor, K.E. Caspase-8: not so silently deadly. *Clin Transl Immunology*. **2017**, 6(1), e124.
- [139] García-Aranda, M.; Pérez-Ruiz, E.; Redondo, M. Bcl-2 inhibition to overcome resistance to chemo- and immunotherapy. *Int J Mol Sci*. **2018**, 19(12), 3950.
- [140] Cavalcante, G.C.; Schaan, A.P.; Cabral, G.F.; Santana-da-Silva, M.N.; Pinto, P.; Vidal, A.F.; Ribeiro-Dos-Santos, Â. A Cell's Fate: An overview of the molecular biology and genetics of apoptosis. *Int J Mol Sci*. **2019**, 20(17), 4133.
- [141] Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. **2007**, 35(4), 495–516.
- [142] D'Orsi, B.; Mateyka, J.; Prehn, J. Control of mitochondrial physiology and cell death by the Bcl-2 family proteins Bax and Bok. *Neurochem Int*. **2017**, 109, 162–170.
- [143] Kale, J.; Osterlund, E.J.; Andrews, D.W. Bcl-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ*. **2018**, 25(1), 65–80.
- [144] Campbell, K.J.; Tait, S. Targeting Bcl-2 regulated apoptosis in cancer. *Open Biol*. **2018**, 8(5), 180002.
- [145] Zhao, X.Y.; Wang, X.Y.; Wei, Q.Y.; Xu, Y.M.; Lau, A. Potency and selectivity of Smac/Diablo mimetics in solid tumor therapy. *Cells*. **2020**, 9(4), 1012.
- [146] Kalkavan, H.; Green, D.R. Momp, cell suicide as a Bcl-2 family business. *Cell Death Differ*. **2018**, 25(1), 46–55.
- [147] Yadav, N.; Gogada, R.; O'Malley, J.; Gundampati, R.K.; Jayanthi, S.; Hashmi, S.; Lella, R.; Zhang, D.; Wang, J.; Kumar, R.; Suresh Kumar, T.K.; Chandra, D. Molecular insights on cytochrome c and nucleotide regulation of apoptosome function and its implication in cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. **2020**, 1867(1), 118573.
- [148] Dorstyn, L.; Akey, C. W.; Kumar, S. New insights into apoptosome structure and function. *Cell Death Differ*. **2018**, 25(7), 1194–1208.
- [149] Negara, K.S.; Suwiyoga, K.; Sudewi, R.; Astawa, N.M.; Arijana, G.; Tunas, K.; Pemayun, T. The role of caspase-dependent and caspase-independent pathways of apoptosis in the premature rupture of the membranes: a case-control study. *Int J Reprod Biomed*. **2020**, 18(6), 439–448.
- [150] Li, L.Y.; Luo, X.; Wang, X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. **2001**, 412(6842), 95-99.

- [151] Schleich, K.; Lavrik, I.N. Mathematical modeling of apoptosis. *Cell Commun Signal.* **2013**, 11(1):44.
- [152] Carrington, E.M.; Zhan, Y.; Brady, J.L.; Zhang, J.G.; Sutherland, R.M.; Anstee, N.S.; Schenk, R.L.; Vikstrom, I.B.; Delconte, R.B.; Segal, D.; Huntington, N.D.; Bouillet, P.; Tarlinton, D.M.; Huang, D.C.; Strasser, A.; Cory, S.; Herold, M.J.; Lew, A.M. Anti-apoptotic proteins Bcl-2, Mcl-1 and A1 summate collectively to maintain survival of immune cell populations both in vitro and in vivo. *Cell Death Differ.* **2017**, 24(5), 878–888.
- [153] Maji, S.; Panda, S.; Samal, S.K.; Shriwas, O.; Rath, R.; Pellecchia, M.; Emdad, L.; Das, S.K.; Fisher, P.B.; Dash, R. Bcl-2 antiapoptotic family proteins and chemoresistance in cancer. *Adv Cancer Res.* **2018**, 137, 37–75.
- [154] Opferman, J.T.; Kothari, A. Anti-apoptotic Bcl-2 family members in development. *Cell Death Differ.* **2018**, 25(1), 37–45.
- [155] García-Sáez, A.J. The Bcl-2 family saga. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2020**, 21(10), 564–565.
- [156] Uzdensky, A.B. Apoptosis regulation in the penumbra after ischemic stroke: expression of pro- and antiapoptotic proteins. *Apoptosis.* **2019**, 24(9-10), 687–702.
- [157] Lindenboim, L.; Zohar, H.; Worman, H.J.; Stein, R. The nuclear envelope: target and mediator of the apoptotic process. *Cell Death Discov.* **2020**, 6:29.
- [158] Xu, Y.; Wang, Q.; Zhang, L.; Zheng, M. 2-deoxy-d-glucose enhances trail-induced apoptosis in human gastric cancer cells through downregulating JNK-mediated cytoprotective autophagy. *Cancer Chemother Pharmacol.* **2018**, 81(3), 555–564.
- [159] Liu, H.; Jiang, C.C.; Lavis, C.J.; Croft, A.; Dong, L.; Tseng, H.Y.; Yang, F.; Tay, K.H.; Hersey, P.; Zhang, X.D. 2-deoxy-d-glucose enhances trail-induced apoptosis in human melanoma cells through XBP-1-mediated up-regulation of TRAIL-R2. *Mol Cancer.* **2009**, 8, 122.
- [160] Zhang, Y.; Huang, F.; Wang, J.; Luo, H.; Wang, Z. 2-DG-regulated RIP and c-FLIP effect on liver cancer cell apoptosis induced by trail. *Med Sci Monit.* **2015**, 21, 3442–3448.
- [161] Wang, Q.; Liang, B.; Shirwany, N.A.; Zou, M.H. 2-deoxy-d-glucose treatment of endothelial cells induces autophagy by reactive oxygen species-mediated activation of the amp-activated protein kinase. *PLoS One.* **2011**, 6(2), e17234.
- [162] Saraswat, K.; Kumar, R.; Rizvi, S.I. Glycolytic inhibitor 2-deoxy-d-glucose at chronic low dose mimics calorie restriction in rats through mitohormetic induction of reactive oxygen species. *Rejuvenation Res.* **2019**, 22(5), 377–384.

- [163] Jalota, A.; Kumar, M.; Das, B.C.; Yadav, A.K.; Chosdol, K.; Sinha, S. Synergistic increase in efficacy of a combination of 2-deoxy-d-glucose and cisplatin in normoxia and hypoxia: switch from autophagy to apoptosis. *Tumour Biol.* **2016**, 37(9), 12347–12358.
- [164] Simons, A.L.; Ahmad, I.M.; Mattson, D.M.; Dornfeld, K.J.; Spitz, D.R. 2-deoxy-d-glucose combined with cisplatin enhances cytotoxicity via metabolic oxidative stress in human head and neck cancer cells. *Cancer Res.* **2007**, 67(7), 3364–3370.
- [165] Valera, V.; Ferretti, M.J.; Prabharasuth, D.D.; Chaimowitz, M.; Choudhury, M.; Phillips, J.L.; Konno, S. Is targeting glycolysis with 2-deoxyglucose a viable therapeutic approach to bladder cancer? *Int J Cancer Ther Oncol.* **2017**, 5:511.
- [166] Raez, L.E.; Papadopoulos, K.; Ricart, A.D.; Chiorean, E.G.; Dipaola, R.S.; Stein, M.N.; Rocha Lima, C.M.; Schlesselman, J.J.; Tolba, K.; Langmuir, V.K.; Kroll, S.; Jung, D.T.; Kurtoglu, M.; Rosenblatt, J.; Lampidis, T.J. A phase I dose-escalation trial of 2-deoxy-d-glucose alone or combined with docetaxel in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* **2013**, 71(2), 523–530.
- [167] Bizjak, M.; Malavašič, P.; Dolinar, K.; Pohar, J.; Pirkmajer, S.; Pavlin, M. Combined treatment with metformin and 2-deoxy glucose induces detachment of viable MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro. *Sci Rep.* **2017**, 7(1), 1761.
- [168] Bi, C.; Fu, K.; Jiang, C.; Huang, X.; Chan, W.C.; McKeithan T. The combination of 2-DG and metformin inhibits the mtorc1 pathway and suppresses aggressive B cell lymphoma growth and survival. *Blood.* **2013**, 122:1665.
- [169] Zhu, J.; Zheng, Y.; Zhang, H.; Sun, H. Targeting cancer cell metabolism: the combination of metformin and 2-deoxyglucose regulates apoptosis in ovarian cancer cells via p38 MAPK/JNK signaling pathway. *Am J Transl Res.* **2016**, 8(11), 4812–4821.
- [170] Kim, E.H.; Lee, J.H.; Oh, Y.; Koh, I.; Shim, J.K.; Park, J.; Choi, J.; Yun, M.; Jeon, J.Y.; Huh, Y.M.; Chang, J.H.; Kim, S.H.; Kim, K.S.; Cheong, J.H.; Kim, P.; Kang, S.G. Inhibition of glioblastoma tumorspheres by combined treatment with 2-deoxyglucose and metformin. *Neuro Oncol.* **2017**, 19(2), 197–207.
- [171] Pattni, B.S.; Jhaveri, A.; Dutta, I.; Baleja, J.D.; Degterev, A.; Torchilin, V. Targeting energy metabolism of cancer cells: combined administration of ncl-240 and 2-DG. *Int J Pharm.* **2017**, 532(1), 149–156.

- [172] Wang, S.Y.; Wei, Y.H.; Shieh, D.B.; Lin, L.L.; Cheng, S.P.; Wang, P.W.; Chuang, J.H. 2-deoxy-d-glucose can complement doxorubicin and sorafenib to suppress the growth of papillary thyroid carcinoma cells. *PLoS One*. **2015**, 10(7), e0130959.
- [173] Ahmad, I.M.; Mustafa, E.H.; Mustafa, N.H.; Tahtamouni, L.H.; Abdalla, M.Y. 2-DG enhances the susceptibility of breast cancer cells to doxorubicin. *Cent Eur J Biol*. **2010**, 5:739–748.
- [174] Mustafa, E.H.; Mahmoud, H.T.; Al-Hudhud, M.Y.; Abdalla, M.Y.; Ahmad, I.M.; Yasin, S.R.; Elkarmi, A.Z.; Tahtamouni, L.H. 2-deoxy-d-glucose synergizes with doxorubicin or l-buthionine sulfoximine to reduce adhesion and migration of breast cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev*. **2015**, 16(8), 3213–3222.
- [175] Cao, X.; Fang, L.; Gibbs, S.; Huang, Y.; Dai, Z.; Wen, P.; Zheng, X.; Sadee, W.; Sun, D. Glucose uptake inhibitor sensitizes cancer cells to daunorubicin and overcomes drug resistance in hypoxia. *Cancer Chemother Pharmacol*. **2007**, 59(4), 495–505.
- [176] Reyes, R.; Wani, N.A.; Ghoshal, K.; Jacob, S.T.; Motiwala, T. Sorafenib and 2-deoxyglucose synergistically inhibits proliferation of both sorafenib-sensitive and -resistant HCC cells by inhibiting atp production. *Gene Expr*. **2017**, 17(2), 129–140.
- [177] Tomizawa, M.; Shinozaki, F.; Motoyoshi, Y.; Sugiyama, T.; Yamamoto, S.; Ishige, N. 2-deoxyglucose and sorafenib synergistically suppress the proliferation and motility of hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Lett*. **2017**, 13(2), 800–804.
- [178] Maschek, G.; Savaraj, N.; Priebe, W.; Braunschweiger, P.; Hamilton, K.; Tidmarsh, G.F.; De Young, L.R.; Lampidis, T.J. 2-deoxy-d-glucose increases the efficacy of adriamycin and paclitaxel in human osteosarcoma and non-small cell lung cancers in vivo. *Cancer Res*. **2004**, 64(1), 31–34.
- [179] Zhelev, Z.; Ivanova, D.; Aoki, I.; Saga, T.; Bakalova, R. 2-deoxy-d-glucose sensitizes cancer cells to Barasertib and Everolimus by ROS-independent mechanism(s). *Anticancer Res*. **2015**, 35(12), 6623–6632.
- [180] Goldberg, L.; Israeli, R.; Kloog, Y. FTS and 2-DG induce pancreatic cancer cell death and tumor shrinkage in mice. *Cell Death Dis*. **2012**, 3(3), e284.
- [181] Fan, L.X.; Liu, C.M.; Gao, A.H.; Zhou, Y.B.; Li, J. Berberine combined with 2-deoxy-d-glucose synergistically enhances cancer cell proliferation inhibition via energy depletion and unfolded protein response disruption. *Biochim Biophys Acta*. **2013**, 1830(11), 5175–5183.

- [182] Liu, H.; Kurtoglu, M.; León-Annicchiarico, C.L.; Munoz-Pinedo, C.; Barredo, J.; Leclerc, G.; Merchan, J.; Liu, X.; Lampidis, T.J. Combining 2-deoxy-d-glucose with fenofibrate leads to tumor cell death mediated by simultaneous induction of energy and ER stress. *Oncotarget*. **2016**, 7(24), 36461–36473.
- [183] Grahame, Hardie D. Regulation of amp-activated protein kinase by natural and synthetic activators. *Acta Pharm Sin B*. **2016**, 6(1), 1–19.
- [184] Cheng, G.; Zielonka, J.; Dranka, B.P.; McAllister, D.; Mackinnon, A.C.; Jr, Joseph, J.; Kalyanaraman, B. Mitochondria-targeted drugs synergize with 2-deoxyglucose to trigger breast cancer cell death. *Cancer Res*. **2012**, 72(10), 2634–2644.
- [185] Pang, Y.Y.; Wang, T.; Chen, F.Y.; Wu, Y.L.; Shao, X.; Xiao, F.; Huang, H.H.; Zhong, H.; Zhong, J.H. Glycolytic inhibitor 2-deoxy-d-glucose suppresses cell proliferation and enhances methylprednisolone sensitivity in Non-Hodgkin Lymphoma cells through down-regulation of hif-1 α and c-myc. *Leuk. Lymphoma*. **2015**, 56(6), 1821–1830.
- [186] Lei, X.; Li, K.; Liu, Y.; Wang, Z.Y.; Ruan, B.J.; Wang, L.; Xiang, A.; Wu, D.; Lu, Z. Co-delivery nanocarriers targeting folate receptor and encapsulating 2-deoxyglucose and α -tocopherol succinate enhance anti-tumor effect in vivo. *Int J Nanomedicine*. **2017**, 12, 5701–5715.
- [187] Kim, S.M.; Yun, M.R.; Hong, Y.K.; Solca, F.; Kim, J.H.; Kim, H.J.; Cho, B.C. Glycolysis inhibition sensitizes non-small cell lung cancer with t790m mutation to irreversible EGFR inhibitors via translational suppression of Mcl-1 by AMPK activation. *Mol Cancer Ther*. **2013**, 12(10), 2145–2156.
- [188] Gupta, S.; Mathur, R.; Dwarakanath, B.S. The glycolytic inhibitor 2-deoxy-d-glucose enhances the efficacy of etoposide in Ehrlich ascites tumor-bearing mice. *Cancer Biol Ther*. **2005**, 4(1), 87–94.
- [189] Gao, C.; Shen, Y.; Jin, F.; Miao, Y.; Qiu, X. Cancer stem cells in small cell lung cancer cell line h446: higher dependency on oxidative phosphorylation and mitochondrial substrate-level phosphorylation than non-stem cancer cells. *PloS One*. **2016**, 11(5), e0154576.
- [190] Kennedy, C.R.; Tilkens, S.B.; Guan, H.; Garner, J.A.; Or, P.M.; Chan, A.M. Differential sensitivities of glioblastoma cell lines towards metabolic and signaling pathway inhibitions. *Cancer Lett*. **2013**, 336(2), 299–306.

- [191] Miranda-Gonçalves, V.; Cardoso-Carneiro, D.; Valbom, I.; Cury, F.P.; Silva, V.A.; Granja, S.; Reis, R.M.; Baltazar, F.; Martinho, O. Metabolic alterations underlying bevacizumab therapy in glioblastoma cells. *Oncotarget*. **2017**, 8(61), 103657–103670.
- [192] Cheng, Y.; Diao, D.; Zhang, H.; Guo, Q.; Wu, X.; Song, Y.; Dang, C. High glucose-induced resistance to 5-fluorouracil in pancreatic cancer cells alleviated by 2-deoxy-d-glucose. *Biomed Rep*. **2014**, 2(2), 188–192.
- [193] Zhao, Y.; Liu, H.; Liu, Z.; Ding, Y.; Ledoux, S.P.; Wilson, G.L.; Voellmy, R.; Lin, Y.; Lin, W.; Nahta, R.; Liu, B.; Fodstad, O.; Chen, J.; Wu, Y.; Price, J.E.; Tan, M. Overcoming Trastuzumab resistance in breast cancer by targeting dysregulated glucose metabolism. *Cancer Res*. **2011**, 71(13), 4585–4597.
- [194] Li, L.; Fath, M.A.; Scarbrough, P.M.; Watson, W.H.; Spitz, D.R. Combined inhibition of glycolysis, the pentose cycle, and thioredoxin metabolism selectively increases cytotoxicity and oxidative stress in human breast and prostate cancer. *Redox Biol*. **2015**, 4, 127–135.
- [195] Reddy, B.V.; Prasad, N.R. 2-deoxy-d-glucose combined with ferulic acid enhances radiation response in non-small cell lung carcinoma cells. *Cent Eur J Biol*. **2011**, 6:743.
- [196] Singh, D.; Banerji, A.K.; Dwarakanath, B.S.; Tripathi, R.P.; Gupta, J.P.; Mathew, T.L.; Ravindranath, T.; Jain, V. Optimizing cancer radiotherapy with 2-deoxy-d-glucose dose escalation studies in patients with glioblastoma multiforme. *Strahlenther Onkol*. **2005**, 181(8), 507–514.
- [197] Rae, C.; Sey, C.H.C.; Mairs, R.J. Radiosensitization of prostate cancer cells by 2-deoxy-d-glucose. *Madridge J Oncogen*. **2018**, 2:30–34.
- [198] Lin, X.; Zhang, F.; Bradbury, C.M.; Kaushal, A.; Li, L.; Spitz, D.R.; Aft, R.L.; Gius, D. 2-deoxy-d-glucose-induced cytotoxicity and radiosensitization in tumor cells is mediated via disruptions in thiol metabolism. *Cancer Res*. **2003**, 63(12), 3413–3417.
- [199] Sørensen, B.S.; Horsman, M.R. Tumor hypoxia: impact on radiation therapy and molecular pathways. *Front Oncol*. **2020**, 10, 562.
- [200] Liu, H.; Hu, Y.P.; Savaraj, N.; Priebe, W.; Lampidis, T.J. Hypersensitization of tumor cells to glycolytic inhibitors. *Biochemistry*. **2001**, 40(18), 5542–5547.
- [201] Choi, S.Y.; Heo, M.J.; Lee, C.; Choi, Y.M.; An, I.S.; Bae, S.; An, S.; Jung, J.H. 2-deoxy-d-glucose ameliorates animal models of dermatitis. *Biomedicines*. **2020**, 8(2), 20.

- [202] Minor, R.K.; Smith, D.L.; Jr, Sossong, A.M.; Kaushik, S.; Poosala, S.; Spangler, E.L.; Roth, G.S.; Lane, M.; Allison, D.B.; de Cabo, R.; Ingram, D.K.; Mattison, J.A. Chronic ingestion of 2-deoxy-d-glucose induces cardiac vacuolization and increases mortality in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* **2010**, 243(3), 332–339.
- [203] Dwarakanath, B.S. Cytotoxicity, radiosensitization, and chemosensitization of tumor cells by 2-deoxy-d-glucose in vitro. *J Cancer Res Ther.* **2009**, 5 Suppl 1, S27–S31.
- [204] Huang, X.M.; Huang, J.J.; Du, J.J.; Zhang, N.; Long, Z.; Yang, Y.; Zhong, F.F.; Zheng, B.W.; Shen, Y.F.; Huang, Z.; Qin, X.; Chen, J.H.; Lin, Q.Y.; Lin, W.J.; Ma, W.Z. Autophagy inhibitors increase the susceptibility of kRAS-mutant human colorectal cancer cells to a combined treatment of 2-deoxy-d-glucose and Lovastatin. *Acta Pharmacol Sin.* **2021**, 42(11), 1875–1887.
- [205] Khan, T.; He, Y.; Kryza, T.; Harrington, B.S.; Gunter, J.H.; Sullivan, M.A.; Cuda, T.; Rogers, R.; Davies, C.M.; Broomfield, A.; Gough, M.; Wu, A.C.; McGann, T.; Weroha, S.J.; Haluska, P.; Forbes, J.M.; Armes, J.E.; Barry, S.C.; Coward, J.I.; Jagasia, N.; Hooper, J.D. Disruption of glycogen utilization markedly improves the efficacy of carboplatin against pre-clinical models of clear cell ovarian carcinoma. *Cancers.* **2020**, 12(4), 869.
- [206] Lampidis, T.J.; Kurtoglu, M.; Maher, J.C.; Liu, H.; Krishan, A.; Sheft, V.; Szymanski, S.; Fokt, I.; Rudnicki, W.R.; Ginalski, K.; Lesyng, B.; Priebe, W. Efficacy of 2-halogen substituted d-glucose analogs in blocking glycolysis and killing “hypoxic tumor cells”. *Cancer Chemother Pharmacol.* **2006**, 58, 725.
- [207] Pimentel, E.; Sivalingam, K.; Doke, M.; Samikkannu, T. Effects of drugs of abuse on the blood-brain barrier: a brief overview. *Front Neurosci.* **2020**, 14, 513.
- [208] Priebe, W.; Zielinski, R.; Fokt, I.; Felix, E.; Radjendirane, V.; Arumugam, J.; Tai Khuong, M.; Krasinski, M.; Skora, S. Exth-07. design and evaluation of WP1122, in inhibitor of glycolysis with increased CNS uptake. *Neuro Oncol.* **2018**, 20, vi86.
- [209] Michel, K.A.; Zieliński, R.; Walker, C.M.; Le Roux, L.; Priebe, W.; Bankson, J. A.; Schellingerhout, D. Hyperpolarized pyruvate MR spectroscopy depicts glycolytic inhibition in a mouse model of glioma. *Radiology.* **2019**, 293(1), 168–173.
- [210] Lu, Y.; Chan, Y.T.; Tan, H.Y.; Li, S.; Wang, N.; Feng, Y. Epigenetic regulation in human cancer: the potential role of epi-drug in cancer therapy. *Mol Cancer.* **2020**, 19(1), 79.

- [211] Baylin, S.B.; Jones, P.A. Epigenetic determinants of cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2016**, 8(9), a019505.
- [212] Lønning, P.E.; Eikesdal, H.P.; Løes, I.M.; Knappskog, S. Constitutional mosaic epimutations - a hidden cause of cancer? *Cell Stress.* **2019**, 3(4), 118–135.
- [213] Peltomäki, P. Mutations and epimutations in the origin of cancer. *Exp Cell Res.* **2012**, 318(4), 299–310.
- [214] Lee, E.Y.; Muller, W.J. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2010**, 2(10), a003236.
- [215] Citron, F.; Fabris, L. Targeting epigenetic dependencies in solid tumors: evolutionary landscape beyond germ layers origin. *Cancers.* **2020**, 12(3), 682.
- [216] Allfrey, V.G.; Faulkner, R.; Mirsky, A.E. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1964**, 51(5), 786–794.
- [217] Park, S.; Kim, J. A short guide to histone deacetylases including recent progress on class II enzymes. *Exp Mol Med.* **2020**, 52, 204–212.
- [218] Lozoya, O.A.; Wang, T.; Grenet, D.; Wolfgang, T.C.; Sobhany, M.; Ganini da Silva, D.; Riadi, G.; Chandel, N.; Woychik, R.P.; Santos, J.H. Mitochondrial acetyl-CoA reversibly regulates locus-specific histone acetylation and gene expression. *Life Sci Alliance.* **2019**, 2(1), e201800228.
- [219] Gallinari, P.; Marco, S.; Jones, P.; Pallaoro, M.; Steinkuhler, Ch. HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. *Cell Res.* **2007**, 17, 195–211.
- [220] Sun, J.; Perdue, T.D.; Quick, K. Transcription and cancer in eukaryotes. *J Stud Res.* **2021**, 10(1).
- [221] Bannister, A.J.; Kouzarides, T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* **2011**, 21(3), 381–395.
- [222] Seto, E.; Yoshida, M. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2014**, 6(4), a018713.
- [223] Zhou, M.; Yuan, M.; Zhang, M.; Lei, C.; Aras, O.; Zhang, X.; An, F. Combining histone deacetylase inhibitors (HDACis) with other therapies for cancer therapy. *Eur J Med Chem.* **2021**, 226, 113825.

- [224] Sanaei, M.; Kavooosi, F. Histone deacetylases and histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action in various cancers. *Adv Biomed Res.* **2019**, *8*, 63.
- [225] Hassell, K.N. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer epigenetics. *Diseases.* **2019**, *7*(4), 57.
- [226] Ververis, K.; Hiong, A.; Karagiannis, T.C.; Licciardi, P.V. Histone deacetylase inhibitors (HDACis): multitargeted anticancer agents. *Biologics.* **2013**, *7*, 47–60.
- [227] Verza, F.A.; Das, U.; Fachin, A.L.; Dimmock, J.R.; Marins, M. Roles of histone deacetylases and inhibitors in anticancer therapy. *Cancers.* **2020**, *12*(6), 1664.
- [228] San José-Enériz, E.; Gimenez-Camino, N.; Agirre, X.; Prosper, F. HDAC inhibitors in acute myeloid leukemia. *Cancers.* **2019**, *11*(11), 1794.
- [229] Morrison, A.J. Cancer cell metabolism connects epigenetic modifications to transcriptional regulation. *FEBS J.* **2022**, 289:1302–14.
- [230] Mottet, D.; Castronovo, V. Histone deacetylases: target enzymes for cancer therapy. *Clin Exp Metastasis.* **2008**, *25*(2), 183-189.
- [231] Guo, P.; Chen, W.; Li, H.; Li, M.; Li, L. The histone acetylation modifications of breast cancer and their therapeutic implications. *Pathol Oncol Res.* **2018**, *24*(4), 807–813.
- [232] Cheng, Y.; He, C.; Wang, M.; Ma, X.; Mo, F.; Yang, S.; Han, J.; Wei, X. Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: mechanisms and advances in clinical trials. *Signal Transduct Target Ther.* **2019**, *4*, 62.
- [233] Eckschlager, T.; Plch, J.; Stiborova, M.; Hrabeta, J. Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. *Int J Mol Sci.* **2017**, *18*(7), 1414.
- [234] Gilardini Montani, M.S.; Granato, M.; Santoni, C.; Del Porto, P.; Merendino, N.; D'Orazi, G.; Faggioni, A.; Cirone, M. Histone deacetylase inhibitors VPA and TSA induce apoptosis and autophagy in pancreatic cancer cells. *Cell Oncol (Dordr).* **2017**, *40*(2), 167–180.
- [235] Chen, R.; Zhang, M.; Zhou, Y.; Guo, W.; Yi, M.; Zhang, Z.; Ding, Y.; Wang, Y. The application of histone deacetylases inhibitors in glioblastoma. *J Exp Clin Cancer Res.* **2020**, *39*(1), 138.
- [236] Han, A.; Bennett, N.; Ahmed, B.; Whelan, J.; Donohoe, D.R. Butyrate decreases its own oxidation in colorectal cancer cells through inhibition of histone deacetylases. *Oncotarget.* **2018**, *9*(43), 27280–27292.

- [237] Semaan, J.; El-Hakim, S.; Ibrahim, J.N.; Safi, R.; Elnar, A.A.; El Boustany, C. Comparative effect of sodium butyrate and sodium propionate on proliferation, cell cycle and apoptosis in human breast cancer cells mcf-7. *Breast Cancer*. **2020**, 27(4), 696–705.
- [238] Sun, Y.; Sun, Y.; Yue, S.; Wang, Y.; Lu, F. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *Curr Top Med Chem*. **2018**, 18(28), 2420–2428.
- [239] Mann, B.S.; Johnson, J.R.; Cohen, M.H.; Justice, R.; Pazdur, R. Fda approval summary: Vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous t-cell lymphoma. *Oncologist*. **2007**, 12(10), 1247–1252.
- [240] Barbarotta, L.; Hurley, K. Romidepsin for the treatment of peripheral T-cell lymphoma. *J Adv Pract Oncol*. **2015**, 6(1), 22–36.
- [241] Sawas, A.; Radeski, D.; O'Connor, O.A. Belinostat in patients with refractory or relapsed peripheral T-cell lymphoma: a perspective review. *Ther Adv Hematol.*, **2015**, 6(4), 202–208.
- [242] Yee, A.J.; Raje, N.S. Panobinostat and multiple myeloma in 2018. *Oncologist*. **2018**, 23(5), 516–517.
- [243] Mottamal, M.; Zheng, S.; Huang, T.L.; Wang, G. Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents. *Molecules* **2015**, 20(3), 3898–3941.
- [244] Suraweera, A.; O'Byrne, K.J.; Richard, D.J. Combination therapy with histone deacetylase inhibitors (HDACi) for the treatment of cancer: achieving the full therapeutic potential of HDACi. *Front Oncol*. **2018**, 8, 92.
- [245] Vigushin, D.M.; Coombes, R.C. Histone deacetylase inhibitors in cancer treatment. *Anticancer Drugs*. **2002**, 13(1), 1–13.
- [246] Wang, W.; Fang, D.; Zhang, H.; Xue, J.; Wangchuk, D.; Du, J.; Jiang, L. Sodium butyrate selectively kills cancer cells and inhibits migration in colorectal cancer by targeting thioredoxin-1. *Onco Targets Ther*. **2020**, 13, 4691–4704.
- [247] Chen, J.; Zhao, K.N.; Vitetta, L. Effects of intestinal microbial elaborated butyrate on oncogenic signaling pathways. *Nutrients*. **2019**, 11(5), 1026.
- [248] Salimi, V.; Shahsavari, Z.; Safizadeh, B.; Hosseini, A.; Khademian, N.; Tavakoli-Yaraki, M. Sodium butyrate promotes apoptosis in breast cancer cells through reactive oxygen species (ROS) formation and mitochondrial impairment. *Lipids Health Dis*. **2017**, 16(1), 208.

- [249] Xu, Z.; Tao, J.; Chen, P.; Chen, L.; Sharma, S.; Wang, G.; Dong, Q. Sodium butyrate inhibits colorectal cancer cell migration by downregulating bmi-1 through enhanced mir-200c expression. *Mol Nutr Food Res*. **2018**, 62(6), e1700844.
- [250] Terranova-Barberio, M.; Roca, M.S.; Zotti, A.I.; Leone, A.; Bruzzese, F.; Vitagliano, C.; Scogliamiglio, G.; Russo, D.; D'Angelo, G.; Franco, R.; Budillon, A.; Di Gennaro, E. Valproic acid potentiates the anticancer activity of capecitabine in vitro and in vivo in breast cancer models via induction of thymidine phosphorylase expression. *Oncotarget*. **2016**, 7(7), 7715–7731.
- [251] Lipska, K.; Gumieniczek, A.; Filip, A.A. Anticonvulsant valproic acid and other short-chain fatty acids as novel anticancer therapeutics: possibilities and challenges. *Acta Pharm*. **2020**, 70(3), 291–301.
- [252] Tarasenko, N.; Chekroun-Setti, H.; Nudelman, A.; Rephaeli, A. Comparison of the anti-cancer properties of a novel valproic acid prodrug to leading histone deacetylase inhibitors. *J Cell Biochem*. **2018**, 119(4), 3417–3428.
- [253] Pająk, B.; Orzechowski, A.; Gajkowska, B. Molecular basis of sodium butyrate-dependent proapoptotic activity in cancer cells. *Adv Med Sci*. **2007**, 52, 83–88.
- [254] Facchin, S.; Vitulo, N.; Calgaro, M.; Buda, A.; Romualdi, C.; Pohl, D.; Perini, B.; Lorenzon, G.; Marinelli, C.; D'Inca, R.; Sturniolo, G.C.; Savarino, E.V. Microbiota changes induced by microencapsulated sodium butyrate in patients with inflammatory bowel disease. *Neurogastroenterol Motil*. **2020**, 32(10), e13914.
- [255] Nakagawa, H.; Sasagawa, S.; Itoh, K. Sodium butyrate induces senescence and inhibits the invasiveness of glioblastoma cells. *Oncol Lett*. **2018**, 15(2), 1495–1502.
- [256] Sawa, H.; Murakami, H.; Ohshima, Y.; Murakami, M.; Yamazaki, I.; Tamura, Y.; Mima, T.; Satone, A.; Ide, W.; Hashimoto, I.; Kamada, H. Histone deacetylase inhibitors such as sodium butyrate and trichostatin a inhibit vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from human glioblastoma cells. *Brain Tumor Pathol*. **2002**, 19(2), 77–81.
- [257] Yao, R.; Han, D.; Sun, X.; Fu, C.; Wu, Q.; Yao, Y.; Li, H.; Li, Z.; Xu, K. Histone deacetylase inhibitor NaBt suppresses cell proliferation and induces apoptosis by targeting p21 in multiple myeloma. *Am J Transl Res*. **2017**, 9(11), 4994–5002.

- [258] Engelhard, H.H.; Duncan, H.A.; Kim, S.; Criswell, P.S.; Van Eldik, L. Therapeutic effects of sodium butyrate on glioma cells in vitro and in the rat c6 glioma model. *Neurosurgery*. **2001**, 48(3), 616–625.
- [259] Edwards, J.D.; Butchbach, M.E. Effect of the butyrate prodrug pivaloyloxymethyl butyrate (AN9) on a mouse model for spinal muscular atrophy. *J Neuromuscul Dis*. **2016**, 3(4), 511–515.
- [260] Kusaczuk, M.; Krętowski, R.; Bartoszewicz, M.; Cechowska-Pasko, M. Phenylbutyrate—a pan-HDAC inhibitor—suppresses proliferation of glioblastoma LN-229 cell line. *Tumour Biol*. **2016**, 37(1), 931–942.
- [261] Michaelis, M.; Doerr, H.W.; Cinatl, J. Valproic acid as anti-cancer drug. *Curr Pharm Des*. **2007**, 13(33), 3378–3393.
- [262] Romoli, M.; Mazzocchetti, P.; D'Alonzo, R.; Siliquini, S.; Rinaldi, V.E.; Verrotti, A.; Calabresi, P.; Costa, C. Valproic acid and epilepsy: from molecular mechanisms to clinical evidences. *Curr Neuropharmacol*. **2019**, 17(10), 926–946.
- [263] Abaza, M.S.; Bahman, A.M.; Al-Attayah, R.J. Valproic acid, an anti-epileptic drug and a histone deacetylase inhibitor, in combination with proteasome inhibitors exerts antiproliferative, pro-apoptotic and chemosensitizing effects in human colorectal cancer cells: underlying molecular mechanisms. *Int J Mol Med*. **2014**, 34(2), 513–532.
- [264] Riva, G.; Cilibrasi, C.; Bazzoni, R.; Cadamuro, M.; Negroni, C.; Butta, V.; Strazzabosco, M.; Dalprà, L.; Lavitrano, M.; Bentivegna, A. Valproic acid inhibits proliferation and reduces invasiveness in glioma stem cells through Wnt/ β -catenin signaling activation. *Genes*. **2018**, 9(11), 522.
- [265] Rocchi, P.; Tonelli, R.; Camerin, C.; Purgato, S.; Fronza, R.; Bianucci, F.; Guerra, F.; Pession, A.; Ferreri, A.M. p21Waf1/Cip1 is a common target induced by short-chain fatty acid hdac inhibitors (valproic acid, tributyrin and sodium butyrate) in neuroblastoma cells. *Oncol Rep*. **2005**, 13(6), 1139–1144.
- [266] Sanaei, M.; Kavooosi, F. Effect of valproic acid on the class I histone deacetylase 1, 2 and 3, tumor suppressor genes p21Waf1/Cip1 and p53, and intrinsic mitochondrial apoptotic pathway, pro-(Bax, Bak and Bim) and anti-(Bcl-2, Bcl-xL, and Mcl-1) apoptotic genes expression, cell viability, and apoptosis induction in hepatocellular carcinoma HEPG2 cell line. *Asian Pac J Cancer Prev*. **2021**, 22(S1), 89–95.

- [267] Zhang, X.; He, X.; Li, Q.; Kong, X.; Ou, Z.; Zhang, L.; Gong, Z.; Long, D.; Li, J.; Zhang, M.; Ji, W.; Zhang, W.; Xu, L.; Xuan, A. PI3K/Akt/mTOR signaling mediates valproic acid-induced neuronal differentiation of neural stem cells through epigenetic modifications. *Stem Cell Reports*. **2017**, 8(5), 1256–1269.
- [268] Lima, I.; Almeida-Santos, A.F.; Ferreira-Vieira, T.H.; Aguiar, D.C.; Ribeiro, F.M.; Campos, A.C.; de Oliveira, A. Antidepressant-like effect of valproic acid-possible involvement of PI3K/Akt/mTOR pathway. *Behav Brain Res*. **2017**, 329, 166–171.
- [269] Valvassori, S.S.; Gava, F.F.; Dal-Pont, G.C.; Simões, H.L.; Damiani-Neves, M.; Andersen, M.L.; Boeck, C.R.; Quevedo, J. Effects of lithium and valproate on erk/jnk signaling pathway in an animal model of mania induced by amphetamine. *Heliyon*. **2019**, 20 5(5), e01541.
- [270] Chen, S.; Ye, J.; Chen, X.; Shi, J.; Wu, W.; Lin, W.; Lin, W.; Li, Y.; Fu, H.; Li, S. Valproic acid attenuates traumatic spinal cord injury-induced inflammation via stat1 and NF- κ B pathway dependent of hdac3. *J Neuroinflammation*. **2018**, 15(1), 150.
- [271] Pan, H.; Wang, H.; Jia, Y.; Wang, Q.; Li, L.; Wu, Q.; Chen, L. VPA and MEL induce apoptosis by inhibiting the NRF2-are signaling pathway in TMZ-resistant U251 cells. *Mol Med Rep*. **2017**, 16(1), 908–914.
- [272] Greenblatt, D.Y.; Cayo, M.A.; Adler, J.T.; Ning, L.; Haymart, M.R.; Kunnimalaiyaan, M.; Chen, H. Valproic acid activates notch1 signaling and induces apoptosis in medullary thyroid cancer cells. *Ann Surg*. **2008**, 247(6), 1036–1040.
- [273] Lipska, K.; Filip, A.; Gumieniczek, A. The impact of chlorambucil and valproic acid on cell viability, apoptosis and expression of p21, hdm2, bcl2 and mcl1 genes in chronic lymphocytic leukemia. *Cells*. **2021**,10(5), 1088.
- [274] Li, H.; Zhang, Z.; Gao, C.; Wu, S.; Duan, Q.; Wu, H.; Wang, C.; Shen, Q.; Yin, T. Combination chemotherapy of valproic acid (VPA) and gemcitabine regulates STAT3/Bmi1 pathway to differentially potentiate the motility of pancreatic cancer cells. *Cell Biosci*. **2019**, 9, 50.
- [275] Bressy, C.; Majhen, D.; Raddi, N.; Jdey, W.; Cornilleau, G.; Zig, L.; Guirouilh-Barbat, J.; Lopez, B.S.; Bawa, O.; Opolon, P.; Grellier, E.; Benihoud, K. Combined therapy of colon carcinomas with an oncolytic adenovirus and valproic acid. *Oncotarget*. **2017**, 8(57), 97344–97360.
- [276] Brodie, S.A.; Brandes, J.C. Could valproic acid be an effective anticancer agent? the evidence so far. *Expert Rev Anticancer Ther*. **2014**, 14(10), 1097–1100.

- [277] Wawruszak, A.; Halasa, M.; Okon, E.; Kukula-Koch, W.; Stepulak, A. Valproic acid and breast cancer: state of the art in 2021. *Cancers*. **2021**, 13(14), 3409.
- [278] Allen, M.; Bjerke, M.; Edlund, H.; Nelander, S.; Westermark, B. Origin of the U87MG glioma cell line: good news and bad news. *Sci Transl Med*. **2016**, 8(354), 354re3.
- [279] Torsvik, A.; Stieber, D.; Enger, P.Ø.; Golebiewska, A.; Molven, A.; Svendsen, A.; Westermark, B.; Niclou, S.P.; Olsen, T.K.; Chekenya Enger, M.; Bjerkgvig, R. U-251 revisited: genetic drift and phenotypic consequences of long-term cultures of glioblastoma cells. *Cancer Med*. **2014**, 3(4), 812–824.
- [280] Maher, J.C.; Krishan, A.; Lampidis, T.J. Greater cell cycle inhibition and cytotoxicity induced by 2-deoxy-d-glucose in tumor cells treated under hypoxic vs aerobic conditions. *Cancer Chemother Pharmacol*. **2004**, 53(2), 116–122.
- [281] Zhdanov, A.V.; Okkelman, I.A.; Collins, F.W.; Melgar, S.; Papkovsky, D.B. A novel effect of DMOG on cell metabolism: direct inhibition of mitochondrial function precedes HIF target gene expression. *Biochim Biophys Acta*. **2015**, 1847(10), 1254–1266.
- [282] Kurtoglu, M.; Lampidis, T.J. From delocalized lipophilic cations to hypoxia: blocking tumor cell mitochondrial function leads to therapeutic gain with glycolytic inhibitors. *Mol Nutr Food Res*. **2009**, 53(1), 68–75.
- [283] Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. **1976**, 72, 248–254.
- [284] Chou T.C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res*. **2010**, 70(2), 440–446.
- [285] Davis, C.K.; Jain, S.A.; Bae, O.N.; Majid, A.; Rajanikant, G.K. Hypoxia mimetic agents for ischemic stroke. *Front Cell Dev Biol*. **2019**, 6, 175.
- [286] Kappler, M.; Pabst, U.; Weinholdt, C.; Taubert, H.; Rot, S.; Kaune, T.; Kotrba, J.; Porsch, M.; Güttler, A.; Bache, M.; Krohn, K.; Bull, F.; Riemann, A.; Wickenhauser, C.; Seliger, B.; Schubert, J.; Al-Nawas, B.; Thews, O.; Grosse, I.; Vordermark, D.; Eckert, A.W. Causes and consequences of a glutamine induced normoxic HIF1 activity for the tumor metabolism. *Int J Mol Sci*. **2019**, 20(19):4742.
- [287] Pająk, B. Looking for the Holy Grail - Drug Candidates for Glioblastoma Multiforme Chemotherapy. *Biomedicines*. **2022**, 10, 1001.

- [289] Michelakis, E.D.; Sutendra, G.; Dromparis, P.; Webster, L.; Haromy, A.; Niven, E.; Maguire, C.; Gammer, T.L.; Mackey, J.R.; Fulton, D.; Abdulkarim, B.; McMurtry, M.S.; Petruk, K.C. Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. *Sci Transl Med.* **2010**, 2(31), 31ra34.
- [290] Ruban, A.; Berkutzki, T.; Cooper, I.; Mohar, B.; Teichberg, V.I. Blood glutamate scavengers prolong the survival of rats and mice with brain-implanted gliomas. *Invest New Drugs.* **2012**, 30(6), 2226–2235.
- [291] Sourbier, C.; Srivastava, G.; Ghosh, M.C.; Ghosh, S.; Yang, Y.; Gupta, G.; Degraff, W.; Krishna, M.C.; Mitchell, J.B.; Rouault, T.A.; Linehan, W.M. Targeting HIF2 α translation with tempol in VHL-deficient clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget.* **2012**, 3(11), 1472–1482.
- [292] Davidescu, M.; Macchioni, L.; Scaramozzino, G.; Cristina Marchetti, M.; Migliorati, G.; Vitale, R.; Corcelli, A.; Roberti, R.; Castigli, E.; Corazzi, L. The energy blockers bromopyruvate and lonidamine lead G115 glioblastoma cells to death by different p53-dependent routes. *Sci Rep.* **2015**, 21;5:14343.
- [293] Kunjithapatham, R.; Geschwind, J.F.H.; Rao, P.P.; Boronina, T.N.; Cole, R.N.; Ganapathy-Kanniappan, S. Systemic administration of 3-bromopyruvate reveals its interaction with serum proteins in a rat model. *BMC Res. Notes.* **2013**, 6, 277.
- [294] Čuperlović-Culf, M. 2 - Biology – cancer metabolic phenotype. In *Woodhead Publishing Series in Biomedicine, NMR Metabolomics in Cancer Research.* **2013**, 15-138.
- [295] Zhang, X.D.; Deslandes, E.; Villedieu, M.; Poulain, L.; Duval, M.; Gauduchon, P.; Schwartz, L.; Icard, P. Effect of 2-deoxy-d-glucose on various malignant cell lines in vitro. *Anticancer Res.* **2006**, 26(5A), 3561–3566.
- [296] Wanyan, Y.; Xu, X.; Liu, K.; Zhang, H.; Zhen, J.; Zhang, R.; Wen, J.; Liu, P.; Chen, Y. 2-deoxy-d-glucose promotes buforin IIB-induced cytotoxicity in prostate cancer DU145 cells and xenograft tumors. *Molecules (Basel).* **2020**, 25(23), 5778.
- [297] Singh, S.; Pandey, S.; Chawla, A.S.; Bhatt, A.N.; Roy, B.G.; Saluja, D.; Dwarakanath, B.S. Dietary 2-deoxy-d-glucose impairs tumour growth and metastasis by inhibiting angiogenesis. *Eur J Cancer.* **2019**, 123:11-24.
- [298] Hansen, I.L.; Levy, M.M.; Kerr, D.S. The 2-deoxyglucose test as a supplement to fasting for detection of childhood hypoglycemia. *Pediatric Res.* 1984, 18, 359–364.

- [299] Strózik, T.; Ozga, M.; Linke-Szewczyk, A.; Priebe, W.; Orłowski, W.; Derwinska, K. Efficacy of 2-deoxy-d-glucose analog in glycolysis blocking in tumor cells. *Eur. J. Cancer*. **2015**, 51, S3–S27.
- [300] Moluculin Receives FDA Allowance to Begin a Phase 1 Study of WP1122 for the Treatment of Glioblastoma Multiforme. Dostęp online: <https://www.prnewswire.com/news-releases/moluculin-receives-fda-allowance-to-begin-a-phase-1-study-of-wp1122-for-the-treatment-of-glioblastoma-multiforme-301434546.html>.
- [301] Chédeville, A.L.; Madureira, P.A. The role of hypoxia in glioblastoma radiotherapy resistance. *Cancers (Basel)*. **2021**, 1;13(3):542.
- [302] Priebe, W.; Madden, T.; Charles, C.; Ji, Y.; Hsu, S.; Fokt, I.; Lang, F. 2-deoxy-d-glucose: old molecule, new brain tumor agent inducing autophagy. *Cancer Res*. **2007**, 67 (9_Supplement): 4863.
- [303] Wu, H.; Zhu, H.; Liu, D.X.; Niu, T.K.; Ren, X.; Patel, R.; Hait, W.N.; Yang, J.M. Silencing of elongation factor-2 kinase potentiates the effect of 2-deoxy-d-glucose against human glioma cells through blunting of autophagy. *Cancer Res*. **2009**, 15;69(6):2453-60.
- [304] Shutt, D.C.; O’Dorisio, M.S.; Aykin-Burns, N.; Spitz, D.R. 2-deoxy-d-glucose induces oxidative stress and cell killing in human neuroblastoma cells. *Cancer. Biol. Ther*. **2010**, 9, 853–861.
- [305] Kuznetsov, A.V.; Javadov, S.; Margreiter, R.; Grimm, M.; Hagenbuchner, J.; Ausserlechner, M.J. Structural and functional remodeling of mitochondria as an adaptive response to energy deprivation. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. **2021**, 1;1862(6):148393.
- [306] Was, H.; Krol, S.K.; Rotili, D.; Mai, A.; Wojtas, B.; Kaminska, B.; Maleszewska, M. Histone deacetylase inhibitors exert anti-tumor effects on human adherent and stem-like glioma cells. *Clin Epigenetics*. **2019**, 17;11(1):11.
- [307] Gurbani, S.S.; Yoon, Y.; Weinberg, B.D.; Salgado, E.; Press, R.H.; Cordova, J.S.; Ramesh, K.K.; Liang, Z.; Velazquez Vega, J.; Voloschin, A.; Olson, J.J.; Schreiber, E.; Shim, H.; Shu, H.G. Assessing treatment response of glioblastoma to an HDAC inhibitor using whole-brain spectroscopic MRI. *Tomography*. **2019**, 5(1):53-60.
- [308] Yang, X.F.; Zhao, Z.J.; Liu, J.J.; Yang, X.H.; Gao, Y.; Zhao, S.; Shi, S.; Huang, K.Q.; Zheng, H.C. Saha and/or mg132 reverse the aggressive phenotypes of glioma cells: an in vitro and vivo study. *Oncotarget*. **2017**, 10;8(2):3156-3169.

- [309] Ghiaseddin, A.; Reardon, D.; Massey, W.; Mannerino, A.; Lipp, E.S.; Herndon, J.E.; McSherry, F.; Desjardins, A.; Randazzo, D.; Friedman, H.S.; Peters, K.B. Phase II study of bevacizumab and Vorinostat for patients with recurrent world health organization grade 4 malignant glioma. *Oncologist*. **2018**, 23(2):157-e21.
- [310] Iwamoto, F.M.; Lamborn, K.R.; Kuhn, J.G.; Wen, P.Y.; Yung, W.K.A.; Gilbert, M.R.; Chang, S.M.; Lieberman, F.S.; Prados, M.D.; Fine, H.A. A phase I/II trial of the histone deacetylase inhibitor Romidepsin for adults with recurrent malignant glioma: North American brain tumor consortium study 03-03. *Neuro Oncol*. **2011**, 13(5):509-516.
- [311] Chen, R.; Zhang, M.; Zhou, Y.; Guo, W.; Yi, M.; Zhang, Z.; Ding, Y.; Wang, Y. The application of histone deacetylases inhibitors in glioblastoma. *J Exp Clin Cancer Res*. **2020**, 39(1):138.
- [312] Krauze, A.V.; Myrehaug, S.D.; Chang, M.G.; Holdford, D.J.; Smith, S.; Shih, J.; Tofilon, P.J.; Fine, H.A.; Camphausen, K. A phase 2 study of concurrent radiation therapy, temozolomide, and the histone deacetylase inhibitor valproic acid for patients with glioblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. **2015**, 92(5):986-992.
- [313] Qin, X.; Xu, Y.; Peng, S.; Qian, S.; Zhang, X.; Shen, S.; Yang, J.; Ye, J. Sodium butyrate opens mitochondrial permeability transition pore (MTMP) to induce a proton leak in induction of cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. **2020**, 30;527(3):611-617.
- [314] Han, W.; Guan, W. Valproic acid: a promising therapeutic agent in glioma treatment. *Front Oncol*. **2021**, 10;11:687362.
- [315] Tseng, J.H.; Chen, C.Y.; Chen, P.C.; Hsiao, S.H.; Fan, C.C.; Liang, Y.C.; Chen, C.P. Valproic acid inhibits glioblastoma multiforme cell growth via paraoxonase 2 expression. *Oncotarget*. **2017**, 8(9):14666-14679.
- [316] Zhang, C.; Liu, S.; Yuan, X.; Hu, Z.; Li, H.; Wu, M.; Yuan, J.; Zhao, Z.; Su, J.; Wang, X.; Liao, Y.; Liu, Q. Valproic acid promotes human glioma U87 cells apoptosis and inhibits glycogen synthase kinase-3 β through ERK/Akt signaling. *Cell Physiol Biochem*. **2016**, 39(6), 2173–2185.
- [317] Ryu, C.H.; Yoon, W.S.; Park, K.Y.; Kim, S.M.; Lim, J.Y.; Woo, J.S.; Jeong, C.H.; Hou, Y.; Jeun, S.S. Valproic acid downregulates the expression of MGMT and sensitizes temozolomide-resistant glioma cells. *J Biomed Biomol*. **2012**, 987495.

- [318] Majchrzak-Celińska, A.; Kleszcz, R.; Stasiłowicz-Krzemień, A.; Cielecka-Piontek, J. Sodium butyrate enhances curcuminoids permeability through the blood-brain barrier, restores Wnt/ β -catenin pathway antagonists gene expression and reduces the viability of glioblastoma cells. *Int J Mol Sci.* **2021**, 19;22(20):11285.
- [319] Taylor, M.A.; Khathayer, F.; Ray, S.K. Quercetin and sodium butyrate synergistically increase apoptosis in rat C6 and human T98G glioblastoma cells through inhibition of autophagy. *Neurochem Res.* **2019**, 44(7):1715-1725.
- [320] Chang, Y.L.; Huang, L.C.; Chen, Y.C.; Wang, Y.W.; Hueng, D.Y.; Huang, S.M. The synergistic effects of valproic acid and fluvastatin on apoptosis induction in glioblastoma multiforme cell lines. *Int J Biochem Cell Biol.* **2017**, 92:155-163.
- [321] Barker, C.A.; Bishop, A.J.; Chang, M.; Beal, K.; Chan, T.A. Valproic acid use during radiation therapy for glioblastoma associated with improved survival. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **2013**, 1;86(3):504-9.
- [322] Priebe, W.; Cybulski, M.; Fokt, I.; Skora, S.; Conrad, C.; Madden, T. U.S. Patent No. 10,201,554. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. **2019**.

Wykaz Rycin

Rysunek 1. Porównanie metabolizmu glukozy w komórkach prawidłowych i nowotworowych (oddychanie tlenowe i beztlenowe vs glikoliza tlenowa)	22
Rysunek 2. Schematyczne przedstawienie przebiegu procesu glikolizy w komórce nowotworowej.	23
Rysunek 3. Budowa cząsteczki D-glukozy, 2-DG oraz D-mannozy	25
Rysunek 4. Schemat działania 2-DG na poziomie komórki	26
Rysunek 5. Schemat działania 2-DG na N-glikozylację białek	27
Rysunek 6. Schematyczny przebieg makroautofagii wywołanej czynnikami stresowymi	29
Rysunek 7. Szlaki sygnałowe procesu apoptozy.	30
Rysunek 8. Białka z rodziny Bcl-2 i ich funkcja w szlaku mitochondrialnym apoptozy.	31
Rysunek 9. Znaczenie acetylacji dla właściwości cząsteczek chemicznych na przykładzie heroiny i 2-DG.	36
Rysunek 10. Regulacja ekspresji i represji genów pod wpływem działania acetylotransferaz i deacetylaz histonów.	39
Rysunek 11. Wzór chemiczny WP1234.	42
Rysunek 12. Wzory chemiczne badanych związków: 2-DG, NaBt, NaVPA, WP1234, WP1122.	47
Rysunek 13. Schemat doświadczalny.	49
Rysunek 14. Przykładowy wykres gęstościowy przedstawiający sposób bramkowania populacji komórek wyznakowanych Aneksyną V.	53
Rysunek 15. Wpływ wzrastających stężeń inhibitorów glikolizy na żywotność komórek linii U-87 oraz U-251 po 48 i 72 h inkubacji.	62
Rysunek 16. Wpływ wzrastających stężeń inhibitorów glikolizy na proliferację (test BrdU) komórek linii U-87 oraz U-251 po 48 i 72 h inkubacji.	63
Rysunek 17. Wpływ wzrastających stężeń inhibitorów glikolizy na biosyntezę białka (barwienie SRB) w komórkach linii U-87 oraz U-251 po 48 i 72 h inkubacji.	64
Rysunek 18. Wpływ DMOG [50, 100 μ M] i/lub Rho 123 [0,25, 0,5 μ M] na żywotność komórek linii U-87 (A) i U-251 (B) po 72 h inkubacji.	66
Rysunek 19. Analiza Western blot ekspresji białek HIF-1 α oraz PDK1 i LDHA po traktowaniu komórek linii U-87 oraz U-251, DMOG [50, 100 μ M] i/lub rodaminą 123 [0,25, 0,5 μ M].	66

- Rysunek 20.** Wpływ wzrastających stężeń inhibitorów glikolizy na przeżywalność (test MTS) komórek linii U-87 oraz U-251 po 72 h inkubacji w warunkach normoksji i warunkach naśladujących hipoksję. 67
- Rysunek 21.** Wpływ wzrastających stężeń inhibitorów glikolizy **A.** 2-DG [2,5 - 10 mM], **B.** WP1122 [0,5 - 5 mM] na stężenie wytworzonego kwasu mlekowego w lizatach komórkowych i kwasu mlekowego wydzielonego do medium linii U-87 oraz U-251 po 72 h inkubacji. 68
- Rysunek 22.** Wpływ wzrastających stężeń inhibitorów glikolizy na syntezę ATP w komórkach linii U-87 oraz U-251 po 72 h inkubacji. 69
- Rysunek 23.** Znakowanie komórek apoptotycznych aneksyną V. 70
- Rysunek 24.** Wpływ wzrastających stężeń inhibitorów HDAC na żywotność komórek linii U-87 oraz U-251 po 48 i 72 h inkubacji. 71
- Rysunek 25.** Wpływ wzrastających stężeń inhibitorów HDAC na proliferację (test BrdU) komórek linii U-87 oraz U-251 po 48 i 72 h inkubacji. 72
- Rysunek 26.** Wpływ wzrastających stężeń inhibitorów HDAC na syntezę białek w komórkach linii U-87 oraz U-251 po 48 i 72 h inkubacji z badanym związkiem. 73
- Rysunek 27.** Wpływ wzrastających stężeń inhibitorów HDAC na żywotność komórek linii U-87 oraz U-251 po 72 h inkubacji w warunkach normoksji i warunkach naśladujących hipoksję 74
- Rysunek 28.** Ocena aktywacji apoptozy za pomocą znakowania komórek apoptotycznych aneksyną V. 75
- Rysunek 29.** Ocena aktywności deacetylaz histonów. 76
- Rysunek 30.** Zmiany ekspresji białek z rodziny Bcl-2 pod wpływem taktowania komórek GBM stężeniami IC₅₀ 2-DG [5 mM], WP1122 [2 mM dla linii U-87 oraz 0,8 mM dla linii U-251], NaBt [10 mM] oraz NaVPA [10 mM dla linii U-87 oraz 12,5 mM dla linii U-251] po 72-godzinnej inkubacji. 77
- Rysunek 31.** Wpływ wzrastających stężeń chlorochiny (CQ) [5 - 100 μM] na przeżywalność komórek linii **A.** U-87 oraz **B.** U-251 po 72 h inkubacji. 78
- Rysunek 32.** Wpływ stężeń IC₅₀: 2-DG [5 mM], WP1122 [U-87 - 2 mM oraz U-251 – 0,8 mM], NaBt [10 mM dla obu linii GBM] oraz NaVPA [U-87 - 10 mM oraz U-251 – 12,5 mM], (72 h) w obecności/bez CQ [10 μM] na żywotność komórek GBM. 78

Rysunek 33. Analiza Western blot poziomu ekspresji białka MAP-LC3 w lizatach komórek U-87 i U-251 traktowanych stężeniami IC_{50} 2-DG [5 mM], WP1122 [U-87 - 2 mM oraz U-251 – 0,8 mM], NaBt [10 mM dla obu linii GBM] oraz NaVPA [U-87 - 10 mM oraz U-251 – 12,5 mM] w obecności/bez CQ [10 μ M]. 79

Rysunek 34. Analiza ultrastruktury komórek linii U-87 poddanych działaniu (24 h) stężeniami IC_{50} : 2-DG [5 mM], WP1122 [2 mM], NaBt [10 mM] oraz NaVPA [10 mM]. 81

Rysunek 35. Wpływ skojarzonego działania **A.** 2-DG [5 – 20 mM] + NaBt [5 – 15 mM], **B.** 2-DG [5 – 20 mM] + NaVPA [5 – 20 mM] oraz **C.** WP1122 [0,8 – 3 mM] + NaBt [5 – 20 mM] i **D.** WP1122 [0,8 – 3 mM] + NaVPA [5 – 20 mM] na żywotność komórek U-87 i U-251 oznaczoną za pomocą testu MTS po 48 i 72 h inkubacji. 83

Rysunek 36. Wpływ skojarzonego działania **A.** 2-DG [5 – 20 mM] + NaBt [5 – 20 mM], **B.** 2-DG [5 – 20 mM] + NaVPA [5 – 20 mM] oraz **C.** WP1122 [0,8 – 3 mM] + NaBt [5 – 20 mM] i **D.** WP1122 [0,8 – 3 mM] + NaVPA [5 – 20 mM] na proliferację komórek U-87 i U-251 oznaczoną za pomocą testu z BrdU po 48 i 72 h inkubacji. 84

Rysunek 37. Wpływ skojarzonego działania **A.** 2-DG [5 – 20 mM] + NaBt [5 – 20 mM], **B.** 2-DG [5 – 20 mM] + NaVPA [5 – 20 mM] oraz **C.** WP1122 [0,8 – 3 mM] + NaBt [5 – 20 mM] i **D.** WP1122 [0,8 – 3 mM] + NaVPA [5 – 20 mM] na syntezę białka (barwienie SRB) w komórkach U-87 i U-251 oznaczoną za pomocą testu z SRB po 48 i 72 h inkubacji. 85

Rysunek 38. Wpływ skojarzonego działania **A.** 2-DG [5 – 20 mM] + NaBt [5 – 20 mM], **B.** 2-DG [5 – 20 mM] + NaVPA [5 – 20 mM] oraz **C.** WP1122 [0,8 – 3 mM] + NaBt [5 – 20 mM] i **D.** WP1122 [0,8 – 3 mM] + NaVPA [5 – 20 mM] na syntezę kwasu mlekowego w lizatach komórkowych oraz kwasu mlekowego wydzielonego do medium linii U-87 i U-251 po 72 h inkubacji. 86

Rysunek 39. Wpływ wzrastających stężeń WP1234 [100 μ M - 1 mM] na żywotność (test MTS) komórek linii U-87 oraz U-251 po inkubacji 1, 4, 24, 48 i 72 – godzinnej (**A**) oraz po 48 i 72 h [100 μ M - 1 mM] (**B**). 90

Rysunek 40. Wpływ wzrastających stężeń WP1234 [100 μ M - 1 mM] na proliferację (test BrdU) komórek linii U-87 (**A**) oraz U-251 (**B**) po 48 i 72 h inkubacji z badanym związkiem. Jako kontrolę pozytywną w doświadczeniu zastosowano CHX [20 μ M]. 91

Rysunek 41. Wpływ wzrastających stężeń WP1234 [100 μ M - 1 mM] na biosyntezę białka

- (barwienie SRB) komórek linii U-87 (A) oraz U-251 (B) po 48 i 72 h inkubacji z badanym związkami. 91
- Rysunek 42.** Wpływ wzrastających stężeń WP1234 [100 μ M - 1 mM] na przeżywalność (test MTS) komórek linii U-87 (A) oraz U-251 (B) po 72 h inkubacji z badanym związkiem w warunkach normoksji i warunkach naśladujących hipoksję. 92
- Rysunek 43.** Znakowanie komórek apoptotycznych aneksyną V. Komórki linii U-87 (A) i U-251 (B) znakowano po 48 i 72 h inkubacji z różnymi stężeniami WP1234 [100 μ M - 1 mM]. 93
- Rysunek 44.** Zmiany ekspresji białka pro-kaspazy-3 pod wpływem traktowania komórek GBM wzrastającymi stężeniami WP1234 [100 – 500 μ M] po 72-h inkubacji. 93
- Rysunek 45.** Wpływ wzrastających stężeń inhibitorów WP1234 [100 - 500 μ M] na stężenie wytworzonego kwasu mlekowego w lizatach komórkowych i kwasu mlekowego wydzielonego do medium linii U-87 oraz U-251 po 72 h inkubacji. 94
- Rysunek 46.** Ocena aktywności deacetylaz histonów. Komórki linii U-87 i U-251 poddano 72 h inkubacji z różnymi stężeniami WP1234 [100 μ M - 1 mM]. 95
- Rysunek 47.** Zmiany ekspresji białek z rodziny Bcl-2 pod wpływem traktowania komórek GBM stężeniami IC_{50} WP1234 po 72-godzinnej inkubacji. 96
- Rysunek 48.** Wpływ stężeń IC_{50} WP1234 [500 μ M dla U-87 (A) i 250 μ M dla U-251 (B)] (po 72 h) w obecności/bez CQ [10 μ M] na żywotność komórek GBM. 96
- Rysunek 49.** Wpływ traktowania komórek GBM za pomocą WP1234 [500 μ M dla U-87 i 250 μ M dla U-251] (po 72 h) z/bez CQ na ekspresję markera autofagii – białka MAP-LC3. 97
- Rysunek 50.** Obraz z mikroskopu elektronowego przedstawiający ultrastrukturę komórek linii U-87 po 8 i 12 h inkubacji z wyznaczonym IC_{50} WP1234 [500 μ M]. 99

Wykaz Tabel

Tabela I. Klasyfikacja nowotworów gleju gwiaździstego według WHO, 2016.	17
Tabela II. Badania przedkliniczne i kliniczne z zastosowaniem 2-DG w terapii kombinowanej.	32
Tabela III. Klasyfikacja HDACs i ich występowanie w komórce oraz w organizmie.	38
Tabela IV. HDACis i ich rozwój w terapii przeciwnowotworowej.	40
Tabela V. Wykaz badanych związków i sposób w jaki przygotowywano ich stoki.	47
Tabela VI. Wyznaczone wartości IC_{50} 2-DG oraz WP1122 dla linii komórkowych U-87 i U-251 po 48 i 72 h inkubacji.	65
Tabela VII. Wyznaczone wartości IC_{50} NaBt oraz NaVPA dla linii komórkowych U-87 i U-251 po 48 i 72 h inkubacji.	73
Tabela VIII. Podsumowanie wyników interakcji inhibitorów glikolizy z inhibitorami HDAC uzyskanych za pomocą metody ChouTalalay dla linii komórkowej U-87.	88
Tabela XIX. Podsumowanie wyników interakcji inhibitorów glikolizy z inhibitorami HDAC uzyskanych za pomocą metody ChouTalalay dla linii komórkowej U-251.	89
Tabela X. Wyznaczone wartości IC_{50} pochodnej WP1234 dla linii komórkowych U-87 oraz U-251 po 48 i 72 h inkubacji.	92