

Streszczenie

Lekooporność nowotworów jest obecnie jednym z najważniejszych wyzwań współczesnej onkologii. Opiera się ona głównie na zdolności komórek do usuwania leków, metabolizowania i ich inaktywacji wewnątrz komórek oraz naprawy uszkodzonych struktur subkomórkowych. Mechanizmy te skutkują stopniowym łagodzeniem odpowiedzi komórek guza na chemioterapeutyki oraz niepowodzeniem leczenia. Opracowano wiele strategii, które pozwoliłyby na zaburzenie procesu wykształcania i ewolucji oporności na leki. Wśród nich znalazło się połączenie działania wcześniej już używanych blokerów metabolicznych z tradycyjnymi lekami chemioterapeutycznymi. Tego typu kombinacje mogą pozytywnie wpływać na lekoopowrażliwość komórek raka prostaty poprzez hamujące działanie blokerów metabolicznych na produkcję nośników energii (w tym ATP), której dodatni bilans jest niezbędny do efektywnego działania systemów oporności wielolekowej (w tym pomp zależnych od ATP). Wcześniej udowodniono, że fenofibrat (FF) – jeden ze wspomnianych blokerów metabolicznych – wykazuje działanie obniżające lekooporność. Pokazano też, że stosowanie fenofibratu w roli adjuwanta może zwiększać wrażliwość opornych na leki linii komórek raka prostaty na chemioterapię z wykorzystaniem docetakselu (DCX). Jednak zaobserwowano również oznaki adaptacji komórek do sprzężonego stresu metaboliczno-chemioterapeutycznego.

Na tej podstawie sformułowałem hipotezę zakładającą, że silnym efektem cytostatycznym i cytotoksycznym wywołanym synergistycznym działaniem docetakselu i fenofibratu towarzyszy selektywna ekspansja sublinii komórek, które wykazują zwiększoną lekooporność. Ponieważ nowotworowe komórki macierzyste (ang. *cancer stem cells*, CSC) o sygnaturze CD44^{high}/CD133^{high} (ang. *cluster of differentiation*) zidentyfikowano już wcześniej jako odpowiedzialne za mikroewolucję lekoopornych nowotworów założyłem również, że heterogenne komórki o fenotypie komórek macierzystych (ang. *stem cell-like cells*, SCL), które są obecne w liniach komórek raka prostaty *in vitro*, odpowiadają za tworzenie potomstwa „superopornego” na leki. Wreszcie przyjąłem, że odwrócona mikroewolucja „superopornych” komórek może pomóc zrozumieć podstawy zależności między lekoopornością a złośliwością raka prostaty.

Aby zweryfikować te założenia, zastosowane zostało łączone podejście *in vitro* i *in vivo* oparte na izolacji i późniejszej propagacji potomstwa niewielkich subpopulacji komórek CD44^{high}/CD133^{high} o fenotypie nowotworowych komórek macierzystych (SCL). Ich obecność została zaobserwowana w populacjach komórek linii raka prostaty DU145 i PC-3. Po ich wstępnej ekspozycji na działanie docetakselu (i) były one w stanie różnicować w kierunku komórek CD44^{low} o zwiększonej oporności na DCX, przyczyniając się tym samym do mikroewolucji subpopulacji komórek lekoopornych. Komórki CD44^{high}/CD133^{high} (ii) zaobserwowano także we wcześniej wyprowadzonych liniach komórek opornych na DCX — DU145_DCX20/50 i PC-3_DCX20, a ich izolacja doprowadziła do powstania populacji o jeszcze wyższej oporności na DCX. Populacje te (iii) pozostały jednak wrażliwe na DCX/FF. Równoczesne podanie docetakselu i fenofibratu (iv) skutkowało powstaniem polimorfojądrzastych komórek (ang. *polyploidic giant cancer cells*, PGCC) i komórek CD44^{high}. Ponownie, (v) CD44-negatywne potomstwo komórek SCL izolowanych w obecności DCX i FF pozostawało relatywnie wrażliwe na działanie DCX i FF, podczas gdy wzmocnieniu uległa jego oporność na DCX. Rozszerzenie tych badań wykazało, że (vi) komórki CD133^{high} posiadają potencjał odpowiadający ich odpowiednikom CD44^{high}, choć jest on mniej wyraźny. Co więcej (vii) długotrwała hodowla linii pochodzących od „superopornych” komórek SCL (izolowanych w obecności DCX i FF) w pożywce kontrolnej prowadziła do ich ewolucji w kierunku fenotypu bardziej wrażliwego na oba badane leki, ale i bardziej inwazyjnego. W wyniku tych procesów (viii) guzy raka prostaty DU145 wykształcone podskórnym w mysim

Streszczenie rozprawy doktorskiej mgr. Tomasza Wróbla: „Rola komórek CD44^{high} w mikroewolucji lekooporności komórek raka prostaty indukowanej przez fenofibrat”

modelu in vivo były w stanie przewyciężyć efekt stresu chemioterapeutyczno-metabolicznego powodowanego jednoczesnym podawaniem DCX i FF po początkowym zatrzymaniu ich wzrostu.

Opisane w tej rozprawie obserwacje potwierdzają, że fenofibrat zwiększa wrażliwość raka prostaty na stres wywołany chemioterapią. Tym samym ilustrują one potencjał fenofibratu w terapiach metronomicznych lekoopornego raka prostaty. Z drugiej strony uzyskane dane pokazują także, że skojarzone działanie DCX i FF może kierunkować mikroewolucję komórek raka prostaty w stronę fenotypu złośliwego (tj. oporności na leki i podniesionej inwazyjności). Ekstrapolując wnioski płynące z badań komórek CD44^{high} na praktykę kliniczną, można stwierdzić, że oporność nowotworowych komórek macierzystych na synergistyczne działanie DCX i FF oraz idąca za tym ekspansja ich potomstwa (tj. „superopornych” komórek CD44⁻) może ograniczać potencjalne zastosowanie tego typu chemioterapii metabolicznej w leczeniu raka prostaty. **Podsumowując, równowaga między wrażliwością komórek raka prostaty (CD44^{low}) na chemioterapeutyki, a adaptacją nowotworowych komórek macierzystych (CD44^{high}) do stresu metabolicznego decyduje o odpowiedzi guza na chemioterapię metaboliczną.**

TW



Abstract

Tumour drug-resistance is nowadays one of the most significant therapeutic challenges. It is predominantly based on the cellular ability to remove the drugs, metabolically inactivate them in intracellular compartments and to repair damaged sub-cellular structures. It results in the gradually decreasing responsiveness of tumour cells to the chemotherapeutic drugs and in the treatment failures. Numerous strategies have been elaborated to interfere with the drug-resistance of tumor cells; among them, the combinations of metabolic blockers with chemotherapeutic drugs have recently been proposed. Such combinations can interfere with the drug-resistance of prostate cancer cells via the inhibitory effects of metabolic blockers on the energy (ATP) supply that is necessary for the effective action of drug-resistance systems (incl. ATP pumps). Fenofibrate has recently been shown to interfere with the drug-resistance of prostate tumor cells. We have demonstrated that applying fenofibrate as an adjuvant can increase the sensitivity of drug-resistant lineages of prostate cancer cells to chemotherapy. However, we also noticed the signs of cell adaptation to the combined metabolic/chemotherapeutic stress.

Therefore, I hypothesised that relatively strong cytostatic/cytotoxic effects of the combined docetaxel/fenofibrate treatment are accompanied by the selective expansion of cell lineages displaying enhanced drug-resistance. Because CD44/CD133-positive cancer stem cells (CSC) have been identified as responsible for the microevolution of drug-resistant tumors, I also assumed that heterogeneous cancer stem-like cells (SCLs), which are continuously present/generated in prostate cancer cell lines in vitro, account for the formation of drug- (“super”)resistant cell progenies. Finally, I considered a reversed microevolution of “super-resistant” cells to address the problem of interrelations between drug-resistance and prostate cancer malignancy.

To verify these hypotheses, a combined in vitro/in vivo approach has been adapted, which was based on the isolation of minute sub-populations of docetaxel(DCX)-resistant CD133^{high} and/or CD44^{high} cancer stem cell-like (SCL) cells. Their presence was found in prostate cancer DU145 and PC-3 cell populations. When pre-treated with docetaxel, (i) they were able to efficiently differentiate into docetaxel-resistant CD44^{low} “bulk” cells, thus accounting for the microevolution of drug-resistant cell lineages. Such cells (ii) were also seen in previously established drug-resistant DU145_DCX20/50 and PC-3_DCX20 lineages, and their isolation resulted in the establishment of DCX- but not (iii) DCX/FF (fenofibrate)-“super-resistant” cells. Combined docetaxel/fenofibrate treatment (iv) induced the generation of poly(morpho)nuclear giant cells and CD44^{high} SCL cells. Again, the (v) CD44^{low} offspring of docetaxel/fenofibrate-treated SCLs remained relatively sensitive to the combined DCX/FF treatment, while retaining a “super-resistance” to DCX. Extension of these studies revealed that (vi) CD133^{high} cells possess a potential corresponding to their CD44^{high} counterparts. Next, (vii) the long-term propagation of drug- (“super”)resistant SCL-derived lineages in the absence of DCX/FF resulted in their microevolution towards the drug-sensitive and invasive phenotype. As a consequence of these processes, (viii) DU145 prostate tumors were able to recover from the combined docetaxel/fenofibrate stress after the initial arrest of their expansion as demonstrated by in vivo studies.

These observations confirm that fenofibrate increases the sensitivity of drug-resistant prostate tumors to chemotherapeutic stress. Thus, they illustrate the potential of fenofibrate for the metronomic treatment of drug-resistant prostate tumors. However, they also identified biological and therapeutic consequences of DCX/FF-induced microevolution of prostate cancer cell malignancy (drug-resistance/invasiveness). The resistance of CD44^{high} prostate cancer stem cells to the combined docetaxel/fenofibrate treatment, followed by docetaxel/fenofibrate-induced microevolution and selective expansion of hyper-resistant CD44^{low} progenies, can limit the

Streszczenie rozprawy doktorskiej mgr. Tomasza Wróbla: „Rola komórek CD44^{high} w mikroewolucji lekooporności komórek raka prostaty indukowanej przez fenofibrat”

implementation of metabolic chemotherapy in prostate cancer treatment. **In conclusion, the balance between the sensitivity of CD44^{low} prostate cancer cells to chemotherapeutics and the adaptation of CD44^{high} stem cell-like cells to metabolic stress determines the response of prostate tumors to metabolic chemotherapy.**

