

Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych

# **Anna Maria Kubicka**

## **Ocena przeciwnowotworowej aktywności nowych inhibitorów heksokinazy II**

Evaluation of the anticancer activity of novel  
hexokinase II inhibitors

Praca doktorska

wykonana w Katedrze Biofizyki  
Medycznej  
Instytutu Biofizyki

Promotor:

- Dr hab. Magdalena Łabieniec-Watała,  
prof. UŁ

Promotor pomocniczy:

- Dr Karolina Matczak

## Podziękowania

Chciałbym serdecznie podziękować **Pani dr hab. Magdalenie Łabieniec-Watały, prof. UŁ**, mojej Promotorce, za cenne uwagi i inspirujące sugestie, które miały istotny wpływ na ostateczny kształt tej rozprawy doktorskiej.

Nie mogę zapomnieć o wyrazach mojej głębokiej wdzięczności wobec mojej Promotorki pomocniczej, **Pani dr Karoliny Matczak**. Jej nieustanna pomoc, motywacja oraz wsparcie okazały się niezastąpione w całym procesie przygotowywania pracy.

Chciałbym także podziękować **mgr inż. Mateuszowi Tomczykowi** z Katedry Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii Wydziału Chemii Politechniki Śląskiej, oraz **Panu dr Horacio Pérez-Sánchez** z Katolickiego Uniwersytetu San Antonio w Murcji, za współpracę oraz pomoc w realizacji badań.

Składam szczególne podziękowania **Pani Prof. dr hab. Agnieszce Marczak, Pracownikom, Koleżankom i Kolegom** z Katedry Biofizyki Medycznej za ich życzliwość, stworzenie miłej atmosfery pracy oraz konstruktywne sugestie.

Pragnę podziękować mojej **Rodzinie**, bez Was nie byłabym tutaj, gdzie jestem dzisiaj.

## Dorobek naukowy

### PUBLIKACJE NAUKOWE

1. Juszczak, K.\*; **Kubicka, A.\***; Kitel, R.; Dzido, G.; Łabieniec-Watała, M.; Zawadzki, S.; Marczak, A.; Walczak, K.; Matczak, K.; Tomczyk, M. D. Hexokinase 2 inhibition and biological effects of BNBZ and its derivatives: The influence of the number and arrangement of hydroxyl groups. *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, 23, 2616.

\*równoważny wkład autorów

IF: 5,6; punkty MEiN: 140 pkt

2. **Kubicka, A.**; Matczak, K.; Łabieniec-Watała, M. More than meets the eye regarding cancer metabolism. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, 22, 9507.

IF: 6.208; punkty MEiN: 140 pkt

3. **Chmurska, A.**; Matczak, K.; Marczak, A. Two faces of autophagy in the Struggle Against Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, 22, 2981.

IF: 6.208; punkty MEiN: 140 pkt

**Sumaryczna wartość IF: 18,02; punkty MEiN: 420**

### ZGŁOSZENIA PATENTOWE/PATENTY

Europejskie zgłoszenie patentowe

Pérez-Sánchez Horacio, Tomczyk Mateusz, Legierski Hubert, Matczak Karolina, **Kubicka Anna**, Łabieniec-Watała Magdalena „SYNERGISTIC COMBINATION FOR THE TREATMENT OF CANCER” 24 kwietnia 2023 r.

## Współpraca

Katedra Chemii Organicznej, Bioorganicznej  
i Biotechnologii,  
Politechnika Śląska,  
Gliwice, Polska  
Mgr inż. Mateusz Tomczyk



**Politechnika  
Śląska**



Structural Bioinformatics and High  
Performance Computing Research Group  
(BIO-HPC),  
Katolicki Uniwersytet San Antonio w Murcji  
(UCAM),  
Murcia, Hiszpania  
Doktor Horacio Pérez-Sánchez



**UCAM**  
UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE MURCIA

## Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów i symboli	10
<b>WSTĘP</b>	13
<b>I. METABOLIZM KOMÓRKOWY</b>	18
<b>1.1.</b> Metabolizm komórek – czym jest i na czym polega	18
<b>1.2.</b> Efekt Warburga w nowotworach	20
<b>1.3.</b> Liczne aspekty metabolicznego przeprogramowania nowotworów	23
<b>1.3.1.</b> Glutaminoliza	23
<b>1.3.2.</b> Podwyższona synteza kwasów tłuszczowych w nowotworach	24
<b>1.3.3.</b> Metaboliczne przeprogramowanie	26
<b>1.4.</b> Modyfikacje enzymów metabolicznych	27
<b>1.4.1.</b> HKII: gdzie, jak i dlaczego?	28
<b>1.4.2.</b> O roli heksokinazy II w metabolizmie nowotworów	30
<b>II. RAK WĄTROBY – PRZYCZYNY, TERAPIA, METODY WYKORZYSTYWANE DO BADANIA METABOLIZMU</b>	31
<b>2.1.</b> Rak wątrobowokomórkowy	31
<b>2.2.</b> Metody leczenia nowotworu wątrobowokomórkowego	32
<b>2.3.</b> HKII w komórkach raka wątrobowokomórkowego	33
<b>2.4.</b> Metabolizm nowotworów jako cel terapeutyczny w leczeniu raka wątroby	34
<b>2.5.</b> Związki będące inhibitorami HKII	34
<b>2.6.</b> Badania nad metabolizmem nowotworów	36
<b>2.6.1.</b> Metody wykorzystywane w badaniach nad metabolizmem komórkowym – ich wady/zalety oraz ograniczenia i obecne możliwości	37
<b>2.6.2.</b> Wady i zalety wirtualnych badań przesiewowych	41
<b>III. UZASADNIENIE PODJĘCIA TEMATU PRACY</b>	44
<b>IV. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA</b>	46
<b>4. Materiały</b>	46
<b>4.1.</b> Materiały i odczynniki do hodowli	46
<b>4.2.</b> Materiały i odczynniki chemiczne stosowane w analizach	46
<b>4.3.</b> Aparatura	48

4.4.	Związki chemiczne zastosowane w badaniach	48
4.5.	Materiał badawczy - linie komórkowe	49
5.	<b>Etapy pracy</b>	52
6.	<b>Metody</b>	53
6.1.	Hodowla komórkowa	53
6.2.	Określanie żywotności komórek za pomocą błękitu trypanu	54
6.3.	Inkubacja komórek z badanymi związkami	54
6.4.	Liza komórek (aktywność HKII, Western Blot, FRAP, aktywność kaspazy-3,-8,-9)	55
6.5.	Oznaczenie zawartości białka (metoda Lowry'ego)	55
6.6.	Oznaczanie aktywności heksokinazy II	56
6.6.1.	W warunkach <i>in solution</i> i <i>in vitro</i>	56
6.7.	Ocena właściwości cytotoksycznych	57
6.7.1.	Ocena cytotoksyczności inhibitorów heksokinazy II	57
6.7.2.	Ocena cytotoksyczności kombinacji inhibitorów heksokinazy II z doksorubicyną	57
6.8.	Ocena stresu oksydacyjnego	58
6.8.1.	Ocena poziomu reaktywnych form tlenu (metoda z H <sub>2</sub> DCFDA)	58
6.8.2.	Ocena poziomu reaktywnych form azotu (metoda z DAF-FM)	58
6.8.3.	Określenie całkowitego potencjału antyoksydacyjnego (metoda z TPTZ)	59
6.8.4.	Oznaczenie zawartości glutationu (metoda z monochlorobimem)	59
6.8.5.	Analiza zmian potencjału błonowego mitochondriów ( $\Delta\Psi_m$ ) (metoda z MitoTracker Red CMXRos)	60
6.9.	Określenie rodzaju śmierci komórki	61
6.9.1.	Ocena intensywności procesu autofagii (metoda z monodansylokadaweryną)	61
6.9.2.	Określenie aktywności kaspazy-8 i -9	61
6.9.3.	Określenie aktywności kaspazy-3	62
6.9.4.	Analiza faz cyklu komórkowego (metoda cytometryczna)	63
6.9.5.	Oznaczenie poziomu jonów wapnia (fluorymetryczna metoda z fluo-3 AM)	63

6.10.	Immunodetekcja białka HKII (Western Blot)	64
6.11.	Analiza statystyczna	65
7.	<b>Wyniki</b>	67
7.1.	<b>Wpływ badanych związków na aktywność heksokinazy II (HKII)</b>	67
7.2.	<b>Cytotoksyczność badanych związków</b>	71
7.2.1.	Cytotoksyczność glimepirydu, indometacyny i benserazydu	71
7.2.2.	Wpływ glimepirydu, indometacyny lub benserazydu na cytotoksyczność doksorubicyny	73
7.3.	<b>Immunodetekcja HKII metodą Western blot</b>	81
7.4.	<b>Wpływ badanych związków na generowanie stresu oksydacyjnego w komórkach linii HepG2 i HuH-7</b>	82
7.4.1.	Poziom reaktywnych form tlenu powstających pod wpływem badanych związków	82
7.4.1.1	Wpływ glimepirydu, indometacyny i benserazydu na poziom wewnątrzkomórkowych RFT	82
7.4.1.2.	Wpływ glimepirydu, indometacyny lub benserazydu w kombinacji z doksorubicyną na poziom RFT	83
7.4.2.	Poziom reaktywnych form azotu powstających pod wpływem badanych związków	85
7.4.2.1.	Wpływ glimepirydu, indometacyny i benserazydu na poziom RFA	85
7.4.2.2.	Wpływ glimepirydu, indometacyny lub benserazydu w kombinacji z doksorubicyną na poziom RFA	86
7.4.3.	Zmiany transbłonowego potencjału mitochondrialnego ( $\Delta\Psi$ )	88
7.4.3.1.	Wpływ glimepirydu, indometacyny i benserazydu na potencjał błony mitochondrialnej	89
7.4.3.2.	Wpływ kombinacji glimepirydu, indometacyny lub benserazydu z doksorubicyną na potencjał błony mitochondrialnej	90
7.4.4.	Wpływ badanych związków na całkowity potencjał antyoksydacyjny	92
7.4.4.1.	Wpływ glimepirydu, indometacyny i benserazydu na całkowity potencjał antyoksydacyjny	93

7.4.4.2.	Wpływ glimepirydu, indometacyny lub benserazydu w kombinacji z doksorubicyną na całkowity potencjał antyoksydacyjny	94
7.4.5.	Zmiany poziomu zredukowanego glutationu (GSH)	95
7.4.5.1.	Wpływ glimepirydu, indometacyny i benserazydu na poziom GSH	96
7.4.5.2.	Wpływ glimepirydu, indometacyny lub benserazydu w kombinacji z doksorubicyną na poziom GSH	97
<b>7.5.</b>	<b>Identyfikacja rodzaju śmierci komórki</b>	99
7.5.1.	Analiza aktywności kaspazy -3, -9, -8	99
7.5.1.1.	Analiza aktywności kaspazy -3, -9, -8 w komórkach linii Huh-7 oraz linii HepG2 inkubowanych z glimepirydem, indometacyną lub benserazydem	100
7.5.1.2.	Analiza aktywności kaspazy -3, -9, -8 w komórkach linii Huh-7 oraz linii HepG2 inkubowanych z glimepirydem, indometacyną lub benserazydem w kombinacji z doksorubicyną	101
7.5.2.	Zmiany wewnątrzkomórkowego poziomu $Ca^{2+}$ w komórkach linii Huh-7 i HepG2	104
7.5.2.1.	Wpływ glimepirydu, indometacyny lub benserazydu na poziom wewnątrzkomórkowego $Ca^{2+}$	105
7.5.2.2.	Wpływ glimepirydu, indometacyny lub benserazydu w połączeniu z doksorubicyną na poziom wewnątrzkomórkowego $Ca^{2+}$	106
7.5.3.	Analiza faz cyklu komórkowego	107
7.5.3.1.	Wpływ glimepirydu, indometacyny lub benserazydu na rozkład faz cyklu komórkowego	107
7.5.3.2.	Wpływ glimepirydu, indometacyny lub benserazydu w połączeniu z doksorubicyną na rozkład faz cyklu komórkowego	110
7.5.4.	Analiza procesu autofagii	113



7.5.4.1.	Indukcja procesu autofagii przez glimepiryd, indometacynę lub benserazyd w komórkach linii Huh-7 i HepG2	113
7.5.4.2.	Indukcja procesu autofagii przez glimepiryd, indometacynę lub benserazyd w kombinacji z doksorubicyną w komórkach linii Huh-7 i HepG2	114
8.	<b>Dyskusja</b>	117
9.	<b>Analiza SWOT w kontekście zastosowania inhibitorów HKII w leczeniu nowotworów</b>	132
10.	<b>Wnioski</b>	134
11.	<b>Streszczenie</b>	135
12.	<b>Summary</b>	137
13.	<b>Literatura</b>	139

## Wykaz stosowanych skrótów i symboli

Skrót	Pełna nazwa
2-DG	2-deoksyglukoza ( <i>ang. 2-deoxyglucose</i> )
3-BP	3-bromopirogronian ( <i>ang. 3-bromopyruvate</i> )
A1AT	Alfa-1-antytrypsyna ( <i>ang. Alpha-1 Antitrypsin</i> )
ACLY	Liaza ATP-cytrynianowa ( <i>ang. ATP-citrate lyase</i> )
ADME	Absorpcja, dystrybucja, metabolizm, eliminacja ( <i>ang. Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion</i> )
ADP	Adenozyno-5'-difosforan ( <i>ang. adenosine diphosphate</i> )
AMPK $\alpha$	Kinaza białkowa aktywowana przez AMP ( <i>ang. AMP-activated protein kinase</i> )
ATP	Adenozyno-5'-trifosforan ( <i>ang. adenosine triphosphate</i> )
Bak	Białko proapoptotyczne ( <i>ang. Bcl-2 homologous antagonist/killer</i> )
BCL-2	Gen bcl-2 ( <i>ang. B-cell-lymphoma/leukemia 2</i> )
Ben	Benzerazyd ( <i>ang. Benserazide</i> )
BNBZ	Benitrobenrazyd ( <i>ang. BeNitroBenraZide</i> )
BTA	analog benzenowo-trikarboksylianowy ( <i>ang. Benzene-Tricarboxylic Acid analog</i> )
CAC	Krytyczne stężenie agregacji ( <i>ang. Critical Aggregation Concentration</i> )
CML	Przewlekła białaczka szpikowa ( <i>ang. Chronic Myeloid Leukemia</i> )
CoA	Koenzym A ( <i>ang. Coenzyme A</i> )
CTP	Mitochondrialne białko transportujące cytrynian ( <i>ang. Citrate Transporter Protein</i> )
DMSO	Dimetylosulfotlenek ( <i>ang. DiMethylSulfoxide</i> )
DNA	Kwas deoksyrybonukleinowy ( <i>ang. DeoxyriboNucleic Acid</i> )
DOX	Dokсорubicyna ( <i>ang. Doxorubicin</i> )
DTT	Ditiotreitol
EGF	Naskórkowy czynnik wzrostu ( <i>ang. Epidermal Growth Factor</i> )
ETC	Łańcuch transportu elektronów ( <i>ang. Electron Transport Chain</i> )
FBS	Bydłęca surowica płodowa ( <i>ang. Foetal Bovine Serum</i> )

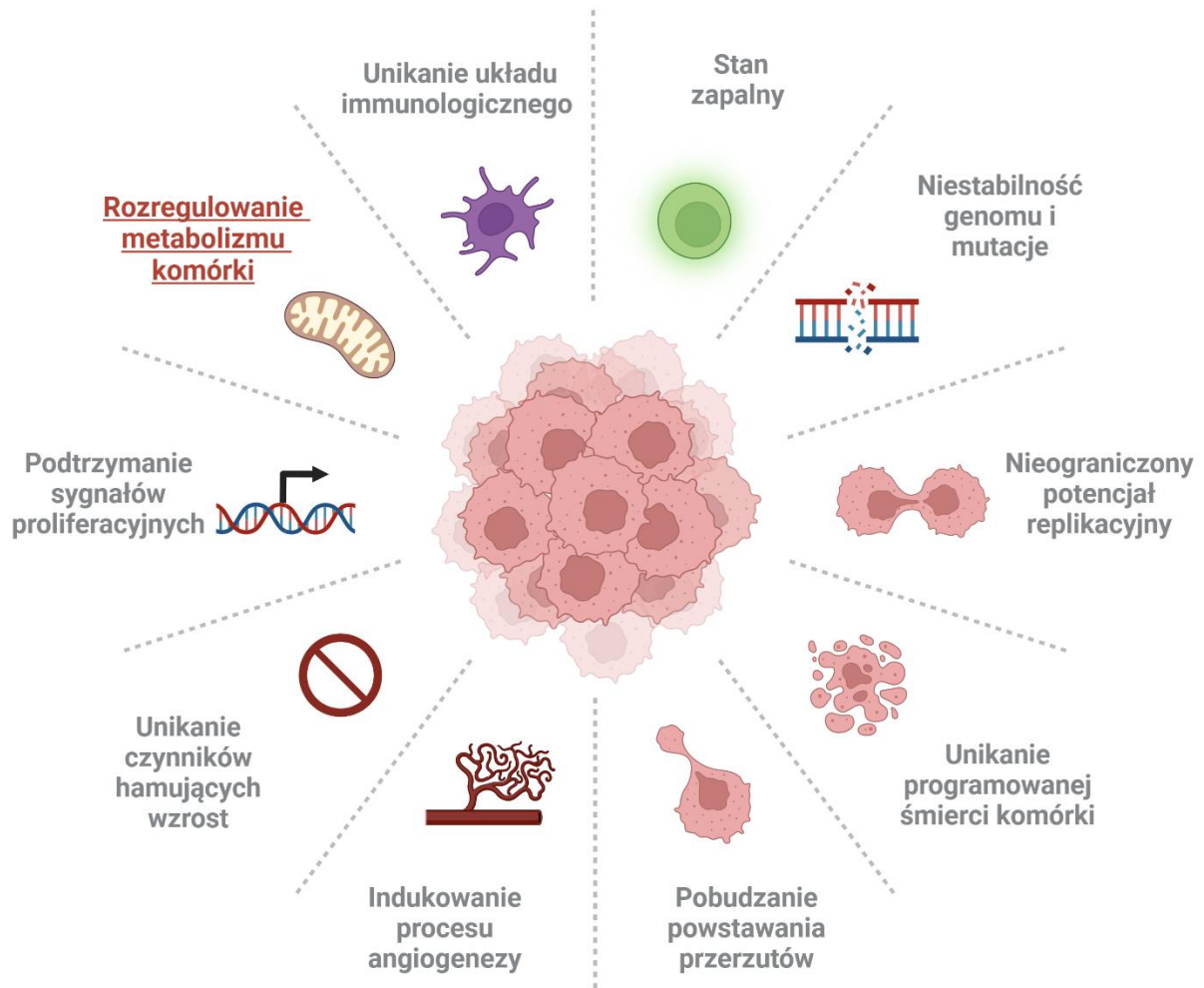
FRAP	Całkowity potencjał antyoksydacyjny ( <i>ang. Free Radical Antioxidative Potential</i> )
G-6-P	glukoza-6-fosforan ( <i>ang. Glucose-6-Phosphate</i> )
GBM	Glejak wielopostaciowy ( <i>ang. Glioblastoma Multiforme</i> )
GCK	Glukokinaza ( <i>ang. Glucokinase</i> )
Glim	Glimepiryd ( <i>ang. Glimpiride</i> )
GSH	Zredukowany glutation
HBSS	Zbuforowany roztwór Hanksa ( <i>ang. Hank's Buffered Salt Solution</i> )
HBV	Wirusowe zapalenie wątroby typu B ( <i>ang. hepatitis B virus</i> )
HCC	Rak wątrobowokomórkowy ( <i>ang. hepatocellular carcinoma</i> )
HCC-PHH	Komórki izolowane z próbek chirurgicznych pochodzących od pacjentów z rakiem wątrobowokomórkowym
HCV	Wirusowe zapalenie wątroby typu C ( <i>ang. hepatitis C virus</i> )
HEPES	Kwas hydroksyetylopiperazynoetanosulfonowy ( <i>ang. 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i> )
HepG2	Zróznicowany ludzki rak wątrobowokomórkowy
HHC	Hemochromatoza ( <i>ang. hereditary hemochromatosis</i> )
HIF-1	Czynnik indukowalny hipoksją ( <i>ang. hypoxia-inducible factor 1</i> )
HKI	Heksokinaza I ( <i>ang. Hexokinase I</i> )
HKII	Heksokinaza II ( <i>ang. Hexokinase II</i> )
HKIII	Heksokinaza III ( <i>ang. Hexokinase III</i> )
HKDC1	Heksokinaza V ( <i>ang. HexoKinase Domain Containing protein 1</i> )
Huh7	Ludzki rak wątrobowokomórkowy
<i>In silico</i>	Badania komputerowe przeprowadzane wirtualnie
Indo	Indometacyna ( <i>ang. Indomethacin</i> )
Km	Stała Michaelisa ( <i>ang. Michaelis constant</i> )
LDH	Dehydrogenaza mleczanowa ( <i>ang. Lactate DeHydrogenase</i> )
L-DOPA	Lewodopa ( <i>ang. Levodopa, ang l-3,4-dihydroxyphenylalanine</i> )
MAPK	Kinaza białkowa aktywowana przez mitogeny ( <i>ang. Mitogen-Activated Protein Kinase</i> )
MCF-7	Linia komórkowa estrogenozależnego gruczolakoraka piersi ( <i>ang. Breast adenocarcinoma cell line</i> )

MMP	Transbłonowy potencjał mitochondrialny ( <i>ang. Mitochondrial Membrane Potential</i> )
MTT	Bromek 3-(4,5-dimetylotriazo-2-yl)-2,5-difenylotetrazolu ( <i>ang. Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide</i> )
PBS	Zbuforowany roztwór soli fizjologicznej ( <i>ang. Phosphate Buffered Saline</i> )
PET	Pozytonowa tomografia emisyjna ( <i>ang. Positron Emission Tomography</i> )
PHC	Pierwotne ludzkie komórki raka wątrobowokomórkowego
PHH	Komórki pierwotnych ludzkich hepatocyty
PI	Jodek propidyny ( <i>ang. Propidium Iodide</i> )
RFA	Reaktywne formy azotu ( <i>ang. Reactive Nitrogen Species</i> )
RFT	Reaktywne formy tlenu ( <i>ang. Reactive Oxygen Species</i> )
TPTZ	2,4,6-tripirydylo-S-triazyna ( <i>ang. 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine</i> )
VDAC	Poryna mitochondrialna ( <i>ang. Voltage Dependent Anion Channel</i> )

## WSTĘP

Nowotwory są jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie, a zachorowalność na nie wciąż rośnie wraz ze wzrostem populacji światowej i wydłużaniem się życia ludzkiego. GLOBOCAN w 2018 roku odnotował 18,1 miliona nowych przypadków raka i 9,6 miliona zgonów na całym świecie. Przewiduje się, że do 2040 r. zachorowalność i śmiertelność z powodu nowotworów wzrosną odpowiednio do 29,5 milionów i 16,3 milionów (International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. GLOBOCAN 2018. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>. stan z dnia 7 lipca 2023). Dane te zwracają uwagę na fakt, że trzeba wzmóc wszelkie wysiłki, zarówno naukowców jak i lekarzy, w celu lepszego zrozumienia złożoności raka i odkrycia nowych strategii terapeutycznych.

Dziesięciolecia badań nad nowotworami doprowadziły do zrozumienia, że przemiana prawidłowej komórki w jej nowotworowy odpowiednik jest procesem wieloetapowym. Każdy z tych etapów odzwierciedla genetyczne adaptacje, które prowadzą do ostatecznej złośliwej formy. Można zauważyć paralele pomiędzy ewolucją darwinowską a procesem nowotworzenia, gdzie każda kolejna zmiana skutkuje nadaniem komórkom przewagi wzrostowej, prowadząc w końcu do powstania guza (Nowell 1976). W 2000 roku Weinberg i Hanahan wskazali cechy charakterystyczne dla nowotworów, które są zasadniczo właściwościami zdobytymi przez komórki nowotworowe w procesie nowotworzenia, umożliwiające im efektywną proliferację i nadające zdolność do przerzutowania (Hanahan i Weinberg 2000). W związku z pojawiającymi się odkryciami naukowymi, które udowadniają, że metabolizm komórek nowotworowych może wpływać i modulować inne właściwości nowotworów, jeszcze wnikliwiej pochyłono się nad bioenergetyką tych komórek, w nadziei, że uda się uchwycić na czym polega „sekret długowieczności” tych komórek i wskazać ich tzw. „czułe punkty” (Ryc. 1.)(Hanahan i Weinberg 2011).



**Ryc. 1.** Cechy i właściwości charakterystyczne dla nowotworów (na podstawie Hanahan i Weinberg 2011). Grafika została stworzona przy pomocy narzędzia Biorender.com.

Badania nad metabolizmem nowotworów mają swoje korzenie w obserwacjach poczynionych przez Otto Warburga, który położył podwaliny pod tę dziedzinę. Podczas gdy współcześni mu badacze wysunęli hipotezę, że *komórki nowotworowe czerpią energię potrzebną do niekontrolowanej replikacji z proteolizy i lipolizy*, w 1927 roku Warburg, badając procesy oddychania i fermentacji w komórkach nowotworowych, odkrył, że szybko zużywają one glukozę przekształcając ją w mleczan (Martínez-Reyes i Chandel 2021, Warburg 2010). Podczas oddychania tlenowego w komórkach prawidłowych glukoza jest przekształcana w pirogronian (glikoliza), który następnie przekształcany jest do acetylo-CoA (reakcja pomostowa). Acetylo-CoA staje się potem substratem rozpoczynającym cykl kwasu trójkarboksylowego (TCA; Cykl Krebsa), w wyniku którego powstają m.in. związki niezbędne do rozpoczęcia fosforylacji oksydacyjnej mającej miejsce w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Opisanym procesom towarzyszy wytwarzanie kwasu mlekowego, aczkolwiek w komórkach prawidłowych jest on produkowany w niewielkich ilościach. Dlatego wyniki badań (*in vivo* i *ex vivo*) Warburga, który zaobserwował zwiększony wychwyty glukozy i podwyższoną produkcję kwasu mlekowego w komórkach nowotworowych, wzbudziły duże zainteresowanie innych badaczy (Bose i in. 2021). Pomimo zakrojonych badań nad metabolizmem komórek nowotworowych i próbą odpowiedzi na zasadnicze pytanie: „*skąd te komórki czerpią energię na niekończące się i wysokoenergetyczne podziały komórkowe*”, Warburg nie znalazł satysfakcjonujących odpowiedzi. Postawił więc hipotezę, że *produkcja mleczanu w komórkach nowotworowych wynika z upośledzenia fosforylacji oksydacyjnej spowodowanej uszkodzeniem mitochondriów* (Liberti i Locasale 2016). Odkrycie to, które owego czasu zostało wyróżnione Nagrodą Nobla i nazwane „efektem Warburga” sprawiło, że przez wiele lat naukowcy nie zagłębiali się w bioenergetykę mitochondriów komórek nowotworowych uznając, że to nie ona jest motorem i źródłem energii niezbędnej do przetrwania tych komórek. Bez wątplenia jedną z przyczyn leżącą u podstaw „pomijania badań nad mitochondrialną wydajnością bioenergetyczną” był brak odpowiedniej aparatury naukowej i rozwiniętej metodologii, które mogłyby pomóc badaczom w rozpoznaniu i opisanu praw rządzących procesami metabolicznymi w komórkach patologicznych, w tym nowotworowych (Bose i in. 2021). Na przestrzeni lat w badaniach metabolicznych i biochemicznych zaproponowano różne mechanizmy przyczyniające się do przejścia z OXPHOS na glikolizę tlenową, takie jak sygnalizacja onkogenna, środowisko hipoksyjne guza oraz nieprawidłowa ekspresja lub zmiana izoform kluczowych enzymów metabolicznych (Cai i in. 2018, Schiliro i Firestein 2022). Jednym z przykładów takich enzymów metabolicznych jest heksokinaza II

(HKII), która wykazuje zmianę izoformy i poziomu ekspresji podczas procesu nowotworzenia. Spośród pięciu izoform heksokinazy (HK), HKII ulega znacznej nadekspresji w większości badanych nowotworów i uważa się, że odgrywa główną rolę w wysoce glikolitycznym fenotypie komórek nowotworowych (DeWaal i in. 2018, Marcucci i Rumio 2021). W ciągu ostatnich dwóch dekad zgromadzono dowody wskazujące na unikalny system regulacyjny, subkomórkową lokalizację i funkcje pełnione przez HKII, które potwierdzają jej kluczową rolę w efekcie Warburga. Funkcje pełnione przez HKII są niezbędne do nadania komórkom nowotworowym zdolności do rozwoju i adaptacji nawet w trudnych warunkach związanych z wahaniami metabolicznymi i ekspozycją na szkodliwe bodźce (Lis i in. 2016). **W związku z tym, wydaje się, że badania nad HKII, których nadrzędnym celem byłoby wypracowanie narzędzi, za pomocą których można byłoby zahamować aktywność tego enzymu, stanowi fascynującą perspektywę dla rozwoju nowych terapii przeciwnowotworowych.**

Z terapiami nowotworowymi opartymi na metabolizmie wiąże się jednak kilka wyzwań. Po pierwsze, zrozumienie heterogeniczności fenotypów metabolicznych komórek nowotworowych jest dopiero na wczesnym etapie. Fenotypy metaboliczne prawdopodobnie różnią się w zależności od tkanki pochodzenia, mikrośrodowiska guza, guzów pierwotnych i przerzutów oraz różnic mutacyjnych (Siegel i in. 2019). Po drugie, istnieją poważne ograniczenia w przełożeniu wyników i wniosków zdobytych i wyciągniętych w badaniach *in vitro* na projektowanie i planowanie badań *in vivo* czy też badań klinicznych (m.in. brak sukcesu w stosowaniu inhibitorów metabolicznych w dotychczasowych badaniach klinicznych świadczy o tym, jakim trudnym wyzwaniem jest stosowanie wiedzy zdobytej w badaniach podstawowych w badaniach na poziomie *in vivo* (Bose i in. 2021). Po trzecie, komórki nowotworowe szybko adaptują się do środowiska, w którym funkcjonują i łatwo zdobywają nowe „źródła energii”, co czyni je bardzo ciekawym materiałem do badań i obserwacji, ale jednocześnie przeszkadza w poszukiwaniu terapii, które byłyby skuteczne w pozbywaniu się tych komórek z organizmu osoby chorej (Lemberg i in. 2022). Niemniej jednak, rozwój badań na chorobami nowotworowymi postępuje w szybkim tempie, a jedną z obecnych możliwości w rękach badaczy jest duża nadzieja pokładana **w łączeniu różnych terapii**, co przynajmniej w teorii ma za zadanie zwiększyć skuteczność leczenia.



Aby w pełni zrozumieć metabolizm w nowotworach potrzebne jest pełne zrozumienie, jak wszystkie szlaki metaboliczne są zintegrowane, aby zapewnić bioenergetyczne i biosyntetyczne wymagania proliferacji komórkowej (Duraj i in. 2021). Jest to jednak złożone zadanie, ponieważ guzy nowotworowe są narażone na działanie szerokiej gamy składników odżywczych, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Dwa składniki odżywcze – najbardziej obficie występujące w osoczu, jak i w pożywkach do hodowli komórek - to glukoza i glutamina (Obara-Michlewska i Szeliga 2020). Razem stanowią one bogate źródło węgla i azotu, pierwiastków niezbędnych w procesach bioenergetycznych i biosyntetycznych, które mają miejsce podczas wzrostu i podziału komórek (Hayes i in. 2020). Pobór i metabolizm glukozy może wspierać wymagania metaboliczne proliferujących komórek nowotworowych z fenotypem Warburga, jednocześnie uzupełniając produkty pośrednie cyklu TCA poprzez metabolizm glutaminy. Co więcej, oszczędza to również bogate w energię substraty, takie jak kwasy tłuszczowe i niezbędne aminokwasy, które mogą być bezpośrednio włączone do makrocząsteczek (Danhier i in. 2017). Wyniki ostatnich badań nad metabolizmem komórek nowotworowych, które tradycyjnie skupiają się na glikolizie i glutaminolizie, sugerują, że przeprogramowanie metabolizmu lipidów w komórkach może bezpośrednio przyczyniać się do złośliwej transformacji i progresji. Dlatego też prawdopodobnie metabolizm lipidów został włączony w wiele procesów onkogennych, w tym kolonizację przerzutów, oporność na leki i różnicowanie komórek. Jednak to, czy możemy bezpiecznie i skutecznie modulować mechanizmy leżące u podstaw heterogeniczności metabolicznej w terapii nowotworów pozostaje wciąż otwartym zagadnieniem i kwestią dość sporną (Ma i in. 2016, Wei i in. 2020).

***Opracowanie skutecznego i selektywnego inhibitora HKII stanowi ogromne wyzwanie,*** ze względu na jej wysoką homologię i podobieństwo funkcji do izoenzymu HKI (Ferreira i in. 2021, Garcia i in. 2018). Dotychczas znane inhibitory heksokinazy II, takie jak 2-deoksyglukoza (2-DG) i 3-bromopirogronian (3-BP) nie rozróżniają poszczególnych izoform (Rai i in. 2019). 3-BP wykazuje się wysoką reaktywnością wobec różnych białek, a te niespecyficzne cele mogą tłumaczyć zgłaszane działania niepożądane, w tym toksyczność wątrobową i żołądkowo-jelitową w modelach zwierzęcych oraz toksyczność wątrobową i nerkową u ludzi, a także śmierć trzech pacjentów onkologicznych po podaniu 3-BP. W związku z tym nie zatwierdzono badań klinicznych dla 3-BP (El Sayed i in. 2014, Zhang i in. 2012). 2-DG może uwrażliwiać lekooporne komórki nowotworowe na cisplatynę lub paklitaksel, ale jego stosowanie zostało zarzucone po wystąpieniu działań niepożądanych i toksyczności podczas badań klinicznych (Garcia i in. 2018).

# I. METABOLIZM KOMÓRKOWY

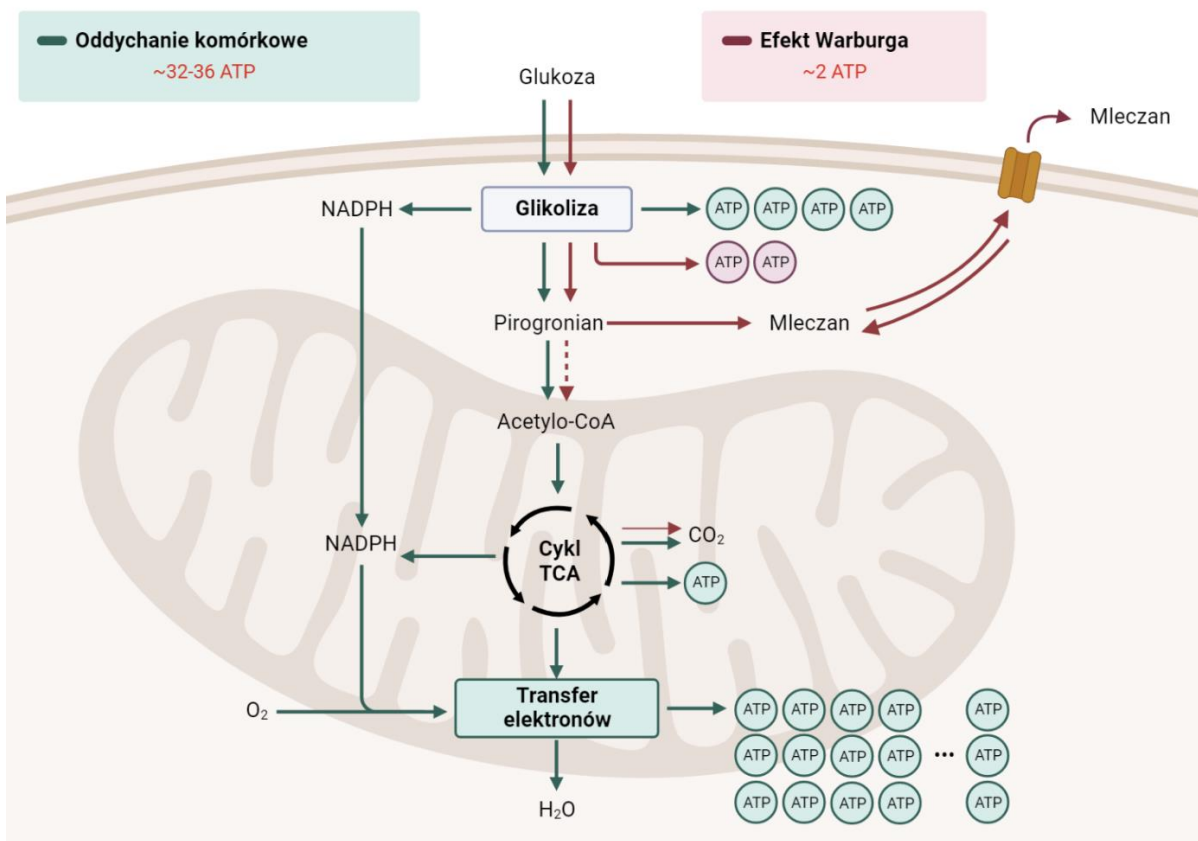
## 1.1. Metabolizm komórek – czym jest i na czym polega

Metaboliczne przeprogramowanie w komórkach nowotworowych odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu wysokiego poziomu proliferacji i sprzyja przeżyciu komórek. Metabolizm komórkowy definiowany jest przez trzy główne zadania, którymi są:

- utrzymanie rezerw energetycznych komórki (poprzez regenerację ATP i NADPH),
- biosynteza makrocząsteczek niezbędnych dla homeostazy komórkowej,
- utrzymanie stanu redoks komórki (Spinelli i Haigis 2018).

Aby spełnić ww. wymagania, szczególnie w szybko proliferujących komórkach nowotworowych, kluczowym jest sprawny obieg składników odżywczych. Co więcej, zdolność komórek nowotworowych do przełączania się między substratami energetycznymi i szlakami metabolicznymi (określana jako elastyczność bioenergetyczna) wiąże się ze złym rokowaniem, w tym z przerzutami (Herst i in. 2022).

Glikoliza tlenowa zachodzi w komórce wtedy, gdy poziom tlenu jest wystarczająco duży, a produktem końcowym jest pirogronian i wytworzone zostają cząsteczki ATP. W prawidłowych komórkach mitochondria funkcjonują jako centra energetyczne komórki, gdzie fosforylacja oksydacyjna (OXPHOS) i łańcuch transportu elektronów są wykorzystywane do produkcji ATP w celu zaspokojenia potrzeb bioenergetycznych (Heiden i in. 2009, Nolfi-Donagan i in. 2020). Tlenowy rozkład glukozy składa się z czterech etapów: glikolizy, utleniania pirogronianu (reakcja pomostowa), cyklu Krebsa i łańcucha transportu elektronów (ETC). W wyniku fosforylacji oksydacyjnej powstaje 32-36 cząsteczek ATP i proces ten wymaga obecności tlenu do jego ukończenia (Ryc. 2.) (Mookerjee i in. 2018, Zhao i in. 2019).



**Ryc. 2.** Różnice między oddychaniem tlenowym a glikolizą tlenową (efekt Warburga). W komórkach prawidłowych, w obecności tlenu, zachodzi proces oddychania tlenowego - zaznaczony kolorem zielonym. Natomiast komórki nowotworowe wykorzystują glikolizę tlenową – zaznaczoną kolorem czerwonym. Grafika ta została stworzona przy pomocy narzędzia Biorender.com.

Nasilona glikoliza jest głównym źródłem zaopatrzenia w energię w komórkach nowotworowych, które wykorzystują ten szlak metaboliczny do wytwarzania ATP. W ten sposób powstaje znacznie mniej energii niż w przypadku fosforylacji oksydacyjnej, co wydaje się paradoksalne, ponieważ komórki nowotworowe wymagają dużo energii do wzrostu (Zhang i Yang 2013, Zheng 2012). Jednak liczne dowody wskazują, że glikoliza daje komórkom nowotworowym przewagę we wzroście. Glikoliza działa jako szlak prekursorowy, ponieważ jej metabolity i produkty są wymagane do dalszych szlaków biochemicznych, w tym cyklu kwasu trójkarboksylowego (TCA) i OXPHOS, szlaku pentozofosforanowego (PPP) do syntezy rybonukleotydów i NADPH, glikozylacji i glukoneogenezy, biosyntezy aminokwasów i syntezy kwasów tłuszczowych (Hay 2016). W nowotworach, oprócz glikolizy, nasilony jest również szlak PPP dostarczając anabolicznych substratów do wzrostu nowotworu oraz redukcyjnych intermediatów (NADPH) do syntezy glutationu i ochrony przed uszkodzeniami oksydacyjnymi (Catanzaro i in. 2015).

## **1.2. Efekt Warburga w nowotworach**

Glikoliza to uniwersalny szlak katabolizmu glukozy, podczas którego przekształcana jest jedna cząsteczkę glukozy w dwie cząsteczki kwasu pirogronowego, a uwolniona energia jest zachowywana w postaci ATP i równoważnika redukcyjnego NADH (Bender 2013). Dalsze reakcje zachodzące z udziałem pirogronianu pochodzącego z glukozy zależą od typu komórki i od warunków środowiskowych. W dobrze natlenionej, zróżnicowanej tkance pirogronian trafia do mitochondriów i jest całkowicie utleniony do CO<sub>2</sub>, w procesie tym powstaje między 32 a 36 moli ATP na 1 mol glukozy. W warunkach niedoboru tlenu pirogronian jest przekształcany w kwas mlekowy. Reakcja ta jest katalizowana przez dehydrogenazę mleczanową (LDH) i ułatwia konwersję NADH do NAD<sup>+</sup>, który jest niezbędnym kofaktorem dla szlaku glikolitycznego (Chaudhry i Varacallo 2018).

Komórki proliferujące, w tym komórki nowotworowe, metabolizują glukozę w mleczan poprzez glikolizę, nawet w obecności dużych zasobów tlenu (aczkolwiek jest to znacznie mniej wydajny sposób produkcji ATP) (Weber 2016).

Pierwotnie Otto Warburg postulował, że *glikoliza tlenowa jest zaangażowana w kancerogenezę i zachodzi w wyniku defektu mitochondriów* (Warburg 1956). Jednak badania z ostatnich kilku lat wskazują, że **mitochondria większości komórek nowotworowych nie są uszkodzone**, co sugeruje, że ograniczona pojemność oksydacyjna nie jest powodem efektu Warburga występującego w nowotworach (Denko 2008, Moreno-Sánchez i in. 2007). Zaproponowano wiele przyczyn istnienia efektu Warburga w proliferujących komórkach. Jednym z powszechnie znanych wyjaśnień jest to, że efekt Warburga spełnia metaboliczne wymagania proliferujących komórek, ponieważ prowadzi do zwiększenia ilości półproduktów glikolitycznych i tym samym zapewnia mechanizm przekierowania tych półproduktów do biosyntezy wymaganej dla wzrostu i proliferacji komórek (Heiden i in. 2009).

Efekt Warburga może początkowo wydawać się nieefektywnym sposobem zaspokojenia biosyntetycznych i bioenergetycznych wymagań proliferacji, jednak ten fenotyp metaboliczny zapewnia komórkom nowotworowym szereg korzyści (Vazquez i in. 2010). Po pierwsze, glikoliza tlenowa umożliwia przetrwanie komórce w warunkach zmiennych poziomów tlenu. Podczas gdy wydajność produkcji ATP na jedną cząsteczkę glukozy jest niższa w glikolizie tlenowej niż w fosforylacji oksydacyjnej, tempo metabolizmu glukozy na drodze glikolizy tlenowej jest wyższe, co skutkuje produkcją mleczanu z glukozy od 10 do 100 razy szybciej niż proces utleniania glukozy w mitochondriach. W rzeczywistości ilość ATP syntetyzowanego w danym czasie jest porównywalna, gdy wykorzystywana jest jedna lub druga forma metabolizmu glukozy. Inną zaletą zwiększonego poziomu glikolizy jest to, że może ona zapewnić kolejny mechanizm regulacji ścieżek biosyntetycznych, które wykorzystują półprodukty glikolityczne. Na przykład, półprodukty glikolityczne mogą być przekierowane do szlaku pentozowofosforanowego w celu wygenerowania NADPH dla obrony antyoksydacyjnej i syntezy kwasów tłuszczowych. Produkty uboczne glikolizy, takie jak kwasy dwuwęglowe i mleczan, sprzyjają rozwojowi guza i tłumią przeciwnowotworowe czynniki odpornościowe (DeBerardinis i in. 2008). Ponadto, wydzielany mleczan może być pobierany przez komórki zrębu poprzez transportery monokarboksyłanowe-1, -2 i przekształcany w pirogronian. Co więcej, kwaśne środowisko zapewnia tkankom nowotworowym przewagę nad prawidłowymi tkankami w ich wzroście oraz sprzyja inwazji i przerzutom komórek nowotworowych (Rattigan i in. 2012).

Jednakże istnieją dowody w postaci wyników badań, że tylko niewielka część atomów węgla pochodząca z glukozy w wysokoglikolitycznych komórkach nowotworowych jest przekształcana w prekursory biosyntezy, takie jak aminokwasy czy nukleotydy. Bardziej prawdopodobnym wyjaśnieniem obecności efektu Warburga jest to, że komórki o wysokim zapotrzebowaniu na energię metabolizują glukozę do mleczanu poprzez glikolizę w celu szybszej produkcji ATP i regeneracji  $\text{NAD}^+$ . Proces ten jest zatem samonapędzający się, stale zapewniając odpowiednie środowisko komórkowe dla utrzymania szlaku glikolitycznego (Mookerjee i in. 2018). Mimo, że glikoliza jest uważana za mniej wydajny sposób produkcji ATP niż OXPHOS, to może ona zachodzić szybciej prowadząc do szybkiej syntezy ATP przy większym zużyciu glukozy. Do innych wyjaśnień należy zaliczyć to, że komórki mogą wykorzystywać glikolizę zamiast OXPHOS do wytwarzania energii, aby dać szansę mitochondriom na udział w innych procesach, takich jak biosynteza aminokwasów i lipidów. Chociaż przyczyny występowania efektu Warburga oraz korzyści, jakie przynosi on komórkom nowotworowym, pozostają w dużej mierze niepewne i wymagają dalszych badań, niemniej jednak scharakteryzowano kilka mechanizmów i czynników, które mogą stanowić silne argumenty na rzecz opisanego zjawiska. Do najważniejszych czynników sprzyjających występowaniu efektu Warburga w komórkach nowotworowych należy zaliczyć szlak fosfoinozytydowej 3-kinazy (PI3K), czynniki transkrypcyjne Myc i HIF-1 oraz enzymy glikolityczne (Liberti i Locasale 2016).

Należy pamiętać, że glikoliza tlenowa nie jest cechą charakterystyczną wyłącznie dla komórek nowotworowych. Wiele komórek nie zmienionych nowotworowo również wykazuje wysoki poziom glikolizy tlenowej podczas szybkiej proliferacji. Co więcej, nie wszystkie komórki nowotworowe mają dysfunkcyjne mitochondria, a udział glikolizy i fosforylacji oksydacyjnej w produkcji ATP różni się znacznie zarówno wśród komórek prawidłowych, jak i nowotworowych. Udział glikolizy w całkowitej produkcji ATP w komórkach nowotworowych waha się od 2% do aż 60%, co pokazuje, że nie wszystkie komórki nowotworowe mają defekty w metabolizmie mitochondrialnym (Shiratori i in. 2019, Zu i Guppy 2004). Ponadto wzrost i podziały komórkowe nadal wymagają produkcji lipidów, białek i kwasów nukleinowych, do których glukoza może być donorem węgla. Duża część prekursorów metabolicznych niezbędnych do biosyntezy tych makrocząsteczek jest również wytwarzana przez mitochondrialny cykl TCA. Metabolizm glukozy stanowi zatem tylko jeden element złożonej układanki metabolizmu komórek nowotworowych (Martínez-Reyes i Chandel 2020).

### 1.3. Liczne aspekty metabolicznego przeprogramowania nowotworów

Metabolizm jest podstawowym procesem dla wszystkich funkcji komórkowych. Od dziesięcioleci pojawia się coraz więcej dowodów świadczących o związku między metabolizmem, a proliferacją komórek nowotworowych (Devendran i in. 2022). W odróżnieniu od prawidłowo zróżnicowanych komórek, komórki nowotworowe mają przeprogramowany metabolizm w celu zaspokojenia swoich potrzeb energetycznych. Komórki te wykazują istotne modyfikacje w wielu szlakach metabolicznych, w tym w transporcie glukozy, glutaminolizie, która obejmuje cykl kwasu trójkarboksylowego (TCA), łańcuchu transportu elektronów (ETC) oraz szlaku pentozowofosforanowego (PPP). Od czasu opisanego efektu Warburga wykazano, że metabolizm komórek nowotworowych odgrywa krytyczną rolę w przeżyciu i wzroście nowotworu (Vander Heiden i DeBerardinis 2017).

#### 1.3.1. Glutaminoliza

Oprócz glukozy, proliferujące komórki nowotworowe wykorzystują również glutaminę jako źródło energii i budulca. Stan ten znany jest jako *uzależnienie od glutaminy*. W rzeczywistości niektóre komórki nowotworowe są tak zależne od tego związku, iż odnotowano ich śmierć w przypadku braku egzogennej glutaminy (Yang i in. 2017). Wiele komórek nowotworowych w hodowli komórkowej (warunki *in vitro*) wykazuje zwiększony poziom wychwytu i metabolizmu glutaminy, który znacznie przekracza wykorzystanie innych aminokwasów. Glutamina w metabolizmie nowotworów, podobnie jak glukoza, odgrywa istotną rolę (Cluntun i in. 2017). W wyniku metabolizmu glutaminy powstaje zarówno energia w postaci ATP, jak i szereg produktów pośrednich niezbędnych do reakcji biosyntetycznych. Glutamina jest jednym z najobficiej występujących w krwiobiegu aminokwasów egzogennych (stanowi ponad 20% puli wolnych aminokwasów w osoczu *in vivo*) i bierze udział w każdym szlaku biosyntezy w proliferujących komórkach (Hensley i in. 2013, Reitzer i in. 1979). Ponadto, pełni rolę donora azotu w syntezie puryn i pirymidyn, a także prekursora biosyntezy białek i glutationu. Ponieważ  $\alpha$ -ketoglutaran ( $\alpha$ -KG) pochodzący z glutaminy dostarcza metabolitów do cyklu TCA, komórki nowotworowe mogą wykorzystywać glutaminolizę do podtrzymywania biosyntezy wielu istotnych cząsteczek. Acetylo-CoA jest niezbędnym półproduktem do syntezy lipidów, a bez niego komórki nowotworowe nie są zdolne do życia (Vanhove i in. 2019). Co więcej, produkty pośrednie cyklu TCA są potrzebne do syntezy innych istotnych składników komórkowych. Tak więc komórki mogą stać się całkowicie zależne od

glutaminolizy w wyniku zmian genetycznych wpływających na oksydacyjną funkcję mitochondriów (Mullen i in. 2012).

Ponadto, wiele z powszechnie występujących w nowotworach mutacji onkogenów i genów supresorowych, które regulują metabolizm glukozy, jest również zaangażowanych w regulację metabolizmu glutaminy (Marbaniang i Kma 2018). Jednym z takich przykładów jest onkogen *myc*, odgrywa on ważną rolę w katabolizmie oraz anabolizmie glutaminy. Promuje wychwytywanie glutaminy poprzez aktywację transporterów glutaminy (SLC1A5 i SLC38A5) oraz zwiększenie translacji genu glutaminazy 1. Co więcej, w komórkach z wysokim poziomem białka MYC zaobserwowano zwiększoną ekspresję syntetazy glutaminy (GS), która katalizuje syntezę glutaminy *de novo* z glutaminianu i amoniaku. (Dong i in. 2020, Kim i Kim 2013). Badania nad przepływem glukozy i glutaminy znakowanych izotopami wykazały, że komórki nowotworowe poddane hipoksji lub komórki nowotworowe z niedoborem białka von Hippel-Lindau (VHL) wykorzystują redukcyjny metabolizm glutaminy do generowania cytrynianu do syntezy lipidów. Dlatego też komórki z niedoborem VHL, które wykazują konstytutywną aktywność HIF-1 $\alpha$  i/lub HIF-2 $\alpha$ , stały się silnie zależne od glutaminy w trakcie proliferacji. Ponadto, komórki nowotworowe z dysfunkcyjnymi mitochondriami również wykorzystują redukcyjną dekarboksylację glutaminy w celu kompensacji braku metabolizmu mitochondrialnego (Gameiro i in. 2013, Wang i Semenza 1995).

### **1.3.2. Podwyższona synteza kwasów tłuszczowych w nowotworach**

Kwasy tłuszczowe są kwasami karboksylowymi zawierającymi długi łańcuch węglowodorowy i są prekursorami fosfolipidów, estrów cholesterolu i triacylogliceroli. Funkcjonowanie większości komórek zależy od dostarczania lipidów ze środowiska, w którym żyją. W przeciwieństwie do komórek prawidłowych, komórki nowotworowe aktywują *de novo* lipogenezę (Butler i in. 2020). W przeprowadzonych badaniach z użyciem znakowanej węglem <sup>14</sup>C glukozy wykazano, że w tkankach zmienionych nowotworowo syntetyzowane są lipidy, niezależnie od zawartości lipidów zewnątrzkomórkowych (Medes i in. 1953).

Aczkolwiek należy tu podkreślić, że rola lipogenezы *de novo* w komórkach nowotworowych nie jest w pełni poznana (Menendez i Lupu 2007). Zaobserwowano, że wiąże się ona z pewnymi korzyściami dla komórek nowotworowych, modyfikacjami funkcji białek poprzez lipidację, dostarczaniem lipidów do biogenezy błon oraz „paliwa” komórkom nowotworowym, które może być wykorzystane podczas niedoboru składników odżywczych



poprzez utlenianie kwasów tłuszczowych i prekursorów syntezy lipidów (Rysman i in. 2010). Ponadto, regulacja  $\beta$ -oksydacji mitochondrialnej może wspomagać energetykę komórek nowotworowych i homeostazę redoks, podczas gdy przekąźniki lipidowe mogą regulować główne szlaki sygnałowe lub koordynować mechanizmy immunosupresyjne. Dlatego też uważa się, że metabolizm lipidów powinien zwrócić naszą uwagę podczas badania wielu procesów onkogennych, w tym kolonizacji przerzutów, oporności na leki i różnicowania komórek (Cheng i in. 2022).

Podstawowym źródłem biosyntezy kwasów tłuszczowych jest cytrynian, który powstaje w mitochondriach w dwuetapowym procesie:

- dekarboksylacji pirogronianu do postaci acetylo-CoA (tzw. reakcja pomostowa),
- kondensacji grupy acetylowej acetylo-CoA ze szczawiooctanem, w wyniku której powstaje sześciowęglowy cytrynian (cykl Krebsa)

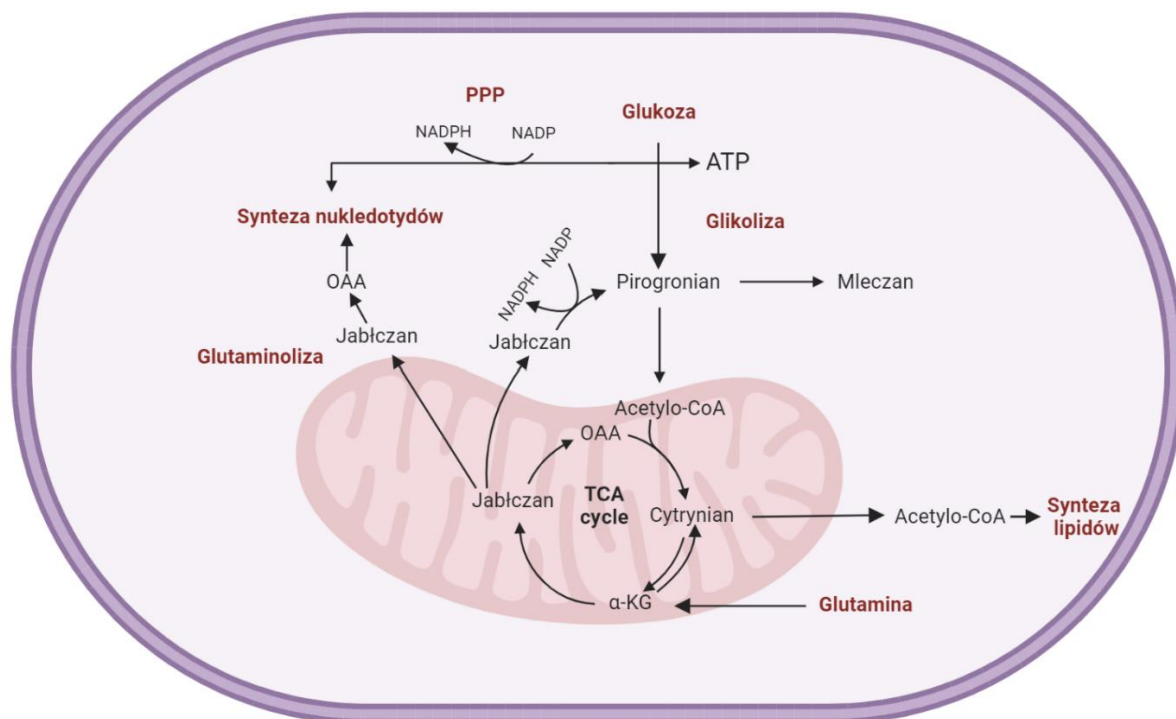
Biosynteza kwasów tłuszczowych jest procesem zachodzącym w cytoplazmie, dlatego cytrynian musi być transportowany z mitochondriów do cytoplazmy (Mycielska i in. 2009, Park i in. 2018).

Zwiększona ekspresja enzymów metabolicznych zaangażowanych w lipogenezę, została odnotowana w różnych nowotworach. Zahamowanie lub ablacja tych enzymów prowadzi do zmniejszenia proliferacji i wzrostu guza. Zaobserwowano zwiększoną aktywność kluczowego enzymu syntezy kwasów tłuszczowych - liazy ATP-cytrynianowej (ACLY) - w wielu rodzajach nowotworów, w tym w raku piersi, płuc, wątroby i pęcherza moczowego (Migita i in. 2008, Turyn i in. 2003, Yahagi i in. 2005, Yancy i in. 2007, Yoon i in. 2007). W badaniach stwierdzono, że ekspresja ACLY była znacząco wyższa w gruczolakoraku płuc w porównaniu z prawidłową tkanką płucną. Korelowała ona również ze stopniem zaawansowania, zróżnicowania i gorszym rokowaniem. Hamowanie aktywności ACLY zatrzymywało wzrost komórek raka płuc *in vitro* i *in vivo*. Zatrzymanie wzrostu wywołane przez inhibicję ACLY było związane z wewnątrzkomórkową akumulacją lipidów, pomimo zahamowania lipogenezy *de novo* (Migita i in. 2008). Ponadto wykazano, że mitochondrialne transportery cytrynianu, takie jak mitochondrialne białko transportujące cytrynian (CTP) odgrywają ważną rolę w zapobieganiu uszkodzeniom mitochondriów i zachowaniu ich funkcji, m.in. w bioenergetyce komórkowej zahamowanie CTP skutkowało działaniem antynowotworowym *in vivo*. Chociaż zaobserwowano zmniejszenie syntezy

kwasów tłuszczowych z glukozy w wyniku supresji zależnego od CTP transportu cytrynianu przez analog benzenowo-trikarboksylianowy (BTA), to efekt ten odgrywał tylko częściową rolę w zmniejszeniu rozmiaru guza, ponieważ całkowity poziom kwasów tłuszczowych nie był drastycznie zmieniony (Catalina-Rodriguez i in. 2012).

### **1.3.3. Metaboliczne przeprogramowanie**

Metabolizm obejmuje zakres reakcji chemicznych poświęconych energetyce, które zachodzą w żywych komórkach. Szereg etapów katalizowanych przez określone enzymy tworzy komórkowe szlaki metaboliczne, dostarczając metabolitów i energii, które wspierają czynności komórkowe niezbędne do prawidłowego funkcjonowania (Judge i Dodd 2020). Niemniej jednak, w celu zrównoważenia anabolicznych i katabolicznych potrzeb w komórce, enzymy metaboliczne są dynamicznie regulowane w złożony, zależny od wielu czynników sposób. . Obserwuje się rosnące zainteresowanie tym, że szlaki metaboliczne mogą być przeprogramowane, aby umożliwić adaptację komórek do wahań dostępności poszczególnych składników odżywczych oraz mogą być one ze sobą wzajemnie powiązane (Brooks Robey i in. 2015, Palmer 2022). Wysokie tempo glikolizy prowadzące do produkcji mleczanu odróżnia komórki nowotworowe od komórek prawidłowych, przy czym glukozie można nadać miano nadzwyczajnego "paliwa" dla komórki nowotworowej, jak i również prekursora do dostarczania różnych półproduktów metabolicznych, które służą do syntezy lipidów, aminokwasów i nukleotydów (Jiang 2017, Schiliro i Firestein 2021). Co więcej, komórki nowotworowe przekierowują węgiel z glikolizy do szlaku PPP, dzięki któremu komórki nowotworowe syntetyzują makrocząsteczki, takie jak kwasy nukleinowe (Patra i Hay 2014). Z kolei glutamina, napływając do mitochondriów, uzupełnienia produktów pośrednich cyklu Krebsa. Ponadto, cytrynian i acetylo-CoA są kluczowymi produktami pośrednimi w syntezie lipidów (Ryc. 3.) (Altman i in. 2016). Skoro te szlaki metaboliczne mają wzajemne powiązania, zrozumienie mechanizmu(ów) prowadzącego(ych) do tego metabolicznego przełączenia w komórkach nowotworowych jest niezwykle ważne.



**Ryc. 3.** Metaboliczne powiązania i zależności zachodzące w komórkach nowotworowych. Przedstawiono procesy metaboliczne, takie jak: glikoliza, glutaminoliza, szlak pentozofosforanowy (PPP), synteza lipidów i nukleotydów (na podstawie De Berardinis i Chandel 2016). Grafika została stworzona przy użyciu narzędzia Biorender.com.

#### 1.4. Modyfikacje enzymów metabolicznych

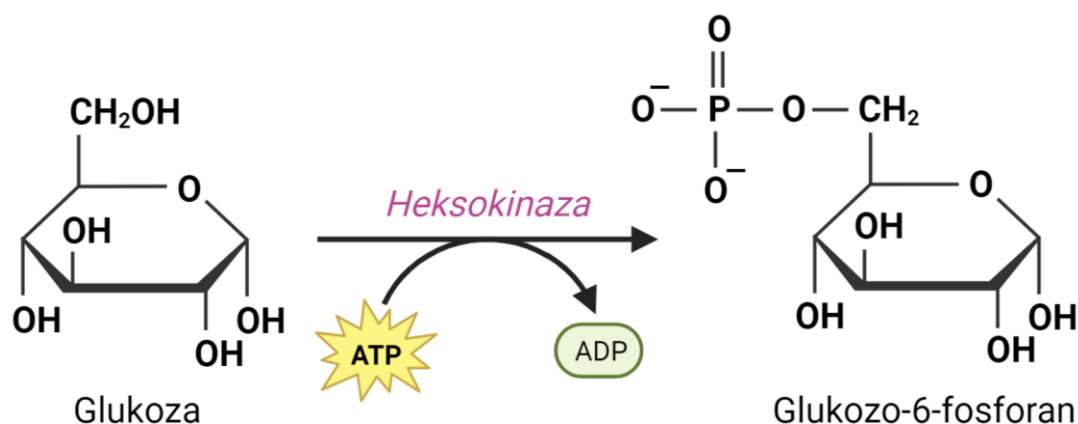
Metabolizm komórkowy zapewnia wzrost i proliferację komórek dostarczając ATP i składniki budulcowe generowane przez katalizę wewnątrzkomórkowych reakcji chemicznych z udziałem enzymów metabolicznych. Enzymy metaboliczne są katalizatorami białkowymi, które przyspieszają reakcje biochemiczne, które zachodzą pod ścisłą kontrolą w określonych miejscach subkomórkowych (Liu i Sabatini 2020, Lu i Wang 2018). Enzymy metaboliczne, takie jak karboksylazy, dehydrogenazy, lipooksygenazy, oksydoreduktazy, kinazy i transferazy wykonują szeroki zakres czynności katalitycznych i są odpowiedzialne za wiele funkcji komórkowych niezbędnych do homeostazy i przetrwania komórki (Lu i Wang 2018).

Dane przedstawione w najnowszych publikacjach wskazują, że niektóre enzymy metaboliczne w pewnych, specyficznych warunkach mogą pełnić nietypowe jak dla siebie funkcje. Zjawisko to określane jest jako *moonlighting* (Jeffery 2018, Pan i in. 2021, Y. Zhang i in. 2020). Zebrane dowody potwierdzają wyłaniający się paradygmat, zgodnie z którym enzymy metaboliczne i związane z nimi metabolity (wykazujące funkcję moonlighting) stanowią wielofunkcyjne węzły, zapewniające plastyczność i adaptację na czynniki środowiskowe, takie jak zmiany temperatury, zmieniony metabolizm czy niedotlenienie (Sun i in. 2022).

Jak już wcześniej wspomniano, w procesie glikolizy dochodzi do przekształcenia glukozy w pirogronian poprzez szereg pośrednich metabolitów, co ostatecznie tworzy ATP i NADH. U większości organizmów glikoliza zachodzi w cytozolu. Tymczasem w jądrze komórkowym obserwuje się coraz większą liczbę enzymów glikolitycznych, które są zaangażowane w regulację transkrypcji poprzez bezpośrednie wiązanie się z DNA lub funkcjonowanie jako kofaktory transkrypcji (Boukouris i in. 2016, Li i in. 2017).

#### 1.4.1. HKII: gdzie, jak i dlaczego?

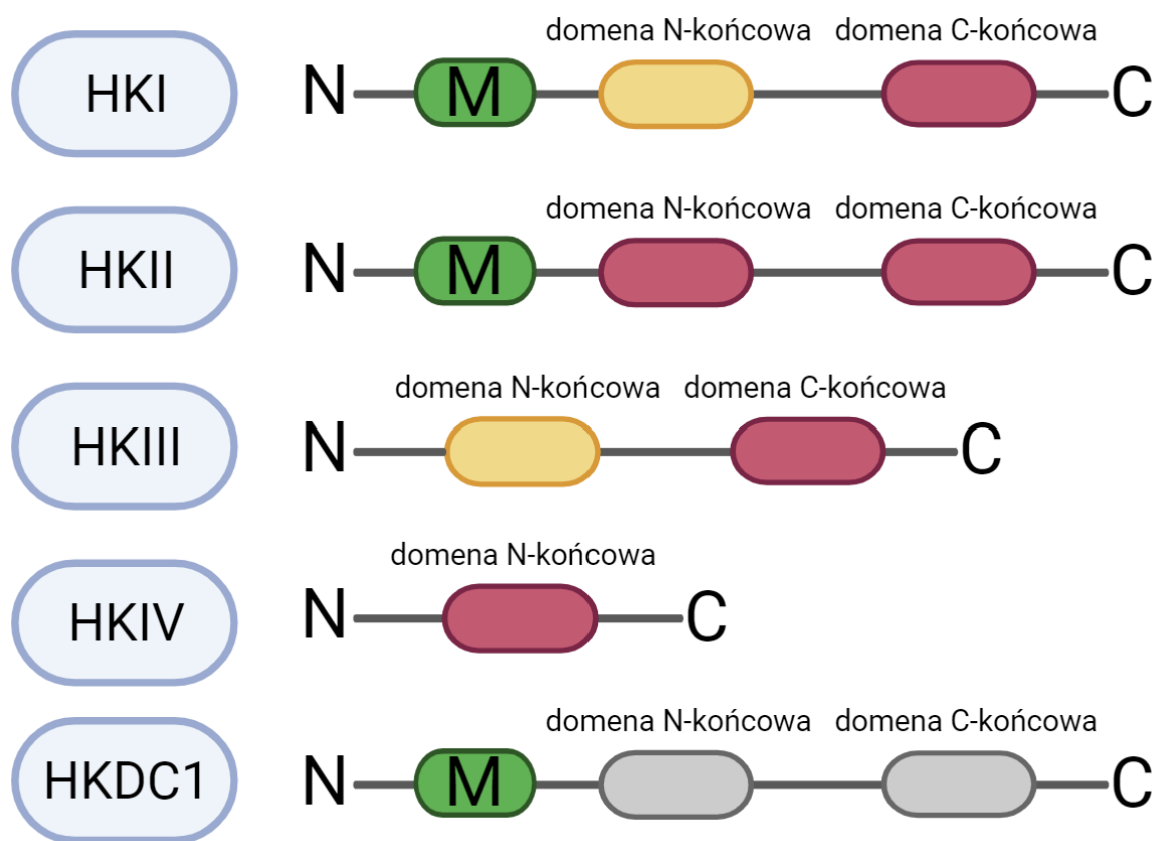
Heksokinazy (HKs) to rodzina pięciu białek, które są odpowiedzialne za fosforylację glukozy do glukozy-6-fosforanu (G-6-P) (Ryc. 4.), który jest metabolizowany w szlakach glikolitycznych, glikogenicznych, szlaku pentozofosforanowym i podczas biosyntezy heksozaminy. Odgrywa on kluczową rolę w syntezie ATP, magazynowaniu glukozy, wzbogacaniu puli NADH i glikozylacji białek (Ciscato i in. 2021, Hay, 2016).



**Ryc. 4.** Reakcja fosforylacji glukozy do glukozy-6-fosforanu katalizowana przy udziale heksokinazy. Grafika została stworzona przy pomocy narzędzia Biorender.com.

Istnieje pięć izoform HK, w tym stosunkowo niedawno odkryty piąty izozym nazwany HKDC1 (HexoKinase Domain Containing protein 1). HKI-3 i HKDC1 to białka, które prawdopodobnie powstały w wyniku duplikacji i fuzji pierwotnego genu (Garcia i in. 2018). Izoforma HKI stanowi dominującą formę heksokinaz i jej ekspresja zachodzi w większości tkanek; HKII ulega mniejszej ekspresji niż HKI, ale jest głównym izozymem w tkankach wrażliwych na insulinę, takich jak mięsień sercowy, mięśnie szkieletowe i tkanka tłuszczowa, a także w komórkach nowotworowych (Patra i in. 2013). HKIII i HKDC1 są słabiej scharakteryzowane niż pozostałe izoformy. Uważa się, że aktywność HKIII jest hamowana aktywność przez fizjologiczne stężenia glukozy (Garcia i in. 2018). HKIV czyli glukokinaza (GCK), który ulega ekspresji głównie w wątrobie i trzustce (Matschinsky i Wilson 2019). Typy 1-3 wykazują wysokie powinowactwo ( $K_m=0,02-0,03$  mM) do glukozy, a ich masa cząsteczkowa jest bliska 100 kDa. Natomiast glukokinaza ma znacznie niższe powinowactwo do glukozy ( $K_m=5-8$  mM), jest niewrażliwa na G-6-P i jej masa cząsteczkowa jest zbliżona do 50 kDa (Andreone i in. 1989, Nishi i in. 1988, Schwab i Wilson 1991).

Wszystkie heksokinazy występują w cytozolu, ale HKI i HKII mogą również wiązać się do mitochondriów poprzez domenę N-końcową. Motyw ten jest nieobecny w pozostałych izoenzymach (Mathupala i in. 2006). Z wyjątkiem HKIV, wszystkie pozostałe HK posiadają dwie domeny N- i C-końcowe, ale obie są aktywne tylko w HKII, natomiast HKI, HKIII i HKDC1 zachowują aktywność tylko w domenie C-końcowej (Ryc. 5.) (Garcia i in. 2018).



**Ryc. 5.** Izoformy heksokinazy. Domenę o aktywności katalitycznej oznaczono kolorem czerwonym, a pozbawione tej aktywności - żółtym. HKDC1 posiada bardzo niską aktywność katalityczną, dlatego obie jej domeny są szare. Domenę wiążącą się z mitochondriami zaznaczono literą M (na podstawie Farooq i in. 2023). Grafika została stworzona przy użyciu narzędzia Biorender.com.

#### 1.4.2. O roli heksokinazy II w metabolizmie nowotworów

Uważa się, że HKII jest izoformą heksokinazy "specyficzną dla nowotworów", ponieważ jest to główna izoforma, której poziom jest podwyższony w nowotworach o wysokiej aktywności glikolitycznej (Pedersen i in. 2002). Pierwszym etapem glikolizy jest fosforylacja glukozy przez heksokinazę w celu wytworzenia glukozy-6-fosforanu (G-6-P). Izoforma HK, HKI, hamuje produkcję RFT poprzez wiązanie się z zewnętrzną błoną mitochondrium, chroniąc w ten sposób komórki przed śmiercią wywołaną stresem oksydacyjnym (Abu-Hamad i in. 2008). Natomiast HKII chroni komórki przed apoptozą indukowaną stresem oksydacyjnym

poprzez wiązanie z kanałem anionowym zależnym od potencjału (VDAC) (Pedersen 2007, Wilson 2003). Interakcja VDAC z HKII zakłóca translokację Bax do mitochondrium i w ten sposób hamuje apoptozę indukowaną wyciekami cytochromu c (Pastorino i in. 2002). W dodatku, HKII może również hamować apoptozę komórek nowotworowych poprzez hamowanie zmian w przepuszczalności błony mitochondrialnej. Białko TIGAR (regulator glikolizy i apoptozy indukowany przez białko p53) , może tworzyć kompleks z HKII i zwiększać aktywność HKII w warunkach hipoksji, a wewnątrzkomórkowy metabolizm glukozy ulega zmianie z glikolizy na PPP, kontrolując w ten sposób poziom mitochondrialnego RFT i możliwość przeżycia komórek nowotworowych (Flöteri in. 2017, Ko i in. 2016). HKII odgrywa ważną rolę nie tylko w glikolizie, ale także w procesie autofagii. HKII bezpośrednio wiąże i hamuje supresor autofagii kompleks mTORC1 poprzez motyw TOS, promując w ten sposób funkcję ochronną autofagii w odpowiedzi na niedobór glukozy (Roberts i in. 2014, Tan i Miyamoto 2016). W dodatku autofagia indukowana przez HKII może wywoływać oporność na chemioterapię w pewnych modelach nowotworów (Liu i in. 2019, Zhang i in. 2018). Według badań przeprowadzonych w warunkach *in vitro*, HKII indukuje różnicowanie monocytów poprzez indukcję autofagii (Singh i Sen 2017). Jako, że różnicowanie makrofagów wiąże się ze złożonym przeprogramowaniem metabolicznym, a indukcja glikolizy powoduje powstawanie prozapalnych i przeciwnowotworowych makrofagów typu M1, możliwe jest rozważenie szerszej roli HKII w regulacji tego procesu (Wolf i in. 2016).

## **II. RAK WĄTROBY – PRZYCZYNY, TERAPIA, METODY WYKORZYSTYWANE DO BADANIA METABOLIZMU**

### **2.1. Rak wątrobowokomórkowy**

Rak wątrobowokomórkowy (HCC) jest najczęstszym typem raka wątroby i stanowi on aż 75% wszystkich zachorowań na nowotwór wątroby (Petrick i in. 2020). Trzykrotnie częściej dotyka mężczyzn niż kobiety i częściej też występuje u osób starszych, chociaż wskaźniki u osób młodszych wykazują tendencję wzrostową (Wu i in. 2018). Każdego roku HCC jest odpowiedzialny za śmierć od 250 000 do 1 000 000 osób na całym świecie (Fitian i Cabrera 2017).

HCC w 80% przypadków rozwija się jako konsekwencja przewlekłej choroby wątroby, w tym przewlekłego zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu B (HBV), przewlekłego zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV), spożywania alkoholu i spożywania pokarmów skażonych aflatoksynami (Chu i in. 2018, Suresh i in. 2020). Do mniej powszechnych czynników ryzyka HCC należą stany prowadzące do marskości wątroby, takie jak hemochromatoza (HHC), niedobór alfa-1-antytrypsyny (A1AT), autoimmunologiczne zapalenie wątroby, porfiria i choroba Wilsona (El-Serag 2011, Hamed i Ali 2013). HCC najczęściej występuje w krajach rozwijających się, głównie ze względu na dużą częstość występowania wirusa HBV na tych obszarach. W ostatnim czasie obserwuje się wzrost zapadalności na HCC w krajach rozwiniętych, a także wzrost śmiertelności z powodu HCC (Samant i in. 2021, Yang i in. 2019).

## **2.2. Metody leczenia nowotworu wątrobowokomórkowego**

Postępowanie kliniczne w HCC jest dobierane w zależności od stadium choroby. Większość pacjentów z HCC jest diagnozowana w zaawansowanym stadium, a obecnie skuteczne metody leczenia tych chorych są ograniczone (Crissien i Frenette 2014). We wczesnym stadium choroby możliwe jest leczenie za pomocą resekcji, ablacji prądem o częstotliwości radiowej lub transplantacji (Doyle i in. 2019, Tohme i in. 2013). U pacjentów, którzy nie spełniają kryteriów przeszczepu wątroby, można zastosować miejscowe metody terapeutyczne pod kontrolą radiograficzną. Jednak u tych pacjentów często dochodzi do nawrotu choroby po resekcji/ablacji (Aquina i in. 2022, Thiesen 2021). W przypadku rozpoznania HCC w późniejszym stadium, jedynym skutecznym chemioterapeutycznym pierwszym wyboru jest sorafenib (Gauthier i Ho 2013). Sorafenib, który oddziałuje na szlak Ras/Raf/MAPK, przedłuża czas przeżycia całkowitego w zaawansowanym HCC, choć zaledwie o trzy miesiące (Desai i in. 2017, Wilhelm i in. 2006). Leczenie HCC komplikuje fakt, że jest to nowotwór stosunkowo chemiooporny, a występowanie zaawansowanej choroby wątroby ogranicza stosowanie chemioterapeutyków (Grazie i in. 2017). Wreszcie, heterogenność HCC powoduje zróżnicowaną reakcję na chemioterapeutyki, co prowadzi do trudności w uzyskaniu istotnego wskaźnika skutecznej odpowiedzi w każdym z prowadzonych badań. Te nieudane próby wskazują na potrzebę lepszego zrozumienia charakterystyki molekularnej HCC (Alqahtani i in. 2019, Huang i in. 2020).



Strategie mające na celu zwiększenie przeżywalności pacjentów obejmują terapie wykorzystujące wrażliwość metaboliczną komórek nowotworowych. Jednakże, w mikrośrodowisku guza, zmiany w szlakach metabolicznych wynikające z kombinacji zmian genetycznych, epigenetycznych i transkryptomycznych pojawiają się często, aby zaspokoić wysokie zapotrzebowanie energetyczne wzrostu guza (Iessi i in. 2021, Zucman-Rossi i in. 2015). W konsekwencji złożoność heterogeniczności zmienionego metabolizmu nowotworów prowadzi do rozwoju oporności przy leczeniu nowotworów. Dodatkowo, u różnych pacjentów występują również różne formy raka wątroby, które odpowiadają różnicom genetycznym. Biorąc pod uwagę złożoność genetyczną i metaboliczną HCC, identyfikacja podstawowych szlaków metabolicznych wykorzystywanych przez guzy do pobudzania metabolicznej plastyczności fenotypowej tego nowotworu w znacznym stopniu przyczyni się do rozwoju skutecznych terapii metabolicznych (Berndt i in. 2021).

### **2.3. HKII w komórkach raka wątrobowokomórkowego**

Podczas rozwoju nowotworu, komórki nowotworowe muszą dostosować swoje odpowiedzi biochemiczne do dynamicznych zmian dotyczących dostępności tlenu i składników odżywczych w komórce. W tym kontekście HKII umożliwia komórkom nowotworowym radzenie sobie w warunkach stresowych (Lehuede i in. 2016). W środowisku komórki nowotworowej, ekspresja lub nadekspresja HKII *de novo* jest związana ze złym rokowaniem, progresją choroby, przerzutami i/lub opornością na leczenie (Mathupalai in. 2010) heksokinaza IV (glukokinaza) (GCK) jest główną izoformą heksokinazy (HK) (Pedersen i in. 2002). W HCC ekspresja GCK jest hamowana, a ekspresja HKII jest indukowana, w związku z tym w komórkach HCC dominującą izoformą HK jest HKII (Perrin-Cocon i in. 2021). Fakt ten odróżnia komórki HCC od prawidłowych hepatocytów. Podczas rozwoju HCC, HKII zastępuje glukokinazę (HKIV) w hepatocytach, powodując niewrażliwość komórek raka wątrobowokomórkowego (HCC) na aktywność antynowotworową komórek NK (Kalathil i Thanavala 2021, Perrin-Cocon i in. 2021). Wysoki poziom HKII obserwowany w zmianach o charakterze przedrakowym może być uznany za biomarker predykcyjny rozwoju HCC. Biorąc pod uwagę liczne role jakie heksokinaza II odgrywa w komórkach nowotworowych o wysokim stopniu złośliwości, stanowi ona atrakcyjny cel interwencji terapeutycznej (Dreyfuss i in. 1989, Lee i in. 2018).

Wiedząc, o tym że dany guz wykazuje fenotyp wysoce glikolityczny i cechuje go podwyższony poziom HKII (na podstawie badań PET i biopsji) (Patra i in. 2013, Zhao i in. 2005) pojawia się pytanie: *jakie środki hamujące aktywność lub produkcję tego enzymu można wykorzystać, aby skutecznie zahamować namnażanie się i rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych, w których występuje nadekspresja HKII?* Wydaje się, że znalezienie takich substancji czy „leków” mogłoby stać się przełomem w terapii przeciwnowotorowej zastosowanej m.in. u chorych na raka wątroby.

#### **2.4. Metabolizm nowotworów jako cel terapeutyczny w leczeniu raka wątroby**

Dotychczas tylko kilka związków, które są ukierunkowane na jeden z elementów szlaków metabolicznych, zostało przetestowanych jako forma terapii przeciwnowotorowej (Stine i in. 2022). Rosnąca liczba dowodów przemawia jednak za tym, że niektóre zmiany w ekspresji enzymów metabolicznych wynikają z amplifikacji lub delecji genu, podczas gdy inne są konsekwencją szlaków sygnałowych wzrostu lub zmian epigenetycznych (Chen i in. 2022, Lu i Thompson 2012, Mullen i DeBerardinis 2012). Niezależnie od mechanizmu, zmiany w podstawowej aktywności enzymatycznej w obrębie danej reakcji stanowią potencjalne słabe punkty, które mogą być wykorzystane w terapii przeciwnowotorowej.

#### **2.5. Związki będące inhibitorami HKII**

Z powodu występującej nadekspresji HKII w komórkach nowotworowych, zahamowanie aktywności tego enzymu wydaje się być obiecującą strategią w walce z nowotworami. Jednakże selektywna inhibicja HKII i polarny charakter jej domeny katalitycznej pozostają dużym wyzwaniem dla badaczy, których celem jest znalezienie takich inhibitorów. W literaturze wskazano kilka związków, które mogą wpływać na aktywność HKII (Lin i in. 2016, Zheng i in. 2021).

Wszystkie oddziaływania polarne są dominujące, co sugeruje polarny charakter domeny katalitycznej HKII. Glukoza lokalizuje się w pobliżu katalitycznej helisy- $\alpha 5$ , która odpowiada za konwersję glukozy do G6P. Inhibitory mogą zostać zaprojektowane w taki sposób, by uniemożliwić przyłączenie glukozy do centrum aktywnego heksokinazy, konkurując w ten sposób z glukożą o domenę katalityczną HKII (Garcia i in. 2018). Pierwszym inhibitorem wykorzystującym tę właściwość była 2-deoksy-D-glukoza (2DG), opracowana po raz pierwszy w latach 50-tych XX wieku. Wykazano, że 10 mM 2DG może hamować aktywność HKII w komórkach linii HeLa (Neary i Pastorino 2010, Pelicano i in. 2006). Jednakże 2DG wykazywała silne działania niepożądane, co spowodowało przerwanie badań nad tym związkiem (Raez i in. 2013). W ostatnich latach wirtualne badania przesiewowe zaoferowały możliwość identyfikacji nowych inhibitorów HKII z nowymi farmakoforami/składnikami (Liu i Liu 2022). Na przykład benzerazyd (Ben) i benitrobenzerazyd (BNBZ) zostały wyłonione na drodze wirtualnego screeningu (VS) jako związki, które teoretycznie mogłyby konkurować z glukożą o miejsce wiążące ją z HKII (Wenzhuo Li i in. 2017, Zheng i in. 2021). Jednakże badania VS składają się głównie z trafień fałszywie pozytywnych. Na podstawie badań ADME z wykorzystaniem narzędzia internetowego SwissADME predictor (Daina i in. 2017), służącego do oceny farmakokinetyki i lekowrażliwości małych cząsteczek, zidentyfikowano niepożądane cechy pochodnych benitrobenzerazydu:

- cząsteczkę hydroksyfenylohydrazonu - chelator i agregator makrocząsteczek,
- cząsteczki katecholu i pirogallolu - tworzące wysoce reaktywne ugrupowania chinonowe,
- grupę nitrobenzylową - potencjalnie mutagenną i wysoce cytotoksyczną (Juszczak i in. 2022).

Niemniej jednak istnieją badania pokazujące, że benzerazyd może nie być wcale inhibitorem HKII, ale inhibitorem PKM2 (kinaza pirogronianowa izoforma 2), również ważnego enzymu odpowiedzialnego za generowanie pirogronianu i ATP podczas glikolizy (Zhou i in. 2020).

Naturalnym inhibitorem HKII jest glukoza-6-fosforan (G6P). Na podstawie powstających oddziaływań między G6P a HKII wynika, że G6P może konkurować z glukozą o miejsce wiązania i może zniekształcać strukturę HKII, aby hamować działanie enzymu. Dopatrując się takiego mechanizmu inhibicji, konstruuje się związki będące mimetykami G6P (Shan i in. 2022). Związkiem, który może być mimetykiem G6P jest metformina - doustny lek przeciwcukrzycowy. Związek ten wykazuje działanie hamujące aktywność HKII, ale w stężeniach milimolowych, czyli nieco za wysokich, by można było je stosować w terapii (Marini i in. 2013).

Wykazano, że HKII łączy się z białkiem VDAC za pomocą hydrofobowej N-końcowej domeny. Połączenie to stanowi atrakcyjny cel do konstruowania związków wpływających na to wiązanie. Do tej pory wszystkie inhibitory ukierunkowane na wiązanie HKII-VDAC zostały odkryte poprzez badania przesiewowe związków. Poza właściwościami mimetycznymi G6P, metformina może działać poprzez oddziaływanie na kompleks HKII-VDAC w stężeniach milimolowych (Marini i in. 2013, Salani i in. 2013, 2014). Ponadto doniesiono, że 3-bromopirogronian (3BP) może wpływać na interakcję HKII z VDAC (Chen i in. 2009). Jednakże 3BP wykazuje silne właściwości alkilujące i wysoką reaktywność w stosunku do różnych innych białek (m.in. dehydrogenaz), oraz może wpływać na zredukowany glutation zaburzając wewnątrzkomórkową homeostazę redoks (Birsoy i in. 2013, Porporato i in. 2011). Chociaż zaburzenie wiązania pomiędzy HKII a kanałem VDAC mogłoby ułatwić apoptozę komórek nowotworowych, może to wiązać się z ryzykiem wystąpienia zaburzeń charakterystycznych dla układu sercowo-naczyniowego (i/lub prawdopodobnie innych narządów), ponieważ wiązanie HKII-VDAC wydaje się być kluczowe dla prawidłowego funkcjonowania kardiomiocytów (Fraser i in. 1988, Smeele i in. 2011).

## **2.6. Badania nad metabolizmem nowotworów**

Jedną z cech charakterystycznych nowotworu jest zmieniony metabolizm komórkowy, dlatego coraz większa liczba badań naukowych skupia swoją uwagę na zagadnieniach związanych z metabolizmem w celu (a) lepszego zrozumienia jego działania w komórkach nowotworowych oraz (b) znalezienia sposobów leczenia raka i poprawy odpowiedzi na terapię. Istnieje wiele narzędzi i technik wykorzystywanych do analizy różnych szlaków metabolicznych, takich jak glikoliza, szlak pentozowofosforanowy, metabolizm kwasów tłuszczowych i glutaminoliza. Jednakże wiele z tych narzędzi wykorzystuje hodowle komórkowe, które w ograniczonym stopniu odtwarzają heterogeniczność obserwowaną *in vivo*

(Teslaa i Teitell 2014). Niemniej jednak istnieje ogromna potrzeba stworzenia nowych narzędzi i metod badawczych do pomiaru metabolizmu, które będą mogły wypełnić lukę w badaniach nad metabolizmem.

### **2.6.1. Metody wykorzystywane w badaniach nad metabolizmem komórkowym – ich wady/zalety oraz ograniczenia i obecne możliwości**

Jak już wspomniano, metabolizm nowotworów od dawna utożsamiany jest z glikolizą tlenową. Chociaż kiedyś uważano, że jest to spowodowane defektami w mitochondriach, obecnie uznaje się, że wiele nowotworów preferencyjnie wykorzystuje glikolizę tlenową, niezależnie od stanu mitochondriów (Seyfried 2015, Warburg 1956). W każdym razie, analiza metabolizmu mitochondrialnego cieszy się dużym zainteresowaniem w badaniach nad nowotworami. Często badania oparte na płytkach 96-, 24-, 12- dołkowych lub obrazowaniu (mikroskopia świetlna i mikroskopia elektronowa) mogą być wykorzystane do scharakteryzowania stanu lub zachowania mitochondriów. Analiza funkcji mitochondriów może obejmować ocenę polaryzacji błony mitochondrialnej, produkcję reaktywnych form tlenu (RFT) przez mitochondrialny łańcuch oddechowy, potencjał błony mitochondrialnej, specyficzną aktywność enzymów w kompleksach łańcucha transportu elektronów oraz ogólną biogenezę, masę i żywotność mitochondriów, a także ich wydajność bioenergetyczną (Brand i Nicholls 2011, Teslaa i Teitell 2014).

Wiele z badań nad metabolizmem jest opartych na tzw. kitach. Wymagają one wzrostu komórek w naczyniach np. płytkach 96-dołkowych lub szalkach, po czym medium jest zbierane, a komórki są lizowane w celu zebrania ich zawartości lub inkubowane z odczynnikami, które mają być pobrane i zmierzone. Kity te są najczęściej oparte na pomiarach fluorescencji lub luminescencji. Testy te mogą być stosowane do wykrywania metabolitów takich jak glukoza, mleczan i glutaminian lub ATP (np. CellTiter-Glo®, Glucose Uptake-Glo™ Assay - Promega, ATP Assay Kit - Sigma, PicoProbe™ Lactate Fluorometric Assay Kit - BioVision), czy też enzymów glikolitycznych wpływających na przepływ węgla przez cały szlak (heksokinaza, fosfofruktokinaza i kinaza pirogronianowa).

Konwersja  $\text{NAD}^+$  do  $\text{NADH}$  lub  $\text{NADP}^+$  do  $\text{NADPH}$  jest często wykorzystywana w testach enzymatycznych, ponieważ  $\text{NADH}$  i  $\text{NADPH}$  absorbują światło przy 340 nm, podczas gdy  $\text{NAD}^+$  i  $\text{NADP}^+$  nie absorbują promieniowania o tej długości fali. Poprzez sprzężenie interesującego nas enzymu z enzymem  $\text{NAD}^+/\text{NADH}^-$  lub  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}^-$ -zależnym,

aktywność enzymu może być mierzona poprzez zmianę absorbancji przy 340 nm w czasie. Heksokinaza, fosfofruktokinaza i PK mogą być sprzężone z enzymami zależnymi od  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  lub  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  poprzez zastosowanie enzymów reagujących z ich produktami (McComb i in. 1976, Teslaa i Teitell 2014).

Ze względu na koszty oraz dostępność urządzeń pomiarowych najczęściej wykorzystuje się testy enzymatyczne *in vitro* wymagające ekstrakcji z komórek enzymów w ich aktywnej formie. Jednak zadanie to nie jest tak proste, jak mogłoby się wydawać. Przykładowo, karboksylaza pirogronianowa jest wrażliwa na zimno, a inkubacja w niskiej temperaturze powoduje inaktywację enzymu (Scrutton i Utter 1965). Jednakże, większość enzymów jest bardziej stabilna w temperaturze 4°C niż w temperaturze pokojowej. To pokazuje, że każda procedura, jakkolwiek starannie opracowana, musi być ponownie przeanalizowana, gdy jest stosowana do nowego zestawu enzymów. Podobnie, z ekstraktami komórkowymi, które nie zostały uzupełnione inhibitorami proteaz (Van Eunen i in. 2010). Przy braku inhibitorów proteaz w buforze reakcyjnym należy zachować dużą ostrożność, aby zapobiec degradacji enzymów podczas ekstrakcji, wszystkie dalsze etapy należy wykonywać z zimnymi buforami, a próbki przechowywać na lodzie. Aby uniknąć zmian w składzie ekstraktu komórkowego z powodu wirowania lub degradacji kompleksów białkowych, czas trwania każdego etapu protokołu musi być ściśle kontrolowany. Ponadto, aby zapobiec spadkowi aktywności enzymów, zaleca się przeprowadzanie analiz na świeżo przygotowanych ekstraktach komórkowych (Adamczyk i in. 2011). Idealnym rozwiązaniem byłoby, gdyby bufor ekstrakcyjny składał się z odczynników, które nie zmieniają właściwości analizowanej próbki, takich jak jej stan redoks. Uzupełnienie buforu związkiem redukującym, takim jak ditiotreitól (DTT), może powodować skutki uboczne dla aktywności białka poprzez zakłócanie działania tioli cysteinowych w miejscach katalitycznych niektórych enzymów. Jednakże uzupełnienie buforu reakcyjnego o DTT jest konieczne w przypadku enzymów, które przeprowadzają reakcje redoks (Roche i Cate 1976).

Dwa kluczowe szlaki zaangażowane w produkcję ATP to glikoliza i OXPHOS, co można określić ilościowo poprzez pomiar wydzielania mleczanu i zużycia tlenu, powszechnie postrzeganych jako wskaźniki ich aktywności. Narzędzia do ilościowego określania akumulacji mleczanu w pożywce hodowlanej są dostępne na rynku, podobnie jak techniki zdolne do pomiaru wykorzystania tlenu przez żywe komórki (Fabri i in. 2021). W przeszłości elektroda Clarka była używana do pomiaru zużycia  $\text{O}_2$  w celu określenia aktywności mitochondriów.

Interesującą cechą komórek nowotworowych jest to, że wydają się one wytwarzać i tolerować wyższe poziomy stresu oksydacyjnego w porównaniu z komórkami prawidłowymi (Li i Graham 2012).

Od ponad 20 lat na rynku światowym mamy do dyspozycji aparaturę, która umożliwia bardzo precyzyjną ocenę bioenergetyki mitochondrialnej. Badacz jest w stanie ocenić efektywność funkcjonowania poszczególnych elementów łańcucha oddechowego, określić ilość wytworzonego ATP, ocenić integralność błon mitochondrialnych czy zaobserwować wyciek cytochromu c, czyli jest w stanie wypowiedzieć się o aktywności mitochondrialnej w badanych komórkach. Wydaje się zatem, że to właśnie dzięki tej nowoczesnej aparaturze udało się naukowcom dowieść, że w wielu komórkach nowotworowych mitochondria funkcjonują bardzo dobrze i co za tym idzie – są one producentem całkiem dużej ilości ATP.

Jednym z urządzeń przeznaczony do pomiarów mitochondrialnych jest oksygraf-2k (firmy Oroboros, Innsbruck, Austria) (Gnaiger i in. 1995). Składa się on z dwóch komór pomiarowych, do których wprowadzany jest materiał biologiczny wraz z substratami i inhibitorami łańcucha oddechowego (zgodnie z zastosowanym protokołem eksperymentalnym). Ogromną zaletą oksygrafu jest to, że badacz na bieżąco przez cały czas trwania pomiaru widzi w jakim stanie są mitochondria i może decydować o tym, co bada poprzez ciągłą ingerencję w wykonywany protokół eksperymentalny. Bez wątplenia dużą zaletą tego instrumentu jest to, że z jednej próby można uzyskać bardzo dużo informacji dotyczących zarówno bardziej ogólnego stanu fizjologicznego mitochondriów, jak i szczegółowych danych obrazujących aktualną kondycję bioenergetyczną komórek (Djafarzadeh i Jakob 2017). Niemniej jednak, metoda ta ma również swoje ograniczenia; chociażby takie, że jeden aparat jest w stanie zmierzyć tylko dwie próby równolegle; pojedynczy pomiar trwa od 45 min do 1h (w zależności od zastosowanego protokołu); badacz cały czas monitoruje przebieg doświadczenia i nie może w tym czasie zająć się czymś innym; przygotowanie aparatu do pracy oraz przemywanie komór pomiędzy pomiarami jest bardzo czasochłonne; ponadto, wszelkie drobne naprawy sprzętu, kalibracja komór pomiarowych, dbanie o stan elektrod tlenowych należą również do obowiązków osoby pracującej na tym sprzęcie. W czasach, w których od badacza wymaga się uzyskania wielu wyników (w tym powtórzeń eksperymentów) w krótkim czasie, przy zachowaniu dużej elastyczności w dysponowaniu swoim czasem w laboratorium i poza nim – praca z wykorzystaniem oksygrafu może nieco zniechęcać.

Niemniej jednak mamy do dyspozycji jeszcze jeden aparat, którym również możemy ocenić bioenergetykę mitochondrialną – jest nim urządzenie nazywane się Seahorse XFp Analyzer (Agilent Technologies). Urządzenie to wyposażone jest w czujniki fluorescencji lub fosforescencji (Gerencser i in. 2009) zamiast czujników polarograficznych (Wu i in. 2007). Zaletami tego urządzenia w porównaniu z oksygrafem są:

- automatyzacja pomiaru (aparat sam podaje zaprogramowane wcześniej odczynniki, co zwalnia badacza z obowiązku ciągłego monitorowania tego co dzieje się z próbą badaną i zaoszczędza dużo czasu, który można przeznaczyć na inne działania),
- pomiar wielu prób jednocześnie,
- możliwość pomiaru zużycia tlenu na płytkach 96- lub 24-dołkowych do wysokoprzepustowych badań przesiewowych,
- możliwość pomiaru glikolizy,
- dość szybki pomiar (w porównaniu z oksygrafem).

Jednakże analizator Seahorse nie jest pozbawiony wad, a mianowicie:

- wysoki koszt urządzenia i materiałów eksploatacyjnych (płytki niezbędne do pomiarów nie nadają się do wielokrotnego użytku; producent sugeruje również zakup wszystkich odczynników do pracy z aparatem, których koszt jest nieco wyższy (w porównaniu z cenami innych dostawców),
- protokół eksperymentalny jest ograniczony do sekwencji czterech związków, co w praktyce oznacza, że ilość informacji jaką można zebrać z pojedynczego badania jest zdecydowanie mniejsza niż podczas pozyskiwania danych eksperymentalnych za pomocą oksygrafu (Djafarzadeh i Jakob 2017, Gu i in. 2021),
- pracując na różnych komórkach, w tym na próbach, które są poddawane działaniu różnych związków działających mniej lub bardziej pośrednio na mitochondria, okazuje się, że odpowiedź bioenergetyczna komórki różni się, a co za tym idzie – każda „próba pomiarowa” wymaga bardziej indywidualnego potraktowania i tym samym dodawania niektórych związków (substratów/inhibitorów) w odmiennych stężeniach; dotyczy to szczególnie ADP czy FCCP (rozsprzęgacza łańcucha oddechowego), które to związki powinny być podane do próby poprzez miareczkowanie odczynnikiem; niestety Seahorse na to nie pozwala, podczas gdy praca na oksygrafie polega głównie na tym,



aby na bieżąco decydować o ilości/stężeniu dodawanych związków, w zależności od stanu energetycznego komórki.

Idealnym rozwiązaniem jest posiadanie obu aparatów, ponieważ każdy z nich ma swoje zalety. W obecnych czasach, szczególnie w laboratoriach zajmujących się bioenergetyką mitochondrialną, na wyposażeniu laboratoriów znajdziemy obie możliwości badania metabolizmu komórkowego.

Niemniej jednak, warto tu podkreślić, że pomimo bycia fascynującym i intrygującym modelem, MITOCHONDRIA nie są łatwym obiektem badań. Zdobyte nowoczesnej technologii pozwoliły m.in. nieco obalić mit związany z tym jak wyglądają mitochondria w komórce. Dziś już wiemy, że w stanie fizjologicznym mitochondria tworzą SIEĆ MITOCHONDRIALNĄ, która jest bardzo dynamiczna i wpływa na bioenergetykę całej komórki. Tym samym badacz musi mieć świadomość tego, że nie bada pojedynczych mitochondriów tylko „ogromną i rozległą” strukturę, która „rządzi się własnymi prawami” i bardzo szybko zmienia swoje parametry dostosowując się do warunków panujących wewnątrz komórki. W praktyce oznacza to, że otrzymywane wyniki w poszczególnych powtórzeniach mogą różnić się od siebie na tyle znacznie, iż bardzo ciężko jest sformułować na ich podstawie wiarygodne wnioski, lub po prostu wypowiedzieć się z przekonaniem o stanie bioenergetycznym modelu komórkowego, na którym się pracuje.

### **2.6.2. Wady i zalety wirtualnych badań przesiewowych**

Wirtualny screening (VS) to technika obliczeniowa służąca do identyfikacji związków, które wykazują potencjalną aktywność biologiczną w stosunku do określonego celu terapeutycznego, takiego jak receptor lub enzym. Wirtualne badania przeprowadza się zazwyczaj zgodnie z ustalonym schematem postępowania, który obejmuje kolejne etapy wykorzystujące różne metody filtracji, mające na celu eliminację niepożądanych związków (Kumar i Zhang 2015). Związki, które przejdą wszystkie etapy testów stosowane w ramach wirtualnego screening'u klasyfikuje się jako związki o wysokim potencjale wykorzystania w badaniach lub nawet terapiach. Jednakże, w celu potwierdzenia ich aktywności biologicznej, wymagane są dalsze badania eksperymentalne w laboratorium, z wykorzystaniem materiału biologicznego i/lub modeli badawczych oraz całym szeregiem wielu związków i odczynników, których należy użyć (Gimeno i in. 2019, Irwin i Shoichet 2016).

W zależności od dostępnych informacji strukturalne cząsteczek można wyróżnić dwie główne grupy technik wirtualnego screeningu:

- metody oparte na analizie receptora/celu (ang. structure-based methods), w których nacisk kładzie się na komplementarność interesujących nas związków z miejscem wiązania białka docelowego,
- metody oparte na analizie ligandów (ang. ligand-based methods), które wykorzystują informacje o strukturalnych i fizykochemicznych właściwościach cząsteczek, które są badane zgodnie z zasadą podobieństwa molekularnego (Vázquez i in. 2020).

Dokowanie białko-ligand (metody oparte na analizie struktury receptora) jest powszechnie stosowaną techniką służącą do oceny możliwości wiązania się związku do białka. Metoda ta opiera się na wykorzystaniu skryzalizowanej struktury białka oraz biblioteki związków wirtualnego screeningu. Należy jednak zwrócić uwagę na liczne błędy i ograniczenia związane z tą metodą (Lionta i in. 2014). Z doświadczenia wielu badaczy wynika, że tą metodą można wyselekcjonować związki o wysokim potencjale, na przykład o potencjalnej zdolności do hamowania aktywności określonego enzymu. Jednakże trudniejszym zadaniem jest udowodnienie tych właściwości w badaniach biologicznych. Należy również pamiętać, że receptor/cel jest makrocząsteczką, co oznacza konieczność przetworzenia większej ilości informacji, co z kolei sprawia, że metody oparte na analizie receptorów są bardziej czasochłonne obliczeniowo niż metody oparte na analizie ligandów.

Mimo że algorytmy wyszukiwania mogą wskazywać i określać potencjalne pozycje związku względem struktury badanego białka, nie jest to równoznaczne z faktycznym wiązaniem związku z białkiem w sugerowany sposób. W konsekwencji, nawet jeśli związek jest ligandem dla danego białka, nie gwarantuje to, że wśród orientacji dokowania znaleziono rzeczywisty sposób, w jaki związek wiąże się z białkiem, ponieważ algorytm może nie uwzględnić wszystkich możliwych sposobów (Meng i in. 2012). Dlatego też dokowanie powinno być rozpatrywane jako pomoc lub odpowiedź na etapie formułowania hipotez (dotyczących sposobów w jaki związek może wiązać się z białkiem), a nie jako ostateczny dowód na to, że związek wiąże się w określony sposób z badaną domeną białka (Kolb i Irwin 2009).

W przypadku wirtualnego screening'u często pomija się elastyczność cząsteczki białka, czego przyczyną jest dodatkowy koszt obliczeniowy (Gazgalis i in. 2020). Zazwyczaj uwzględnia się jedynie elastyczność cząsteczki liganda. Jednak w przypadku białek posiadających elastyczne miejsce wiązania, które mogą przyjmować różnorodne ligandy, takie podejście może być nieodpowiednie. W takich przypadkach warto rozważyć uwzględnienie zmiany położenia przestrzennego niektórych reszt białka. Istnieje sposób „obejścia” tego ograniczenia, który pozwala uwzględnić elastyczność białka. Polega to na wykorzystaniu wszystkich dostępnych konformacji obserwowanych dla receptorów podczas dokowania białko-ligand (Scior i in. 2012).

Metody oparte na analizie struktury liganda w pracy naukowej polegają na poszukiwaniu związków aktywnych wobec konkretnego celu. Wykorzystują one zasadę podobieństwa właściwości, która sugeruje, że podobne związki mają zbliżone właściwości (Vázquez i in. 2020). Istnieje duże prawdopodobieństwo, że związki o wysokim stopniu podobieństwa do związku aktywnego działają lub zachowują się w podobny sposób. To sugeruje, że takie związki mogą wywoływać podobne skutki biologiczne lub terapeutyczne.

Niemniej jednak, pomimo tego, że związki mogą wykazywać podobną aktywność, nie zawsze tak jest, ponieważ niektóre modyfikacje związków mogą być niekorzystne dla interakcji ligand-cel i w związku z tym mogą powodować utratę aktywności wobec danego celu. Należy pamiętać, że podobieństwo strukturalne między związkami nie gwarantuje identycznego działania ze względu na wpływ innych czynników (np. interakcje w mikrośrodowisku komórki). Te czynniki mogą mieć istotny wpływ na ostateczny efekt biologiczny. Tym samym prowadzić to może do błędnych przewidywań. (Cereto-Massagué i in. 2015). Ponadto, pojęcie podobieństwa jest subiektywne, a różne metody wykorzystują różne miary podobieństwa do oceny stopnia podobieństwa między dwoma związkami.

Warto mieć na uwadze powyższe spostrzeżenia, bowiem wszelkie metody *in silico* stały się powszechnie wykorzystywane w badaniach biologicznych. W praktyce wygląda to często tak, iż biolog zainteresowany badaniem związków, których zadaniem ma być np. hamowanie aktywności białek lub ich deformacja strukturalna, rozpoczyna swoje poszukiwania od metod bioinformatycznych, które mają wyłonić i/lub wskazać związki, które później stają się podstawą dalszych badań (prac dyplomowych, projektów naukowych). Niestety, duża szybkość działania tych technik, a co za tym idzie duża oszczędność czasu oraz przepiękna graficzna wizualizacja „tego jak może być” sprawiają, iż badacz ogranicza swoje poszukiwania do

wyników podanych przez narzędzia wirtualne. I choć potrafią nas one przekonać do siebie, to jednak w praktyce okazuje się bardzo często, że na poziomie biologii molekularnej, w „prawdziwym środowisku komórkowym” nie udaje się potwierdzić założeń opartych na wynikach uzyskanych metodami *in silico*. Dlatego należy być świadomym możliwości oraz ograniczeń tych metod i otwartym na bardzo różne sposoby zdobywania wiedzy.

### **III. UZASADNIENIE PODJĘCIA TEMATU PRACY**

Obecnie leczenie chorób nowotworowych stanowi jedno z najpoważniejszych wyzwań dla lekarzy i naukowców zajmujących się tą tematyką. Pomimo znaczących postępów poczynionych w terapii nowotworów, przeciwdziałanie tej chorobie nadal pozostaje wyjątkowo trudnym zadaniem. Większość klasycznych chemioterapeutyków niszczy komórki nowotworowe poprzez bezpośrednie uszkodzenie ich materiału genetycznego, co wiąże się z ich niespecyficznym działaniem i stosunkowo wysoką toksycznością.

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania metabolizmem nowotworów, a szczególnie procesami i szlakami metabolicznymi, którym ulega glukoza w komórkach nowotworowych. Odmienny metabolizm glukozy, który ma miejsce w tych komórkach odróżnia je od komórek prawidłowych. Wnikliwsze przyjrzenie się przemianom metabolicznym zachodzącym w komórkach nowotworowych i ich wyjaśnienie przyczyniło się do odkrycia nowych metod i strategii terapeutycznych.

W projektowaniu terapii przeciwnowotworowych kluczową rolę odgrywa selektywność działania leków. Obecnie, jednymi z najbardziej obiecujących form leczenia są terapie skierowane na specyficzne dla danego nowotworu izoformy enzymów metabolicznych. Heksokinaza II (HKII) jest jednym z najważniejszych enzymów, którego poziom i ekspresja są podwyższone w wielu rodzajach nowotworów w porównaniu z komórkami prawidłowymi.

Na podstawie dotychczas wykonanych badań i otrzymanych wyników, uważa się, że kilka związków mogłoby działać jako inhibitory HKII. Do najczęściej wymienianych zalicza się: 2-deoksyglukozę (2DG), metforminę i 3-bromopirogronian (3BP). Niemniej jednak, niezadowalające efekty terapeutyczne, niekorzystne działania uboczne oraz nie do końca wyjaśniony mechanizm ich oddziaływania z komórką i jej składnikami - utrudnia wykorzystanie tych substancji w terapii przeciwnowotworowej. Dlatego identyfikacja

związków/leków posiadających zdolność do regulacji i hamowania specyficznych szlaków metabolicznych w komórce nowotworowej może zapoczątkować rozwój nowych strategii leczenia nowotworów. Dążenie do selektywności działania leków, minimalizacji działań niepożądanych oraz przeciwdziałania problemowi oporności na terapię stanowi istotny cel dalszych badań i rozwoju nowych terapii przeciwnowotworowych. Konieczne są zatem dalsze badania nad inhibitorami HKII, które charakteryzować się będą wysoką skutecznością i niską toksycznością ogólnoustrojową w grupie związków chemicznych, które do tej pory nie były brane pod uwagę przy konstruowaniu skutecznych schematów terapeutycznych w leczeniu nowotworów.

#### **a. Hipoteza badawcza oraz cel pracy**

**Hipoteza badawcza** zakłada, że nowe inhibitory heksokinazy II wykazują działanie przeciwnowotworowe na drodze hamowania aktywności HKII i/lub zwiększają indeks terapeutyczny znanych cytostatyków.

**Głównym celem badań** była ocena przeciwnowotworowej aktywności nowych inhibitorów heksokinazy II (HKII) wyselekcjonowanych technikami *in silico* oraz wybór najbardziej efektywnej pochodnej (spośród przebadanych) pod kątem wykorzystania jej jako inhibitora HKII.

Przeprowadzone badania miały na celu:

1. Ocenę wpływu wybranych związków na aktywność HKII.
2. Analizę aktywności przeciwnowotworowej badanych związków.
3. Wybór 3 najbardziej obiecujących potencjalnych inhibitorów HKII.
4. Zbadanie wpływu 3 wybranych inhibitorów na indeks terapeutyczny cytostatyków.

## **IV. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA**

### **4. Materiały**

#### **4.1. Materiały i odczynniki do hodowli**

- Butelki o powierzchni 25 cm<sup>2</sup> i 75 cm<sup>2</sup> (PAA, Pasching, Austria)
- Bydłęca surowica płodowa FBS (ang. Fetal Bovine Serum, South America Origin, Gibco, Waltham, MA, USA)
- EGF, naskórkowy czynnik wzrostu (ang. Epidermal growth factor, Avantor, Gliwice, Polska)
- Medium wzrostowe DMEM (ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium, Lonza, Verviers, Belgia)
- Medium wzrostowe MCDB-131 (PAN BIOTECH, Aidenbach, Niemcy)
- Mieszanina aminokwasów NEAA (ang. MEM Non-Essential Amino Acid, Lonza, Verbiers, Belgia)
- Mieszanina antybiotyków penicylina/streptomycyna – 10 000 jednostek/ml penicyliny, 10 000 µg/ml streptomycyny, (Lonza, Verbiers, Belgia)
- Płytki 12, 24 i 96 dołkowe (PAA, Pasching, Austria)
- Probówki o pojemności 15 ml i 50 ml (PAA, Pasching, Austria)
- Roztwór trypsyny – mieszanina 0,25% trypsyny i 1 mM EDTA, (Lonza, Verviers, Belgia)
- Szalki o średnicy 60 mm i 10 mm (PAA, Pasching, Austria)
- Zbuforowany roztwór soli fizjologicznej PBS (ang. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Biowest, MO, USA)

#### **4.2. Materiały i odczynniki chemiczne stosowane w analizach**

- ADP (ang. Adenosine-5'-diphosphate, Alfa Aesar, Ward Hill, Massachusetts, USA)
- ATP (ang. Adenosine 5'-triphosphate, Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA)
- Caspase-8 Colorimetric Assay Kit (R&D Systems, Minneapolis, USA)
- Caspase-9 Colorimetric Assay Kit (R&D Systems, Minneapolis, USA)
- DAF-FM (ang. diaminofluorescein-FM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (G6PD) (Invitrogen, Waltham, MA, USA)

- DMSO, dimetylsulfotlenek (ang. dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- DTT (Ditiotretitol, odczynnik Clelanda, Invitrogen, Waltham, MA, USA)
- EnzChek Caspase-3 Assay Kit #2, Z-DEVD-R110 substrate (Invitrogen, Waltham, MA, USA)
- Fluo-3, AM, Calcium Indicator (Invitrogen, Waltham, MA, USA)
- Glicyna (Avantor, Gliwice, Polska)
- H<sub>2</sub>DCF-DA (ang. 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- HBSS (ang. Hanks' Balanced Salt solution, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Human Hexokinase II (HKII) Inhibitor Screening Kit (BioVision, Milpitas, CA, USA)
- Jodek propidyny (ang. propidium iodide Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Marker białkowy VI (wstępnie wybarwionym), peqGOLD (Avantor, Gliwice, Polska)
- Membrany PVDF (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA)
- MitoTracker™ Red CMXRos MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen, Waltham, MA, USA)
- Mleko w proszku odtłuszczone (Mlekovita, Wysokie Mazowieckie, Polska)
- MTT, bromek 3-(4,5-dimetylotriazo-2-yl)-2,5-difenylotetrazolu, (ang. methylthiazolyldiphenyltetrazolium bromide, Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA)
- NaOH, HCl, NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, EDTA, EGTA, HEPES, FeCl<sub>3</sub>, etanol 96% (Avantor, Gliwice, Polska)
- Pierce™ Protease Inhibitor Tablets (Invitrogen, Waltham, MA, USA)
- Przeciwciało skierowane przeciwko HKII (nr kat. 2867, Cell Signaling Technology, LabJOT, Warsaw, Poland)
- Przeciwciało skierowane przeciwko β-aktyynie (nr kat. 4970, Cell Signaling Technology, LabJOT, Warsaw, Poland)
- Roztwór RNazy, 50 U/mg (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- SuperSignal™ West Atto Ultimate Sensitivity Substrate (Invitrogen, Waltham, MA, USA)
- SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Invitrogen, Waltham, MA, USA)
- Tris-HCl (Trizma hydrochloride, Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA)

- Triton® X-100 Triton X-100 (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA)
- Tween 20 (Avantor, Gliwice, Polska)
- Tween 80 (Avantor, Gliwice, Polska)

### 4.3. Aparatura

- czytnik mikropłytek PowerWave HT (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) – pomiary spektrofotometryczne: test cytotoksyczności MTT, aktywność heksokinazy II, pomiary zawartości białka metodą Lowry’ego
- czytnik mikropłytek Fluoroscen Ascent FL (Labsystems, Helsinki, Finlandia) – pomiary spektrofluorymetryczne: poziom RFT i RFA (sonda H<sub>2</sub>DCFDA, sonda DAF-FM), potencjał mitochondrialny (sonda MitoTracker Red CMXRos), poziom jonów wapnia (sonda Fluo-3AM), poziom aktywności kaspazy-3, -8 i -9, pomiary procesu autofagii (sonda monodansylokadaweryna)
- cytometr przepływowy BDUS LSR II (Beckton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) – analiza faz cyklu komórkowego
- aparat do elektroforezy i blottingu Mini Gel Tank and Blot Module Set (Invitrogen, Waltham, MA, USA)
- system obrazowania c300 (Azure Biosystems, Dublin, CA, USA)
- komora laminarna z pionowym przepływem powietrza (Polon, Poznań, Polska)
- wytrząsarka kołyskowa MR-1 (Biosan, Ryga, Łotwa)
- inkubator CO<sub>2</sub> ze sterylizacją termiczną HF90 (Heal Force, Chiny)
- wirówka z chłodzeniem Sigma 3k15 (SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Niemcy)

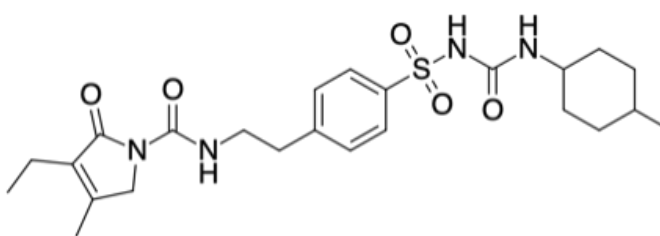
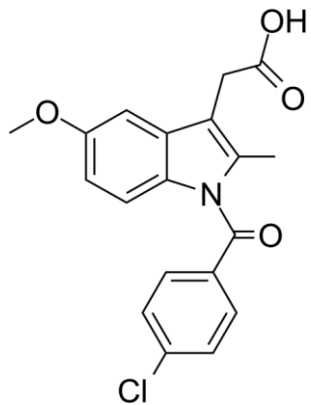
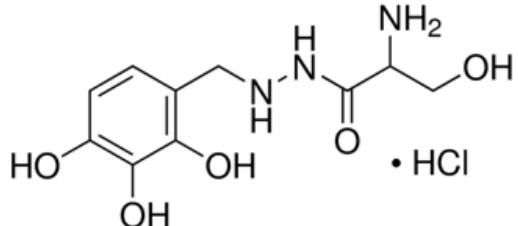
### 4.4. Związki chemiczne zastosowane w badaniach

Związki chemiczne (Tabela 1), które wykorzystano do badań w niniejszej dysertacji, zostały wyłonione w ramach współpracy pomiędzy zespołami badawczymi z Katedry Biofizyki Medycznej Uniwersytetu Łódzkiego, Katedry Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii Politechniki Śląskiej oraz grupą BIO-HPC z Katolickiego Uniwersytetu San Antonio UCAM (Murcja, Hiszpania). Badanie komputerowe, które polegało na wirtualnym screening’u bibliotek związków chemicznych w celu identyfikacji nowych, potencjalnych inhibitorów HKII, zostało przeprowadzone przez zespół BIO-HPC pod kierownictwem dr Horacio Perez-Sancheza. Analizę chemiczną wykonał mgr inż. Mateusz



Tomczyk z Katedry Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii Politechniki Śląskiej, której kierownikiem jest prof. dr hab. inż. Krzysztof Walczak, natomiast właściwości biologiczne zostały ocenione na Wydziale BiOŚ UŁ.

**Tabela 1.** Wykaz przebadanych w pracy związków wraz z ich budową strukturalną.

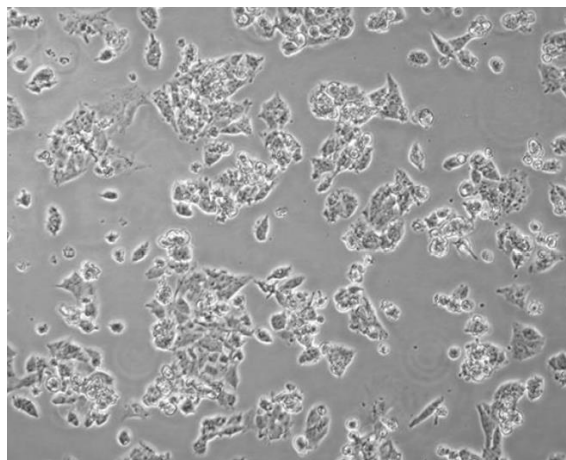
Nazwa	Struktura
Glimepiryd (Glim)	
Indometacyna (Indo)	
Benserazyd (Ben)	

#### 4.5. Materiał badawczy - linie komórkowe

W pracy wykorzystano linie komórkowe stabilizowane *in vitro*, dwie linie ludzkiego raka wątrobowokomórkowego - HepG2 (ATCC, Manassas, VA, USA) i Huh-7 (ECACC, Salisbury, UK) oraz jedna linia prawidłowych komórek śródbłonna mikronaczyniowego HMEC-1 (ATCC, Rockville, MD, USA).

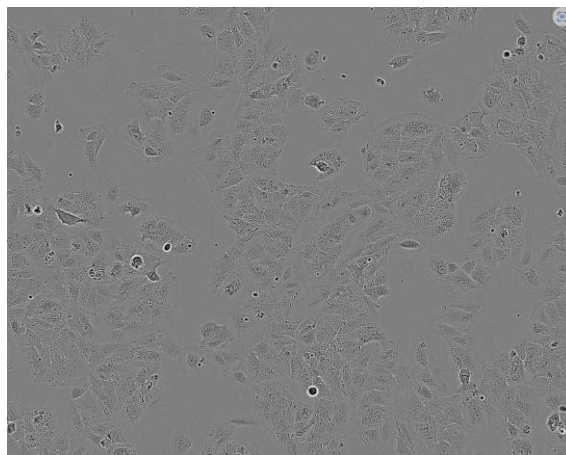
Komórki linii HepG2 (Ryc. 4.1.) zostały pierwotnie wyizolowane z raka wątrobowokomórkowego 15-letniego białego mężczyzny w 1975 roku. Komórki w hodowli rosną w monowarstwie oraz charakteryzują się zmienną liczbą chromosomów (średnio 55).

Komórki HepG2 powszechnie wykorzystywane są do badań *in vitro* nad metabolizmem i toksycznością związków.



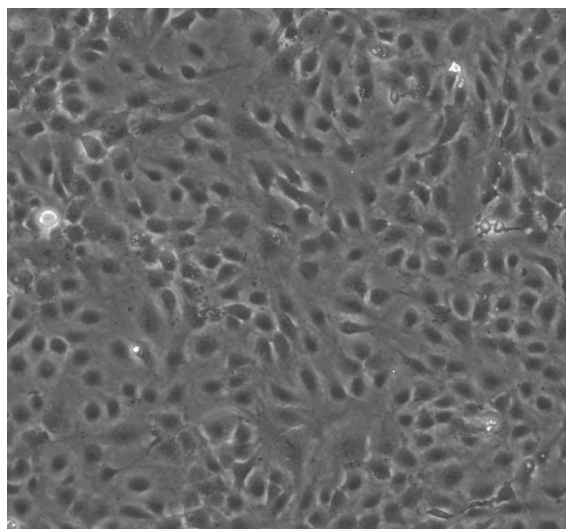
**Ryc. 4.1.** Morfologia komórek linii HepG2 raka wątroby (HepG2 <https://www.atcc.org/products/hb-8065> stan z dnia 9 sierpnia 2023)

Komórki linii Huh-7 (Ryc. 4.2.) są zróżnicowaną linią komórkową raka wątroby, która została pierwotnie pobrana z guza wątroby u 57-letniego japońskiego mężczyzny w 1982 roku. Komórki Huh-7 wydzielają wątrobowy czynnik wzrostu (ang. hepatoma-derived growth factor), który promuje wzrost komórek, dzięki czemu nie są one zależne od czynników wzrostowych znajdujących się w surowicy. Ta linia komórkowa wykazuje wiele funkcji wątrobowokomórkowych, w tym produkcję albuminy i  $\alpha$ 1-antytrypsyny. Ludzkie komórki raka wątroby Huh-7 są odpowiednim modelem do badań nad HCC i innymi chorobami wątroby.



**Ryc. 4.2.** Morfologia komórek linii Huh-7 raka wątroby (ECACC General Cell Collection: 01042712 Huh-7D12 [culturecollections.org.uk](http://culturecollections.org.uk) stan z dnia 9 sierpnia 2023).

Linia komórkowa ludzkiego śródbłonka mikronaczyniowego HMEC-1 (Ryc. 4.3.) to unieśmiertelniona linia komórkowa powstała w wyniku transfekcji ludzkich komórek śródbłonka mikronaczyniowego skóry (HMEC) wektorem pSVT. Komórki HMEC-1 są często używaną linią komórek śródbłonka mikronaczyniowego, ponieważ jest to łatwa linia w hodowli komórkowej, a jej wzrost jest trzy do siedmiu razy szybszy w porównaniu z innymi komórkami śródbłonka mikronaczyniowego.



**Ryc. 4.3.** Morfologia linii komórkowa ludzkiego śródbłonka mikronaczyniowego (HMEC-1 <https://cls.shop/HMEC-1/304064> stan z dnia 9 sierpnia 2023).

## 5. Etapy pracy

Praca doktorska została rozpoczęta w październiku 2019 roku w Katedrze Biofizyki Medycznej, Instytutu Biofizyki, Uniwersytetu Łódzkiego. W badaniach wykorzystano komórki nowotworowe wątroby linii Huh-7 i HepG2, które charakteryzują się wysokim poziomem ekspresji heksokinazy II (HKII). Przy użyciu wirtualnego screeningu (VS) baz danych leków oraz związków niebadanych i substancji powszechnie dostępnych, wyłoniono związki o potencjalnych właściwościach hamujących aktywność HKII. Badania te zostały przeprowadzone przez zespół z Katolickiego Uniwersytetu w Murcji (Hiszpania). Następnie wyselekcjonowane metodami *in silico* związki były syntetyzowane lub modyfikowane przez zespół z Politechniki Śląskiej.

Praca składała się z kilku etapów (Ryc. 5.1.); w pierwszej kolejności wykonano analizę dostępnej literatury oraz zdolności wybranych związków do hamowania aktywności enzymu HKII w warunkach *in solution* (w roztworze) oraz *in vitro*, gdzie enzym HKII izolowany był z linii komórkowej HepG2 i Huh-7. Na podstawie uzyskanych w ten sposób wyników wybrano trzy najbardziej obiecujące związki.

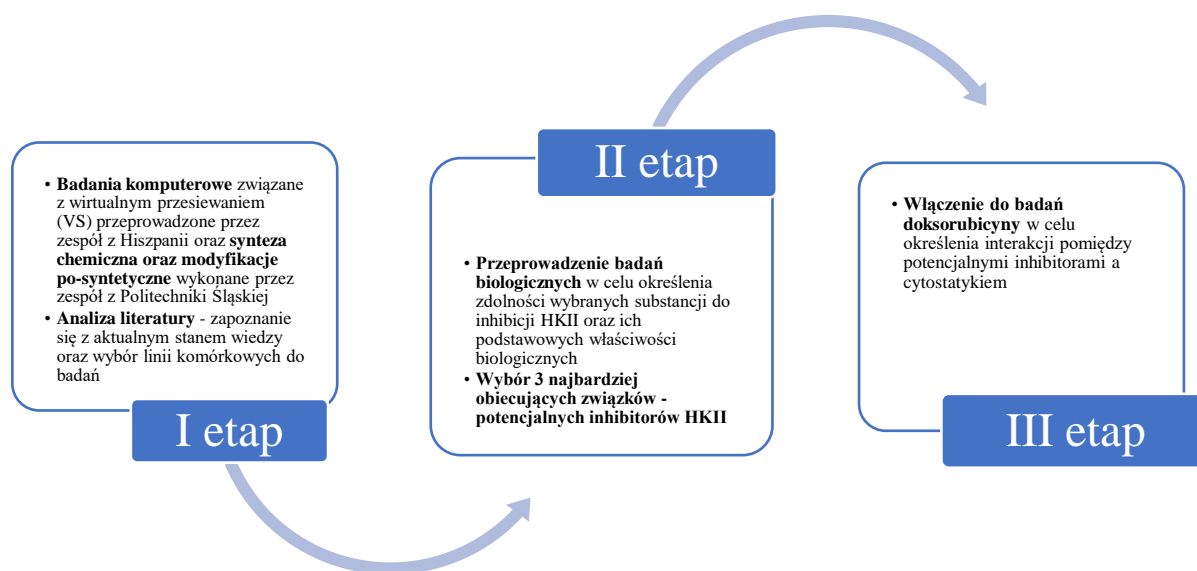
W celu potwierdzenia wysokiego poziomu heksokinazy II w liniach komórkowych raka wątroby HepG2 i Huh-7 wykonano analizę Western Blot. Następnie przeprowadzono ocenę cytotoksycznych właściwości badanych związków. Przeżywalność komórek określono za pomocą spektrofotometrycznej metody z MTT, która polega na redukcji nierozpuszczalnej w wodzie żółtej soli tetrazoliowej do fioletowego formazanu przez enzymy oksydoredukcyjne żywych komórek.

Po włączeniu doksorubicyny do badań dokonano analizy Chou-Talalaya, która pozwoliła na określenie rodzaju interakcji między doksorubicyną a badanymi związkami (glimepiryd, indometacyna, benserazyd). Stężenia zastosowane w tym eksperymencie zostały dobrane na podstawie wyników otrzymanych z testu MTT, a wyniki zostały obliczone za pomocą oprogramowania CompuSyn.

Kolejnym etapem było zbadanie wpływu wybranych związków na mitochondria. Z danych literaturowych wynika, że HKII jest zaangażowana w regulację potencjału błony oraz powstawanie stresu oksydacyjnego, dlatego badane związki oraz ich kombinacje z doksorubicyną poddano analizie pod kątem zmian w potencjale błony mitochondrialnej oraz poziomie reaktywnych form tlenu i azotu. Dodatkowo, przeprowadzono analizę poziomu

glutationu i całkowitego potencjału antyoksydacyjnego metodami fluorymetryczną i spektrofotometryczną, ze względu na fakt, że parametry te dostarczają informacji na temat ochrony komórki przed stresem oksydacyjnym.

W kolejnym etapie przeprowadzono analizę wpływu wybranych związków oraz ich kombinacji z doksorubicyną na indukowanie śmierci komórek. Heksokinaza II może zapobiegać indukcji programowanej śmierci komórek i prowadzić do aktywacji autofagii w odpowiedzi na niedobór glukozy, dlatego przeprowadzono analizę faz cyklu komórkowego, aktywności kaspaz -3 (egzekutorowej), -8 (inicjującej, uczestniczącej w zewnętrznej ścieżce apoptozy) i -9 (inicjującej, uczestniczącej w wewnętrznej ścieżce apoptozy) oraz analizę poziomu wapnia, który przyczynia się do rozprzestrzeniania procesu apoptozy. Ponadto określono intensywność procesu autofagii w komórkach.



Ryc. 5.1. Schemat przedstawiający etapy pracy doktorskiej

## 6. Metody

### 6.1. Hodowla komórkowa

Linie komórkowe Huh-7 i HepG2 hodowano w podłożu DMEM uzupełnionym 10% (v/v) płodową surowicą bydlęcą i 1% (v/v) mieszaniną penicylina/streptomycyna (10,000 U/mL penicyliny i 10 mg/mL streptomycyny) w 100% wilgotności względnej 5% CO<sub>2</sub> i 95% powietrza w temperaturze 37°C.

Linia komórkowa HMEC-1 była hodowana w kompletnym podłożu hodowlanym MCDB 131 uzupełnionym 10 mM L-glutaminą, 10 ng/mL naskórkowym czynnikiem wzrostu (EGF), 1 µg/mL hydrokortyzonem. Podłoże hodowlane zawierało 10% płodowej surowicy bydlęcej i 1% (v/v) mieszaniny penicyliny/streptomycyny (10 000 U/mL penicyliny i 10 mg/mL streptomycyny). Hodowlę komórek prowadzono w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> i 95% powietrza w temperaturze 37°C.

Hodowle komórkowe utrzymywano w fazie wzrostu wykładniczego poprzez regularne pasażowanie komórek trzy razy w tygodniu z wykorzystaniem 0,25% mieszaniny trypsyna/EDTA.

## **6.2. Określanie żywotności komórek za pomocą błękitu trypanu**

Do oceny żywotności komórek, po każdym pasażu, wykorzystywano 4% błękit trypanu. Barwnik używany jest do ilościowego określania żywych komórek poprzez wybarwienie wyłącznie martwych komórek. Ponieważ żywe komórki mają nienaruszoną błonę komórkową, błękit trypanu nie może przeniknąć przez ich błonę komórkową i dostać się do cytoplazmy. W obrazie mikroskopowym widoczne są martwe komórki wybarwione na niebiesko oraz opalizujące, bezbarwne komórki żywe.

Zawiesinę komórek mieszano z roztworem błękitu trypanu w stosunku 1:1. Następnie otrzymaną zawiesinę nanoszono na komorę hemocytometru Bürkera. Zliczano wszystkie komórki (martwe – koloru niebieskiego oraz żywe – bezbarwne komórki) i określano odsetek martwych komórek.

## **6.3. Inkubacja komórek z badanymi związkami**

W zależności od zastosowanej metody eksperymentalnej, komórki były wysiewane na bezbarwne lub czarne 96-dołkowe płytki, φ60 mm lub φ 100 mm szalki. Następnie komórki były inkubowane przez 24 godziny, aby osiągnąć logarytmiczną fazę wzrostu, po czym przeprowadzono 72-godzinną inkubację z badanymi związkami. W eksperymentach wykorzystano stężenia IC<sub>50</sub>, 0,5 IC<sub>50</sub> lub zgodnie z zaleceniem producenta zestawu do analizy aktywności HKII *in solution* (w roztworze) (5 µM).

#### **6.4. Liza komórek (aktywność HKII, Western Blot, FRAP, aktywność kaspazy-3,-8,-9)**

##### Przebieg oznaczenia

Komórki wysiewano na  $\phi$  100 mm szalki w gęstości  $\sim 3 \times 10^6$  komórek w objętości  $5 \text{ cm}^3$  podłoża hodowlanego. Po 24h inkubacji do hodowli dodawano roztwór badanych związków. Po zakończeniu inkubacji pożywkę usuwano z hodowli komórek, a monowarstwę komórek przemywano roztworem PBS. Do naczyń dodawano 500  $\mu\text{l}$  buforu frakcjonującego składającego się z 20 mM HEPES (pH 7,4), 10 mM KCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, koktajlu inhibitorów proteaz i 1 mM DTT. Następnie komórki zeskrobywano z powierzchni za pomocą szpatułki i inkubowano przez 15 min na lodzie. Zebrane komórki przenoszono do probówek i rozbijano, po czym pozostawiano na lodzie przez kolejne 20 min. Stężenie białka oznaczano metodą Lowry'ego.

#### **6.5. Oznaczenie zawartości białka (metoda Lowry'ego)**

##### Zasada metody

Oznaczanie zawartości białka metodą Lowry'ego jest jednym z najczęściej stosowanych oznaczeń kolorymetrycznych. Metoda ta jest kombinacją reakcji biuretovej oraz reakcji reszt tyrozyny i tryptofanu z odczynnikiem Folina-Ciocalteu. W wyniku redukcji odczynnika Folina-Ciocalteu w warunkach zasadowych powstaje produkt o intensywnym niebieskim zabarwieniu. Pomiar absorbancji wykonuje się przy  $\lambda = 750 \text{ nm}$ .

##### Przebieg oznaczenia

W celu określenia zawartości białka w lizatach komórkowych zastosowano metodę Lowry'ego. Do odpowiednich dołków dodawano odczynnik C, który składał się z 2% roztworu  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  w 0,1M roztworze NaOH, 1% roztworu  $\text{CuSO}_4$  oraz 2% roztworu winianu sodowo-potasowego, przy czym składniki odczynnika były dodawane w stosunku 1:1:100. Odczynnik C był przygotowywany 30 minut przed rozpoczęciem oznaczeń. Następnie do dołków dodawano lizat komórkowy, a po dokładnym wymieszaniu zawartości pozostawiano na 10 minut w temperaturze pokojowej. Po upływie tego czasu dodawano przygotowany wcześniej odczynnik Folina-Ciocalteu (rozcieńczony 1:1 wodą destylowaną). Po kolejnych 30 minutach mierzono absorbancję roztworów przy długości fali  $\lambda = 750 \text{ nm}$ .

## 6.6. Oznaczanie aktywności heksokinazy II

### 6.6.1. W warunkach *in solution* i *in vitro*

#### Zasada metody

W teście wykorzystanym do oceny aktywności HKII w roztworze oraz w komórkach, wykorzystano zdolność tego enzymu do przekształcania glukozy w glukozo-6-fosforan. W procesie tym glukozo-6-fosforan ulega utlenieniu przez dehydrogenazę glukozo-6-fosforanu, co prowadzi do powstania NADPH, a następnie pomiarze absorbancji przy długości fali  $\lambda=450$  nm (aktywność enzymu w roztworze) lub przy długości fali  $\lambda=340$  nm (aktywność enzymu w komórkach). Na podstawie uzyskanych wyników można określić aktywność HKII w badanych próbkach.

#### Przebieg oznaczenia

W ramach pomiaru aktywności heksokinazy II, przeprowadzono badania na bezbarwnych 96-dołkowych płytkach. Wykorzystano zestaw do oznaczania aktywności enzymu - Human Hexokinase II (HKII) Inhibitor Screening Kit (BioVision, Milpitas, CA, USA). Zgodnie z instrukcjami producenta, do odpowiednich dołków dodawano po 50  $\mu$ l badanego inhibitora, następnie po 5  $\mu$ l preparatu heksokinazy II, a do powstałej mieszaniny reakcyjnej dodawano 45  $\mu$ l mieszaniny reakcyjnej.

W celu oznaczenia aktywności enzymu w komórkach, do odpowiednich dołków dodawano 10  $\mu$ l lizatu komórkowego. Następnie dodawano mieszaninę reakcyjną, która składała się z 41,7 mM Tris-HCl (pH 8,5), 7,7 mM MgCl<sub>2</sub>, 4,2 mM glukozy, 10,6 mM monoglicerolu, 0,5 mM EDTA, 0,05% Triton X-100, 1 mM H<sub>2</sub>NaPO<sub>4</sub>, 45 mM KCl, 0,5 mg/mL NADP i 6,7 mM ATP, a następnie mieszano. Dodano również [1U/mL] dehydrogenazę glukozo-6-fosforanową.

Pomiary aktywności enzymu przeprowadzono przy długości fali 450 nm (aktywność enzymu w roztworze) lub 340 nm (aktywność enzymu *in vitro*) co 2,5 minuty przez 40 minut. Jako kontrolę pozytywną wykorzystano 3-bromopirogronian, natomiast kontrolę negatywną stanowił sam bufor reakcyjny nie zawierający heksokinazy II lub lizatu komórkowego.



## **6.7. Ocena właściwości cytotoksycznych**

### **6.7.1. Ocena cytotoksyczności inhibitorów heksokinazy II**

#### Zasada metody

Test MTT jest kolorymetrycznym badaniem służącym do pomiaru aktywności metabolicznej komórek. Opiera się on na zdolności komórkowych enzymów oksydoredukcyjnych zależnych od fosforanu dinukleotydu nikotynamido-adeninowego (NADPH) do redukcji żółtej soli tetrazolowej do postaci nierozpuszczalnego formazanu, który ma kolor fioletowy. Badanie to mierzy zatem przeżywalność komórek pod względem aktywności redukcyjnej jako enzymatycznej konwersji soli tetrazolowej do nierozpuszczalnych w wodzie kryształów formazanu przez dehydrogenazy występujące w mitochondriach żywych komórek (Sylvester 2011).

#### Przebieg oznaczenia

Aktywność cytotoksyczna badanych związków wobec nowotworowych linii komórkowych była badana przy użyciu testu kolorymetrycznego MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenyloctetrazoliowy). Komórki były wysiewane na 96-dołkowe płytki w gęstości około  $5 \times 10^3$  komórek/ dołek. Po 24 godzinach do odpowiednich dołków dodawano badane związki w odpowiednich stężeniach, a komórki inkubowano przez kolejne 72 godziny. Po inkubacji komórek ze związkami usuwano pożywkę zawierającą badane związki i dodawano roztwór MTT o końcowym stężeniu 0,5 mg/ml. Po 4 godzinach inkubacji roztwór MTT zastępowano DMSO w celu rozpuszczenia powstałych fioletowych kryształów formazanu w komórkach. Płytki delikatnie wstrząsano w temperaturze pokojowej do całkowitego rozpuszczenia formazanu i odczytywano absorbancję przy długości fali 580 nm oraz przy długości fali referencyjnej 720 nm za pomocą czytnika mikropłytek PowerWave HT (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). W celu określenia wartości  $IC_{50}$  wykreślono krzywe przeżywalności.

### **6.7.2. Ocena cytotoksyczności kombinacji inhibitorów heksokinazy II z doksorubicyną**

W celu zbadania interakcji działania badany związek-cytostatyk w badaniach dwulekowych zastosowano taką samą metodykę jak w badaniach jednolekowych, wykorzystując test kolorymetryczny MTT. Badane leki podawano do komórek w tym samym czasie. Do określenia rodzaju interakcji badanych związków w kombinacji zastosowano metodę Chou-Talalay'a z wykorzystaniem oprogramowania CompuSyn (CompuSyn Inc.,

Paramus, NJ, USA). Indeks kombinacji pomiędzy 0,9 a 1,1 uznano za addytywny, natomiast  $CI < 0,9$  oznaczał synergizm podczas gdy  $CI > 1,1$  wskazywał na antagonizm (Chou 2006).

## **6.8. Ocena stresu oksydacyjnego**

### **6.8.1. Ocena poziomu reaktywnych form tlenu (metoda z H<sub>2</sub>DCFDA)**

#### Zasada metody

Do pomiaru wewnątrzkomórkowego RFT użyto fluorescencyjnej sondy diocjan dichlorodihydrofluoresceiny (H<sub>2</sub>DCF-DA), chemicznie zredukowaną formę fluoresceiny stosowaną jako wskaźnik reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach. Sonda wewnątrz komórki ulega deacetylacji przez esterazy komórkowe i utlenieniu, niefluoryzująca H<sub>2</sub>DCF-DA jest przekształcana w silnie fluoryzującą 2',7'-dichlorofluoresceinę (DCF) (Yang i in. 2014).

#### Przebieg oznaczenia

Komórki wysiewano na czarne 96-dołkowe mikropłytki w gęstości  $5 \times 10^3$  komórek/dołek i inkubowano ze związkami w odpowiednich stężeniach. Po zakończeniu inkubacji komórek ze związkami usuwano medium i dodawano 50  $\mu$ l sondy w HBSS (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,8 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM HEPES i 1% glukozy) do końcowego stężenia 5  $\mu$ M i inkubowano w ciemności przez 30 min w 37°C. Fluorescencja DCF była mierzona przy fali wzbudzenia  $\lambda_{ex}=490$  nm i długości fali emisji  $\lambda_{em}=529$  nm przy użyciu czytnika mikropłetek Fluorocan Ascent FL (Labsystem, Finlandia).

### **6.8.2. Ocena poziomu reaktywnych form azotu (metoda z DAF-FM)**

#### Zasada metody

Zmiany poziomu wewnątrzkomórkowych RFA oceniano z wykorzystaniem sondy fluorescencyjnej DAF-FM. DAF-FM to znacznik, który służy do wykrywania i ilościowego oznaczania niskich stężeń tlenu azotu (NO). Sonda nie wykazuje fluorescencji dopóki nie wejdzie w reakcję z NO, kiedy tworzy fluoryzujący benzotriazol (Balcerczyk i in. 2005).

#### Przebieg oznaczenia

Komórki wysiewano na czarne 96-dołkowe mikropłytki w gęstości  $5 \times 10^3$  komórek/dołek i inkubowano ze związkami w odpowiednich stężeniach. Po zakończeniu inkubacji komórek ze związkami usuwano medium i dodawano sondę w HBSS (140 mM NaCl, 5 mM

KCl, 0,8 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM HEPES i 1% glukozy) do końcowego stężenia 5 μM i inkubowano w ciemności przez 30 min w 37°C. Fluorescencja DAF-FM była mierzona przy długości fali wzbudzenia λ<sub>ex</sub>=485 nm i długości fali emisji λ<sub>em</sub>=538 nm przy użyciu czytnika mikropłytek Fluoroscant Ascent FL (Labsystem, Finlandia).

### **6.8.3. Określenie całkowitego potencjału antyoksydacyjnego (metoda z TPTZ)**

#### Zasada metody

Ang. ferric-reducing/antioxidant power (FRAP) jest metodą kolorymetryczną, która została po raz pierwszy opisana przez Iris Benzie i J.J. Strain. Jony Fe<sup>2+</sup> w środowisku kwaśnym (pH 3,6) z TPTZ tworzą barwne kompleksy o maksimum absorbancji o długości fali 593 nm (Benzie i Strain 1996).

#### Przebieg oznaczenia

Komórki wysiewano na szalki φ60 mm w gęstości ~ 1x10<sup>6</sup> w 3 cm<sup>3</sup> medium hodowlanego i inkubowano z badanymi związkami przez 72 godziny. Następnie komórki lizowano. Do uzyskanego lizatu dodawano 300 mM buforu octanowego (pH=3.6), 10 mM TPTZ w 40 mM HCl i 20 mM FeCl<sub>3</sub>×6H<sub>2</sub>O. Próby były inkubowane z mieszaniną reakcyjną przez 20 minut w temperaturze pokojowej, a pomiary wykonywano przy długości fali λ=593 nm.

### **6.8.4. Oznaczenie zawartości glutationu (metoda z monochlorobimem)**

#### Zasada metody

Glutation (GSH) jest głównym wewnątrzkomórkowym tiolem o niskiej masie cząsteczkowej i odgrywa krytyczną rolę w obronie komórkowej przed czynnikami powodującymi stres oksydacyjny. Powszechnie wykorzystywaną techniką pomiaru GSH w komórkach jest reakcja z monochlorobimem, który łatwo wnika do komórek tworząc fluoryzujący addukt GSH-monochlorobimem, który może być mierzony fluorometrycznie. Reakcja ta jest katalizowana przez S-transferazę glutationową (Kamencic i in. 2000).

#### Przebieg oznaczenia

W komórkach wysianych na czarne 96-dołkowych mikropłytkach w gęstości 5×10<sup>3</sup> komórek/ dołek, oceniano poziom glutationu po 72-godzinnej inkubacji z badanymi związkami. Do każdego dołka dodawano 40 μM monochlorobimem i następnie inkubowano

w ciemności w 37°C przez 20 minut. Po tym czasie dokonywano pomiarów fluorescencji przy długości fali wzbudzenia  $\lambda_{ex}=380$  nm i długości fali emisji  $\lambda_{em}=470$  nm. Po pomiarze komórki były lizowane roztworem 10 mM TRIS-HCl/0,1% Triton X-100 (pH 8,0). W celu znormalizowania otrzymanych wyników, każdorazowo wykonywano pomiar zawartości DNA przy użyciu bromku etydyny w stężeniu 0,2 mM. Fluorescencja bromku etydyny była mierzona przy długości fali wzbudzenia  $\lambda_{ex}=390$  nm i długości fali emisji  $\lambda_{em}=460$  nm. Pomiary wykonywano przy użyciu czytnika mikroplątek Fluoroscans Ascent FL (Labsystem, Finlandia).

#### **6.8.5. Analiza zmian potencjału błonowego mitochondriów ( $\Delta\Psi_m$ ) (metoda z MitoTracker Red CMXRos)**

##### Zasada metody

Do oznaczania zmian potencjału błonowego mitochondriów w komórce wykorzystano sondę fluorescencyjną MitoTracker Red CMXRos. Sonda ta jest lipofilowym kationowym barwnikiem fluorescencyjnym, który wybarwia mitochondria w żywych komórkach. Akumulacja tego barwnika zależy od potencjału błonowego mitochondriów, jest on gromadzony wewnątrz mitochondriów ze względu na ich ujemny potencjał błony mitochondrialnej (MMP). Sonda zawiera tiolowo-reaktywną cząsteczkę chlorometylową. Fluorescencja chloro-metylo-X-rozaminy (CMXRos) w komórce jest zwiększona w przypadku wzrostu MMP. To umożliwia pomiar zmian w potencjale błonowym mitochondriów ( $\Delta\Psi_m$ ) w badanych komórkach (Kholmukhamedov i in. 2013).

##### Przebieg oznaczenia

Komórki wysiewano na czarne 96-dołkowe mikroplątki w gęstości  $5 \times 10^3$  komórek/ dołek i inkubowano ze związkami w odpowiednich stężeniach. Po 72 godzinach inkubacji komórki inkubowano z MitoTracker Red CMXRos w stężeniu 0,1  $\mu$ M przez 30 min. Następnie usuwano roztwór MitoTracker Red CMXRos z dołków i przemywano je PBS. Fluorescencję odczytywano przy fali wzbudzenia  $\lambda_{ex}= 579$  nm i długości fali emisji  $\lambda_{em}= 599$  nm przy użyciu czytnika mikroplątek Fluoroscans Ascent FL (Labsystem, Finlandia).

## **6.9. Określenie rodzaju śmierci komórki**

### **6.9.1. Ocena intensywności procesu autofagii (metoda z monodansylokadaweryną)**

#### Zasada metody

Monodansylokadaweryna (MDC) jest związkami fluoryzującym ze względu na resztę dansylołą sprężoną z kadaweryną, przy czym wykazano, że gromadzi się ona preferencyjnie w autofagosomach. Obecność MDC w autofagosomach jest konsekwencją wychwytywania jonów oraz interakcji z lipidami błonowymi (Biederbick i in.1995)

#### Przebieg oznaczenia

Komórki były wysiewane na jałowe, czarne 96-dołkowe mikroplątki w gęstości  $5 \times 10^3$  komórek/ dołek. Do komórek dodawano związki w odpowiednich stężeniach i inkubowano przez 72 godziny. Po zakończeniu inkubacji, usuwano medium i dodawano po 100  $\mu$ l roztworu monodansylokadaweryny w stężeniu 50  $\mu$ M, a następnie inkubowano w ciemności przez 15 minut w 37°C. Po zakończeniu inkubacji sonda była usuwana z dołków, a komórki były lizowane roztworem 10 mM TRIS-HCl/0,1% Triton X-100 (pH 8,0). Po zakończeniu lizy dokonywano pomiaru fluorescencji przy długości fal wzbudzenia  $\lambda_{ex}=390$  nm i długości fali emisji  $\lambda_{em}=460$  nm przy użyciu czytnika mikroplątek Fluoroscanner Ascent FL (Labsystem, Finlandia). W celu standaryzacji wyników, do każdego dołka dodano 50  $\mu$ l roztworu bromku etydyny o stężeniu 2 mM. Fluorescencja bromku etydyny była mierzona przy długości fal wzbudzenia  $\lambda_{ex}=530$  nm i długości fali emisji  $\lambda_{em}=590$  nm. Wyniki zostały wyliczone jako stosunek fluorescencji monodansylokadaweryny do fluorescencji bromku etydyny.

### **6.9.2. Określenie aktywności kaspazy-8 i -9**

#### Zasada metody

Apoptoza, czyli zaprogramowana śmierć komórki, odgrywa kluczową rolę we wzroście, różnicowaniu i homeostazie komórek. Aby zbadać aktywność kaspazy-8 i -9 w lizacie komórkowym, najpierw przeprowadzono lizę komórek inkubowanych wcześniej badanymi związkami. Następnie, w celu wykrycia aktywności tych proteaz, dodano do lizatu peptyd specyficzny dla kaspazy-8 i -9, który był związany z barwną cząsteczką reporterową - p-nitroaniliną (pNA). Proteolityczne rozszczepienie peptydu przez aktywne kaspazy-8 lub -9 uwalnia chromofor pNA, którego ilość można mierzyć spektrofotometrycznie przy długości fali  $\lambda=405$  nm. Poziom aktywności kaspazy w lizacie komórkowym można ocenić na podstawie

zmiany barwy mieszaniny reakcyjnej, która jest wprost proporcjonalna do poziomu aktywności enzymatycznej kaspaz (Gurtu i in. 1997, Thornberry i in. 1997) .

#### Przebieg oznaczenia

Komórki były wysiewano na jałowe szalki  $\phi$  60 mm w gęstości  $\sim 1 \times 10^6$  w objętości 3 cm<sup>3</sup>. Po 24-godzinnej hodowli, do komórek dodawano związki i inkubowano przez kolejne 72 godziny. Po zakończeniu inkubacji komórki poddawano lizie. Lizat komórkowy inkubowano na lodzie przez 10 minut, a następnie odwirowano przy 10 000 x g przez 5 minut w temp. 4°C. Otrzymany supernatant przenoszono do nowej probówki. Reakcję enzymatyczną aktywności kaspazy przeprowadzano na 96-dołkowej mikroplacie. Każda reakcja wymagała 50  $\mu$ L lizatu komórkowego, do którego dodawano bufor reakcyjny z DTT. Następnie do każdego dołka dodawano 5  $\mu$ L kolorymetrycznego substratu kaspazy-8 (IETD-pNA) lub kaspazy- 9 (LEHD-pNA). Płytkę inkubowano w 37 °C przez 1-2 godziny. Po inkubacji dokonywano odczytu przy długości fali 405 nm wykorzystując czytnik mikroplacy PowerWave HT (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA).

### **6.9.3. Określenie aktywności kaspazy-3**

#### Zasada metody

Podstawą oznaczenia aktywności kaspazy-3 jest rodamina 110 bis-(amid kwasu N-CBZ-L-asparaginowego) (Z-DEVD-R110). Substrat ten jest bisamidową pochodną rodaminy 110 (R110) zawierającą peptydy DEVD połączone kowalencyjnie z każdą z grup aminowych R110, tłumiąc w ten sposób absorpcję barwnika w świetle widzialnym i jego fluorescencję (Liu i in. 1999). Po rozszczepieniu enzymatycznym, niefluoryzujący bisamidowy substrat jest przekształcany w dwuetapowym procesie najpierw do fluoryzującego monoamidu, a następnie do jeszcze bardziej fluoryzującej R110. Pomiary przeprowadza przy długości fali wzbudzenia i emisji odpowiednio  $\lambda_{ex}=496$  nm i  $\lambda_{em}= 520$  nm.

#### Przebieg oznaczenia

Komórki były wysiewane na jałowe szalki  $\phi$  60 mm w gęstości  $\sim 1 \times 10^6$  w objętości 3 cm<sup>3</sup>. Po 24 godzinach hodowli, do komórek dodawano badane związki i przeprowadzano inkubację przez kolejne 72 godziny. Następnie, po zakończeniu inkubacji, komórki poddawano lizie. Otrzymany lizat komórkowy dodawano do 96-dołkowych czarnych płytek, następnie dodawano mieszaninę reakcyjną składającą się buforu reakcyjnego oraz substratu dla

kaspazy-3. Płytką była inkubowana w ciemności przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu inkubacji dokonywano pomiaru fluorescencji przy długości fal wzbudzenia  $\lambda_{ex}=496$  nm i długości fali emisji  $\lambda_{em}=520$  nm przy użyciu czytnika mikroplętek Fluoroscanner Ascent FL (Labsystem, Finlandia).

#### **6.9.4. Analiza faz cyklu komórkowego (metoda cytometryczna)**

##### Zasada metody

Analiza rozkładu faz cyklu komórkowego za pomocą cytometrii przepływowej opiera się głównie na pomiarze zawartości DNA poprzez jego barwienie jodkiem propidyny (PI). Stechiometryczny charakter reakcji PI – DNA, tzn. wiązanie się proporcjonalnie do ilości DNA obecnego w komórce, pozwala określić rozkład komórek w fazach cyklu G1, S i G2 lub w fazie śmierci sub-G1, która charakteryzuje się fragmentacją DNA (Shen i in. 2017).

##### Przebieg oznaczenia

Komórki wysiewano na szalki  $\phi$  60 mm w gęstości  $\sim 1 \times 10^6$  w objętości 3 cm<sup>3</sup>. Następnie do komórek dodawano związki w odpowiednich stężeniach i inkubowano przez 72 godziny. Po zakończeniu inkubacji komórki uwalniano za pomocą trypsyny i następnie wirowano (1000 obrotów/minutę przez 5 minut w temp. 4°C). Usuwano supernatant, a osad komórkowy zawieszono w 100  $\mu$ l PBS i utrwalano w zimnym 70% etanolu. Utrwalone komórki, w celu usunięcia etanolu, odwirowano przy 2000 obrotów/minutę przez 5 minut w temp. 4°C, przemywano PBS i ponownie wirowano w takich samych warunkach. Do uzyskanego osadu dodawano PBS zawierający 4mg/ml jodku propidyny i 20 $\mu$ g/ml RNAzy A. Pomiar wykonywano z wykorzystaniem cytometru przepływowego Becton Dickinson LSR II. Populację komórek w określonych fazach cyklu komórkowego określano ilościowo na podstawie standardowego zliczenia 10 000 komórek przy użyciu oprogramowania FlowJo v7.6 (Ashland, OR, USA).

#### **6.9.5. Oznaczenie poziomu jonów wapnia (fluorymetryczna metoda z fluo-3 AM)**

##### Zasada metody

Fluo-3 jest fluorescencyjnym indykatorem wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia (Ca<sup>2+</sup>), stosowany jest do pomiaru stężenia Ca<sup>2+</sup> wewnątrz żywych komórek. Ester Fluo-3 AM przenika do komórek bez zakłócania ich funkcjonowania. Dzięki właściwościom esteru acetoksymetylowego (AM), Fluo-3 AM jest błonowo przepuszczalny, co umożliwia jego

wnikanie do większości komórek poprzez inkubację z rozcieńczonymi wodnymi roztworami estru AM.

Po wprowadzeniu do komórek, sonda Fluo-3 AM nie wykazuje fluorescencji w obecności jonów wapnia ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Jednak wewnątrz komórki ulega ona hydrolizie przez niespecyficzne esterazy cytozolowe, przekształcając się w wolny kwas fluo-3. Wolny kwas fluo-3 początkowo nie wykazuje fluorescencji, ale jego fluorescencja wzrasta co najmniej 40-krotnie po związaniu się z jonami wapnia (Morris i in. 1994, Togayachi i in. 2010) (Morris i in. 1994, Togayachi i in. 2010).

#### Przebieg oznaczenia

Komórki wysiewano na czarne 96-dółkowe mikropłytki w gęstości  $5 \times 10^3$  komórek/ dółek i inkubowano ze związkami w odpowiednich stężeniach. Po 72 godzinach inkubacji usuwano medium i dodawano sondę Fluo-3 AM ( $4 \mu\text{M}/100 \mu\text{L}$  HBSS/dółek). Komórki inkubowano w ciemności przez 30 minut. Następnie usuwano roztwór sondy z płytki i zastępowano go roztworem HHBS. Fluorescencję odczytywano przy fali wzbudzenia  $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$  i długości fali emisji  $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$  przy użyciu czytnika mikropłytetek Fluorocan Ascent FL (Labsystem, Finlandia).

### **6.10. Immunodetekcja białka HKII (Western Blot)**

#### Zasada metody

Metoda Western Blot jest powszechnie stosowaną techniką w biologii molekularnej, która pozwala na identyfikację specyficznych białek w mieszaninie białek. Metoda ta opiera się na rozdzieleniu mieszaniny białek na podstawie masy cząsteczkowej poprzez elektroforezę żelową, a następnie przeniesieniu białek na membranę. Na membranie tworzy się pasmo dla każdego białka. Membrana jest inkubowana z znakowanym przeciwciałem pierwszorzędowym (przeciwciało specyficzne dla białka docelowego). Niezwiązane przeciwciało jest wypłukiwane, pozostawiając jedynie przeciwciało związane ze zidentyfikowanym białkiem, a następnie membrana jest poddawana działaniu przeciwciała drugorzędowego. Przeciwciało drugorzędowe wiąże się z specyficznym dla badanego białka przeciwciałem pierwszorzędowym, tworząc kompleks przeciwciał. Związane przeciwciała są następnie wizualizowane metodą chemiluminescencji (Mahmood i Yang 2012).

#### Przebieg oznaczenia



Próbki przygotowywano w objętości 20  $\mu$ L zawierającej 20-35  $\mu$ g białka, mieszano je z buforem obciążającym i inaktywowano termicznie w 95°C przez 5 min. Zawartość białka w próbce została oznaczona za pomocą metody Lowry'ego. Użyto żeli gradientowych 4-20% (Invitrogen) z markerem białkowym VI (wstępnie wybarwionym), peqGOLD (VWR). Próbki rozdzielano w żelach Novex™ WedgeWell™ 4-20%, Tris-Glicyna. Elektroforezę prowadzono w buforze Tris-Glycine SDS Running Buffer (25 mM Tris Base, 192 mM glicyna, 0,1% SDS, pH 8,3) w temperaturze pokojowej przez 40-50 min przy napięciu 225 V (Mini Gel Tank, Invitrogen, Carlsbad, CA). Po elektroforezie białka przenoszono z żeli poliakrylamidowych na membrany PVDF (Millipore) przy użyciu Mini Blot Module (Invitrogen). Membrany płukano trzykrotnie przez 5 minut buforem TBST (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20). Następnie membrany inkubowano przez 1h w buforze blokującym (5% odtłuszczone mleko w proszku w TBST), po czym płukano je trzykrotnie przez 5 minut w roztworze TBST. Membrany pocięto na paski odpowiadające każdemu białku i umieszczono w oddzielnych studzienkach. Do membran dodano królicze przeciwciało monoklonalne w rozcieńczeniu 1/1000 skierowane przeciwko HKII (nr kat. 2867, Cell Signaling Technology) i  $\beta$ -aktynie (nr kat. 4970, Cell Signaling Technology), a następnie prowadzono inkubację przez noc w 4°C. W kolejnym etapie wszystkie membrany płukano trzykrotnie w roztworze TBST przez 5 min. Następnie na membrany nakładano skoniugowane z peroksydazą chrzanową przeciwciało drugorzędowe anti-rabbit IgG (nr kat. 7074, Cell Signaling Technology), po czym inkubowano z substratem chemiluminescencyjnym (SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate lub SuperSignal™ West Atto Ultimate Sensitivity Substrate, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Immunoreaktywne pasma były wizualizowane przy użyciu systemu obrazowania c300 (Azure Biosystems, Dublin, CA, USA). Intensywność pasm była określana ilościowo przy użyciu oprogramowania ImageJ v1.5 (NIH, Bethesda, MD, USA). Względny poziom białka wyrażano jako stosunek densytometrycznej objętości badanego pasma do objętości odpowiadającego mu pasma  $\beta$ -aktyny.

### **6.11. Analiza statystyczna**

Statystyczną analizę danych w prezentowanej pracy doktorskiej wykonano przy użyciu dwóch programów statystycznych: GraphPad Prism ver. 5 oraz STATISTICA ver. 13.1.

Wyniki badań, uzyskanych w przynajmniej 3 niezależnych eksperymentach wykonanych w 3-5 powtórzeniach, przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej i odchylenia

standardowego (SD). Średnią arytmetyczną i odchylenie standardowe obliczano za pomocą programu Microsoft Excel (aplikacji Microsoft 365, Microsoft Corporation, USA). Normalność rozkładu wyznaczano przy pomocy testu Shapiro-Wilk'a, a homogenność wariancji sprawdzono testem Browna-Forsythe'a. W przypadku bardziej złożonych porównań wykorzystano testy jedno-, dwu- i wieloczynnikowej analizy wariancji ANOVA. Jeżeli na tym etapie analizy danych wystąpiły różnice istotne statystycznie pomiędzy badanymi zmiennymi wówczas dokonywano dalszej analizy w oparciu o test Tukey'a (tzw. test post-hoc). Istotność statystyczną pomiędzy próbami stwierdzano przy  $p < 0.05$ .

## 7. Wyniki

### 7.1. Wpływ badanych związków na aktywność heksokinazy II (HKII)

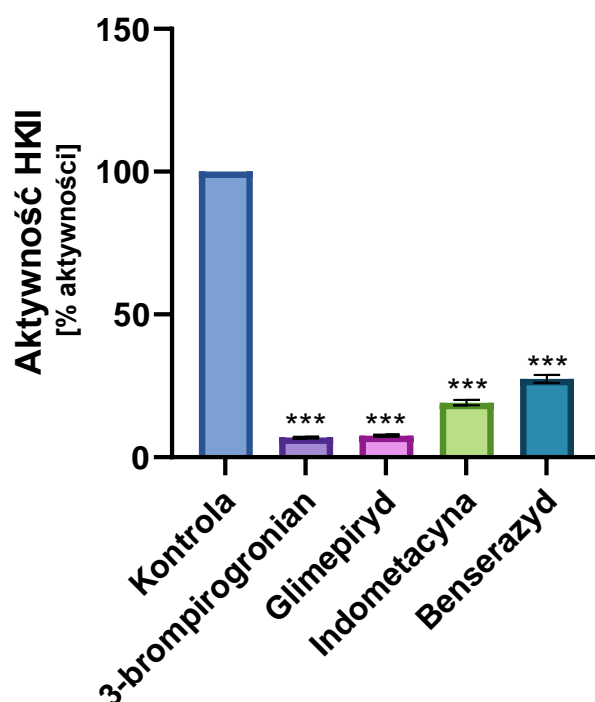
Aby określić aktywności heksokinazy II (HKII) wykorzystano 2 rodzaje testów: w warunkach *in solution* (w roztworze) oraz *in vitro* (w komórce). Obie metody opierają się na pomiarze przemiany glukozy do glukozo-6-fosforanu przez HKII. Następnie, produkt ten był utleniony przez dehydrogenazę glukozo-6-fosforanową (G6PD), co prowadziło do powstania produktu ubocznego - NADPH. W teście komercyjnym NADPH powodował konwersję sondy poprzez redukcję jej bezbarwnej formy do barwnego produktu. Kontrolę pozytywną stanowił 3-bromopirogronian (3BP) w stężeniu 5  $\mu\text{M}$  (w teście komercyjnym) lub 50  $\mu\text{M}$  (w teście na lizacie komórkowym).

W celu wyboru najbardziej obiecujących związków hamujących aktywność HKII, przeprowadzono analizę aktywności enzymu *in solution*. Przebadano grupę 16 związków (Tabela 2.), spośród których trzy - glimepiryd (7,6%), indometacyna (5,2%) oraz benserazyd (16,24%) - wybrano do dalszej analizy ze względu na ich zdolność do hamowania aktywności HKII w roztworze oraz kliniczne zastosowanie jako leki w innych schorzeniach, takich jak cukrzyca, przewlekłe stany bólowe układu mięśniowo-szkieletowego czy choroba Parkinsona (Ryc. 7.1.).

**Tabela 2.** Wyniki testu inhibicji heksokinazy II (HKII) w warunkach *in solution* (w roztworze).

Nazwa związku	Aktywność heksokinazy II [%kontroli negatywnej]
<u>Benserazyd</u>	<u>16,24±0,81</u>
<u>Glimepiryd</u>	<u>7,6±0,38</u>
<u>Indometacyna</u>	<u>5,2±0,26</u>
KJU-011	5,5±0,27
KJU-015	2,8±0,14
KJU-021	15,4±0,77
KJU-023	15,4±0,66
KJU-024	16,5±0,82
KSZ-008	13,2±0,82
KSZ-009	57,1±2,86
MWA-064	20,5±1,02

MWA-067	30,6±0,97
MWA-069	38,5±1,92
MWA-071	13,7±0,68
Sulfabenzamid	25,0±1,25
Zafirlukast	61,1±3,06

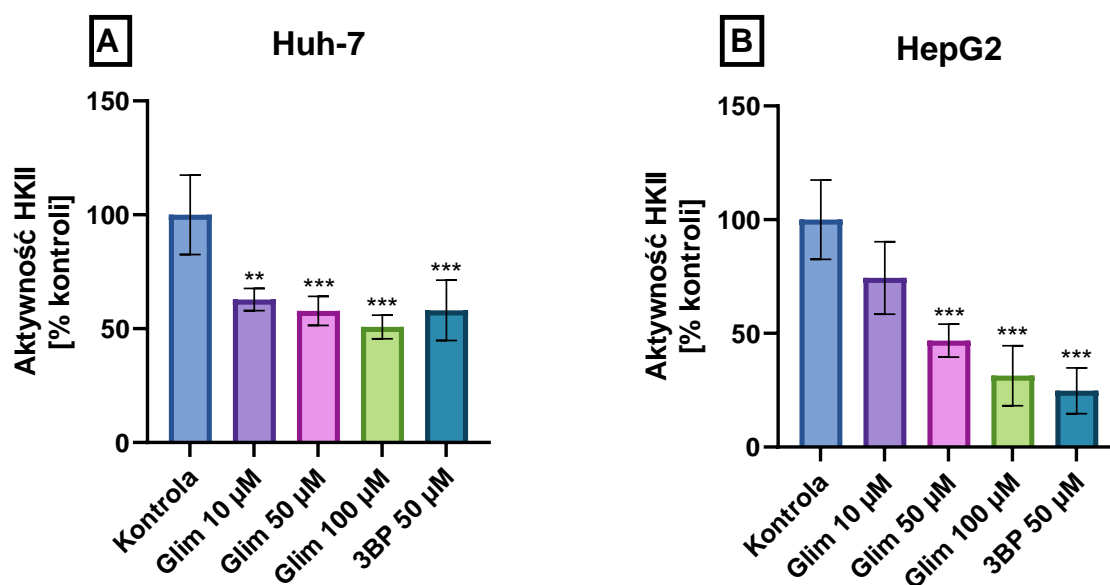


**Ryc. 7.1.** Aktywność HKII w roztworze zawierającym glimepiryd, indometacynę lub benserazyd w stężeniu 5  $\mu\text{M}$ . Wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  SD z trzech niezależnych eksperymentów (\*\*\*) $p < 0,001$  względem kontroli).

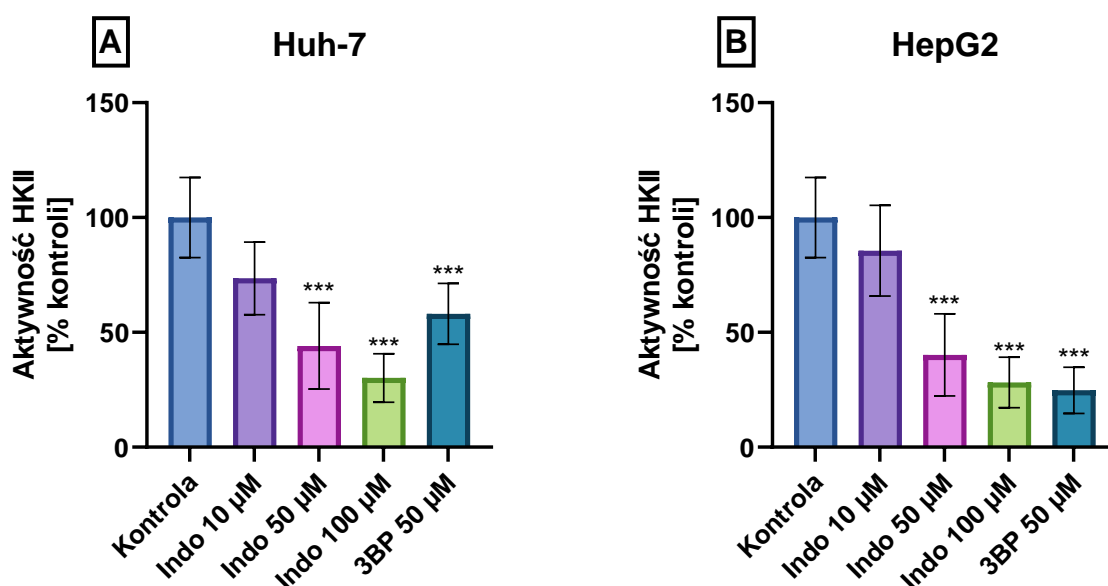
Aby określić działanie glimepirydu, indometacyny i benserazydu hamujące aktywność HKII w komórkach, wykorzystano dwie linie komórkowe raka wątroby: HepG2 i Huh-7. Badania na poziomie *in vitro* przeprowadzono w stężeniach 10, 50 i 100  $\mu\text{M}$ .

W badaniach *in vitro* zaobserwowano, że głównie glimepiryd i indometacyna hamują aktywność HKII. Wraz ze wzrostem stężenia (10, 50, 100  $\mu\text{M}$ ) obserwowany był silniejszy efekt hamujący związków (glimepiryd i indometacyna) w komórkach linii Huh-7 i HepG2 (Ryc. 7.2. i Ryc. 7.3.). Najsilniejsze działanie hamujące aktywność enzymu stwierdzono dla indometacyny w stężeniu 100  $\mu\text{M}$ , gdzie aktywności HKII spadła odpowiednio do 30,14%

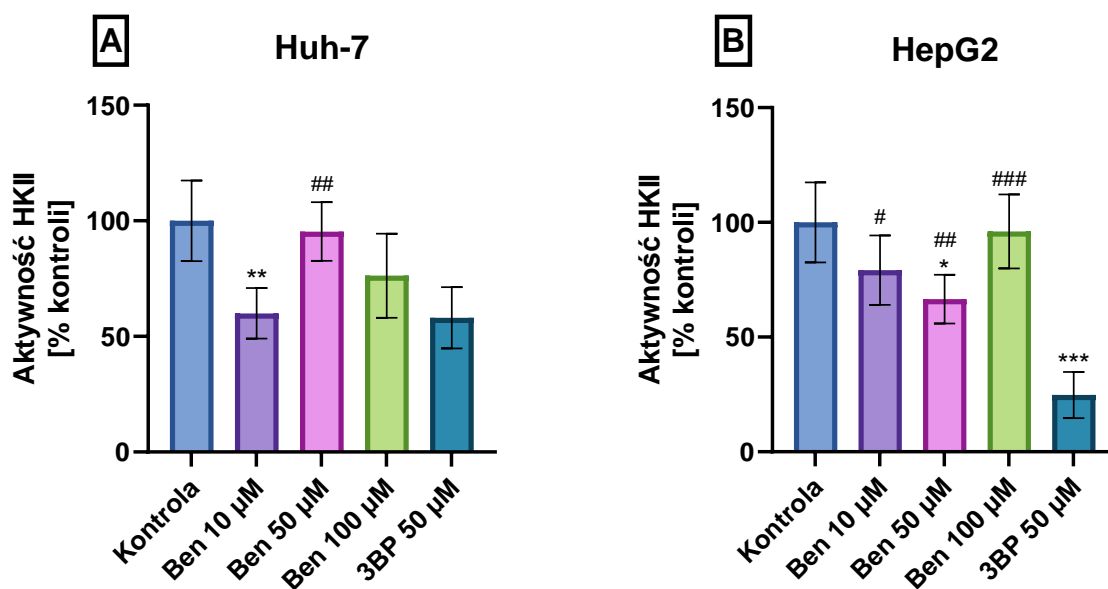
i 28,17% w komórkach linii Huh-7 i HepG2 (Ryc. 7.3.). Natomiast glimepiryd w stężeniu 100  $\mu\text{M}$  hamował HKII odpowiednio do 50,78% (Huh-7) i 31,39% (HepG2) (Ryc. 7.2.). Nie stwierdzono tendencji, w której wraz ze wzrostem stężenia benserazydu malała aktywność HKII w obu liniach komórkowych nowotworu wątroby (Huh-7 i HepG2) (Ryc. 7.2.).



**Ryc. 7.2.** Wpływ, glimepirydu (Glim) stosowanego w stężeniach 10-100  $\mu\text{M}$  i związku referencyjnego 3-bromopirogronian (3BP) w stężeniu 50  $\mu\text{M}$ , inkubowanych przez 72 godziny, na aktywność heksokinazy II w komórkach linii Huh-7 (A) i HepG2 (B). Wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  SD z pięciu niezależnych eksperymentów (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  względem kontroli).



**Ryc. 7.3.** Wpływ indometacyny (Indo) stosowanej w stężeniach 10-100 µM i związku referencyjnego 3BP w stężeniu 50 µM inkubowanych przez 72 godziny na aktywność heksokinazy II w komórkach linii Huh-7 (A) i HepG2 (B). Wyniki przedstawiono jako średnia ± SD z pięciu niezależnych eksperymentów (\*\*\*) $p < 0,001$  względem kontroli).



**Ryc. 7.4.** Wpływ benserazydu (Ben) stosowanego w stężeniach 10-100 µM i związku referencyjnego 3BP w stężeniu 50 µM inkubowanych przez 72 godziny na aktywność heksokinazy II w komórkach linii Huh-7 (A) i HepG2 (B). Wyniki

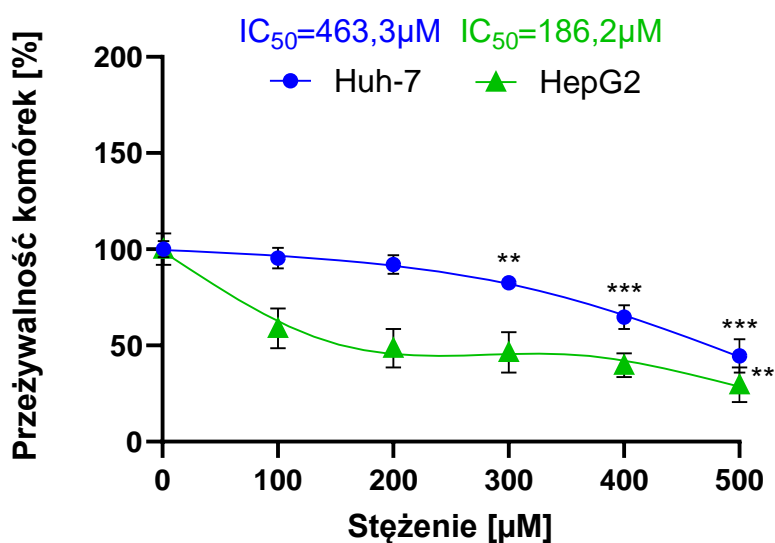
przedstawiono jako średnia  $\pm$  SD z pięciu niezależnych eksperymentów (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  względem kontroli, # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$  względem 3BP w stężeniu 50  $\mu\text{M}$ ).

## **7.2. Cytotoksyczność badanych związków**

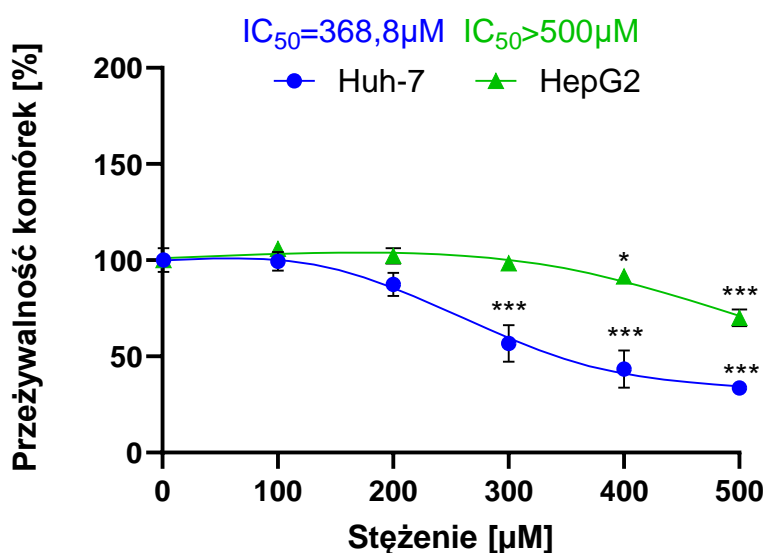
Celem głównym niniejszego badania było zbadanie cytotoksyczności trzech związków: glimepirydu, indometacyny i benserazydu na dwóch liniach komórkowych nowotworu wątroby (HepG2 i HuH-7). Dodatkowo, zbadano wpływ glimepirydu, indometacyny i benserazydu na cytotoksyczność doksorubicyny. Linie komórkowe inkubowano z badanymi związkami (glimepiryd, indometacyna i benserazyd) w zakresie stężeń 100-500  $\mu\text{M}$  lub 0,1-10  $\mu\text{M}$  (doksorubicyna) przez okres 72 godzin, a ich przeżywalność oceniano za pomocą testu MTT. Na podstawie uzyskanych krzywych przeżywalności wyznaczono wartości  $\text{IC}_{50}$ .

### **7.2.1. Cytotoksyczność glimepirydu, indometacyny i benserazydu**

Potencjalne inhibitory heksokinazy II wykazały zróżnicowaną odpowiedź cytotoksyczną wobec dwóch linii komórkowych raka wątroby. Glimepiryd wykazywał silniejsze działanie cytotoksyczne wobec komórek linii HepG2, co zostało potwierdzone 2,5-krotnym spadkiem aktywności metabolicznej linii komórkowej HepG2 w porównaniu do linii Huh-7, gdzie  $\text{IC}_{50}$  wynosiło odpowiednio 463,3  $\mu\text{M}$  i 186,2  $\mu\text{M}$  (Ryc. 7.5.). Z kolei indometacyna nie wykazywała właściwości cytotoksycznych w zakresie stężeń 100-500  $\mu\text{M}$  wobec komórek linii HepG2, ale zmniejszała przeżywalność o 50% w linii komórkowej Huh-7 w stężeniu 368,8  $\mu\text{M}$  (Ryc. 7.6.). Benserazyd natomiast zmniejszał przeżywalność o 50% w linii komórkowej HepG2 w stężeniu 423,9  $\mu\text{M}$ , jednakże w zakresie stężeń 100-500  $\mu\text{M}$  zaobserwowano maksymalny spadek proliferacji komórek linii Huh-7 do 60,48% (Ryc. 7.7.).

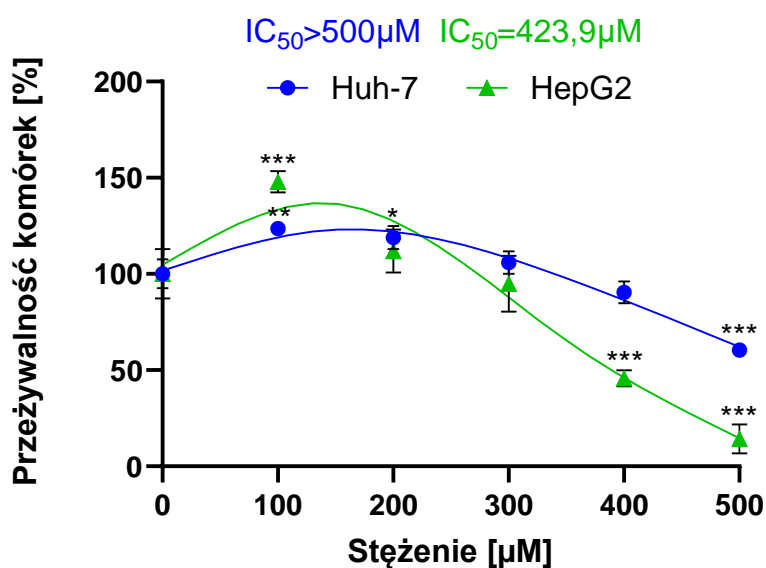


**Ryc. 7.5.** Krzywe przeżywalności komórek linii Huh-7 i HepG2 inkubowanych przez 72 godziny z glibepirydem. Wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  SD z trzech niezależnych eksperymentów (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  względem kontroli).



**Ryc. 7.6.** Krzywe przeżywalności komórek linii Huh-7 i HepG2 inkubowanych przez 72 godziny z indometacyną. Wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  SD z trzech niezależnych eksperymentów (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  względem kontroli).

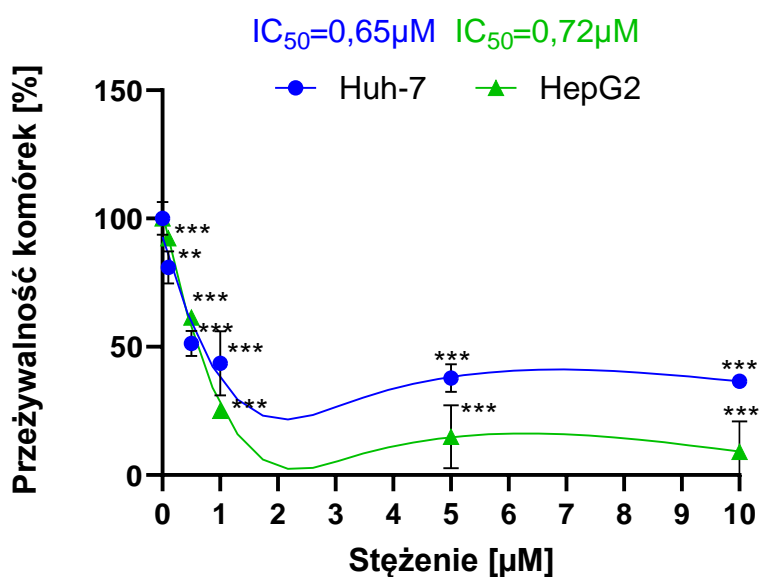




**Ryc. 7.7.** Krzywe przeżywalności komórek linii Huh-7 i HepG2 inkubowanych przez 72 godziny z benserazydem. Wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  SD z trzech niezależnych eksperymentów (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  względem kontroli).

### 7.2.2. Wpływ glicypirydu, indometacyny lub benserazydu na cytotoksyczność dokсорubicyny

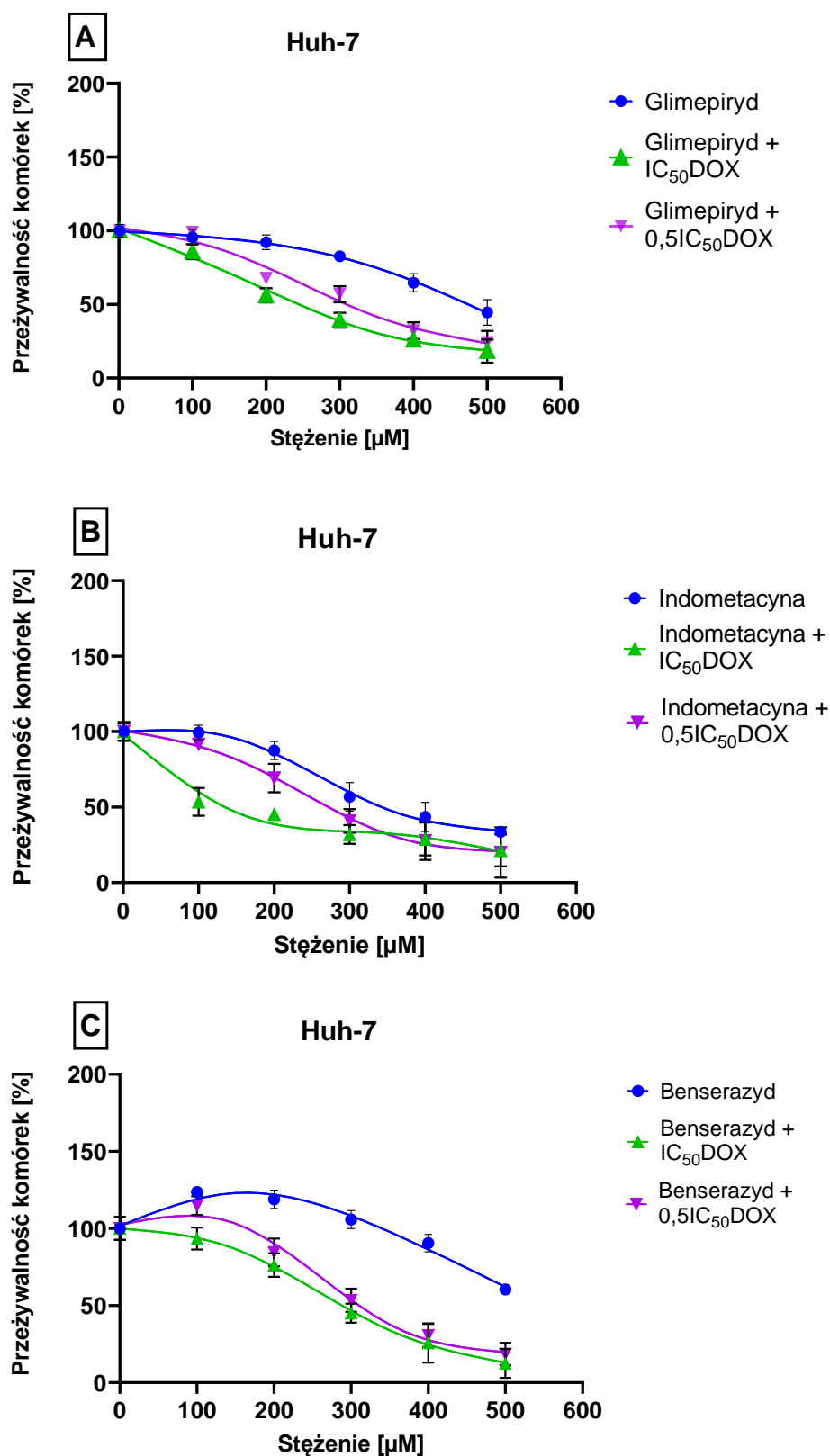
Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że linia komórkowa Huh-7 jest bardziej wrażliwa na działanie dokсорubicyny, niż linia komórkowa HepG2, co potwierdzają uzyskane wartości IC<sub>50</sub>. Wartości IC<sub>50</sub> wynosiły odpowiednio 0,65 µM dla linii komórkowej Huh-7 oraz 0,72 µM dla komórek linii HepG2. Wartości te lub ich wielokrotności zostały wykorzystane w kolejnych badaniach (Ryc. 7.8.).



**Ryc. 7.8.** Krzywe przeżywalności komórek linii Huh-7 i HepG2 inkubowanych przez 72 godziny z doksorubicyną. Wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  SD z trzech niezależnych eksperymentów (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  względem kontroli).

W badaniach na komórkach linii HepG2 i Huh-7 zbadano wpływ kombinacji glimepirydu, indometacyny lub benserazydu z doksorubicyną w stężeniu IC<sub>50</sub> lub 0,5IC<sub>50</sub>. Wyniki analiz wykazały, że połączenie glimepirydu w stężeniach 300, 400 i 500 µM z doksorubicyną w stężeniu IC<sub>50</sub> wykazuje synergistyczne działanie obu związków. W przypadku połączenia glimepirydu z doksorubicyną w stężeniu 0,5IC<sub>50</sub>, synergia była obserwowana tylko przy stężeniach 400 i 500 µM glimepirydu dla linii komórkowej Huh-7 (Ryc. 7.9.A. i Tabela 3.). Dla komórek linii HepG2, synergia była stwierdzona w każdym stosowanym stężeniu glimepirydu (100-500 µM) przy połączeniu z doksorubicyną w stężeniu IC<sub>50</sub>. W przypadku połączenia glimepirydu z doksorubicyną w stężeniu 0,5IC<sub>50</sub>, nie zaobserwowano synergii działania (Ryc. 7.10.A. i Tabela 4.).

Nie stwierdzono efektu synergistycznego po zastosowaniu indometacyny w zakresie stężeń 100-500 µM w połączeniu z doksorubicyną w stężeniu IC<sub>50</sub> lub 0,5IC<sub>50</sub>. Podobnie, w przypadku połączenia benserazydu z doksorubicyną, nie zaobserwowano synergistycznego działania tych związków w komórkach linii HepG2 (Tabela 3.). W linii komórkowej Huh-7 zaś, po zastosowaniu benserazydu w stężeniach 300, 400 i 500 µM w połączeniu z doksorubicyną w stężeniu IC<sub>50</sub> lub 0,5IC<sub>50</sub>, zaobserwowano efekt synergistyczny (Tabela 3.).



Ryc. 7.9. Wpływ doksorubiny (DOX) w stężeniu  $\text{IC}_{50}$  lub  $0,5\text{IC}_{50}$  na krzywe przeżywalności glimepirydu (A), indometacyny (B) lub benserazydu (C) w komórkach Huh-7.

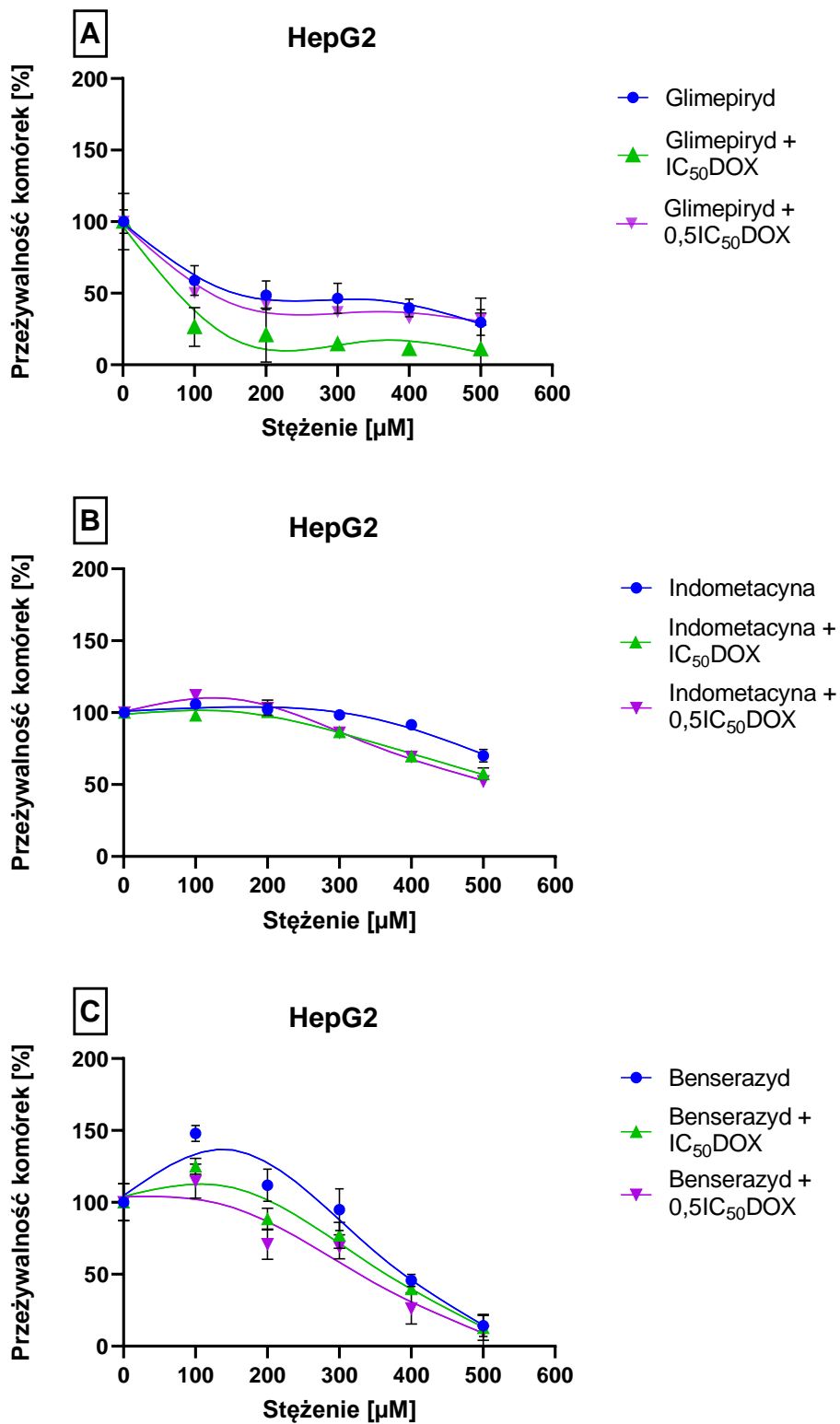
**Tabela 3.** Cytotoksyczność kombinacji glimepirydu, indometacyny lub benserazydu w połączeniu z doksorubicyną w stężeniach IC<sub>50</sub> (0,65μM) lub 0,5IC<sub>50</sub> (0,325μM) w komórkach Huh-7. Legenda: efekt: ↓ - antagonistyczny, ↑ - synergistyczny, = - addytywny. Poziom istotności statystycznej istotności statystycznej oznaczono \* (\*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001) lub skrótem "ns" dla różnic nieistotnych statystycznie.

**Huh7**

<b>Glimepiryd [μM]</b>	<b>Doksorubicyna</b>	<b>Poziom istotności statystycznej</b>	<b>Efekt</b>	<b>Doksorubicyna</b>	<b>Poziom istotności statystycznej</b>	<b>Efekt</b>
<b>100</b>	IC <sub>50</sub>	ns	↓	0,5IC <sub>50</sub>	***	↓
<b>200</b>	IC <sub>50</sub>	***	↓	0,5IC <sub>50</sub>	***	↓
<b>300</b>	IC <sub>50</sub>	***	↑	0,5IC <sub>50</sub>	***	↓
<b>400</b>	IC <sub>50</sub>	***	↑	0,5IC <sub>50</sub>	***	↑
<b>500</b>	IC <sub>50</sub>	***	↑	0,5IC <sub>50</sub>	***	↑
<b>Indometacyna</b>						
<b>Indometacyna [μM]</b>	<b>Doksorubicyna</b>	<b>Poziom istotności statystycznej</b>	<b>Efekt</b>	<b>Doksorubicyna</b>	<b>Poziom istotności statystycznej</b>	<b>Efekt</b>
<b>100</b>	IC <sub>50</sub>	ns	↓	0,5IC <sub>50</sub>	***	↓
<b>200</b>	IC <sub>50</sub>	***	=	0,5IC <sub>50</sub>	***	↓
<b>300</b>	IC <sub>50</sub>	***	↑	0,5IC <sub>50</sub>	***	↑
<b>400</b>	IC <sub>50</sub>	***	=	0,5IC <sub>50</sub>	***	↑

<b>500</b>	IC <sub>50</sub>	***	=	0,5IC <sub>50</sub>	***	=
------------	------------------	-----	---	---------------------	-----	---

<b>Benserazyd [μM]</b>	<b>Doksorubicyna</b>	<b>Poziom istotności statystycznej</b>	<b>Efekt</b>	<b>Doksorubicyna</b>	<b>Poziom istotności statystycznej</b>	<b>Efekt</b>
<b>100</b>	IC <sub>50</sub>	ns	↓	0,5IC <sub>50</sub>	ns	↓
<b>200</b>	IC <sub>50</sub>	***	↓	0,5IC <sub>50</sub>	ns	↓
<b>300</b>	IC <sub>50</sub>	***	↑	0,5IC <sub>50</sub>	***	↑
<b>400</b>	IC <sub>50</sub>	***	↑	0,5IC <sub>50</sub>	***	↑
<b>500</b>	IC <sub>50</sub>	***	↑	0,5IC <sub>50</sub>	***	↑



**Ryc. 7.10.** Wpływ doksorubiny (DOX) w stężeniu  $\text{IC}_{50}$  lub  $0,5\text{IC}_{50}$  na krzywe przeżywalności glimepirydu (A), indometacyny (B) lub benserazydu (C) w komórkach linii HepG2.

**Tabela 4.** Cytotoksyczność kombinacji glimepirydu, indometacyny lub benserazydu w połączeniu z doksorubicyną w stężeniach IC<sub>50</sub> (0,72 μM) lub 0,5IC<sub>50</sub> (0,36 μM) w komórkach linii HepG2. Legenda: efekt ↓ - antagonistyczny, ↑ - synergistyczny, = - addytywny. Poziom istotności statystycznej istotności statystycznej oznaczono \* (\*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001) lub skrótem "ns" dla różnic nieistotnych statystycznie.

### HepG2

Glimepiryd [μM]	Doksorubicyna	Poziom istotności statystycznej	Efekt	Doksorubicyna	Poziom istotności statystycznej	Efekt
100	IC <sub>50</sub>	***	↑	0,5IC <sub>50</sub>	***	=
200	IC <sub>50</sub>	***	↑	0,5IC <sub>50</sub>	***	=
300	IC <sub>50</sub>	***	↑	0,5IC <sub>50</sub>	***	=
400	IC <sub>50</sub>	***	↑	0,5IC <sub>50</sub>	***	=
500	IC <sub>50</sub>	***	↑	0,5IC <sub>50</sub>	***	=
Indometacyna [μM]	Doksorubicyna	Poziom istotności statystycznej	Efekt	Doksorubicyna	Poziom istotności statystycznej	Efekt
100	IC <sub>50</sub>	***	↓	0,5IC <sub>50</sub>	ns	↓
200	IC <sub>50</sub>	ns	↓	0,5IC <sub>50</sub>	***	↓
300	IC <sub>50</sub>	***	↓	0,5IC <sub>50</sub>	***	↓
400	IC <sub>50</sub>	***	↓	0,5IC <sub>50</sub>	***	↓

<b>500</b>	IC <sub>50</sub>	***	↓	0,5IC <sub>50</sub>	***	↓
------------	------------------	-----	---	---------------------	-----	---

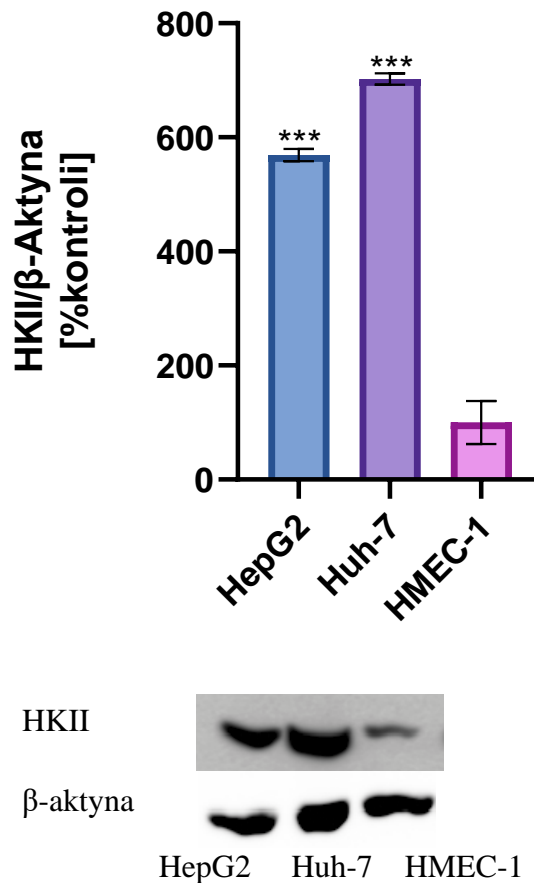
<b>Benserazyd [μM]</b>	<b>Doksorubicyna</b>	<b>Poziom istotności statystycznej</b>	<b>Efekt</b>	<b>Doksorubicyna</b>	<b>Poziom istotności statystycznej</b>	<b>Efekt</b>
<b>100</b>	IC <sub>50</sub>	*	↓	0,5IC <sub>50</sub>	ns	↓
<b>200</b>	IC <sub>50</sub>	ns	↓	0,5IC <sub>50</sub>	*	↓
<b>300</b>	IC <sub>50</sub>	*	↓	0,5IC <sub>50</sub>	*	↓
<b>400</b>	IC <sub>50</sub>	***	↓	0,5IC <sub>50</sub>	***	=
<b>500</b>	IC <sub>50</sub>	***	=	0,5IC <sub>50</sub>	***	=



### 7.3. Immunodetekcja HKII metodą Western blot

W niniejszym badaniu wykorzystano analizę Western Blot do oceny poziomu białka HKII w trzech liniach komórkowych: Huh-7, HepG2 i HMEC-1. Wyniki, przedstawione na rycinie 7.11., wykazały znacznie wyższy poziom HKII w nowotworowych liniach komórkowych HepG2 i Huh-7 w porównaniu z prawidłową linią komórkową HMEC-1.

Doświadczenie wykazało 5,69-krotnie wyższy poziom HKII w komórkach linii HepG2 niż w komórkach linii HMEC-1, podczas gdy w przypadku linii komórkowej Huh-7 - 7,02-krotnie wyższy poziom HKII w porównaniu do linii HMEC-1.



**Ryc. 7.11.** Porównanie poziomu białka HKII w komórkach linii HepG2, Huh-7 i HMEC-1. Wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  SD z trzech niezależnych eksperymentów (\*\*\*) $p < 0,001$  względem komórek HMEC-1 - komórek prawidłowych wykazujących niski poziom HKII).

## **7.4. Wpływ badanych związków na generowanie stresu oksydacyjnego w komórkach linii HepG2 i HuH-7**

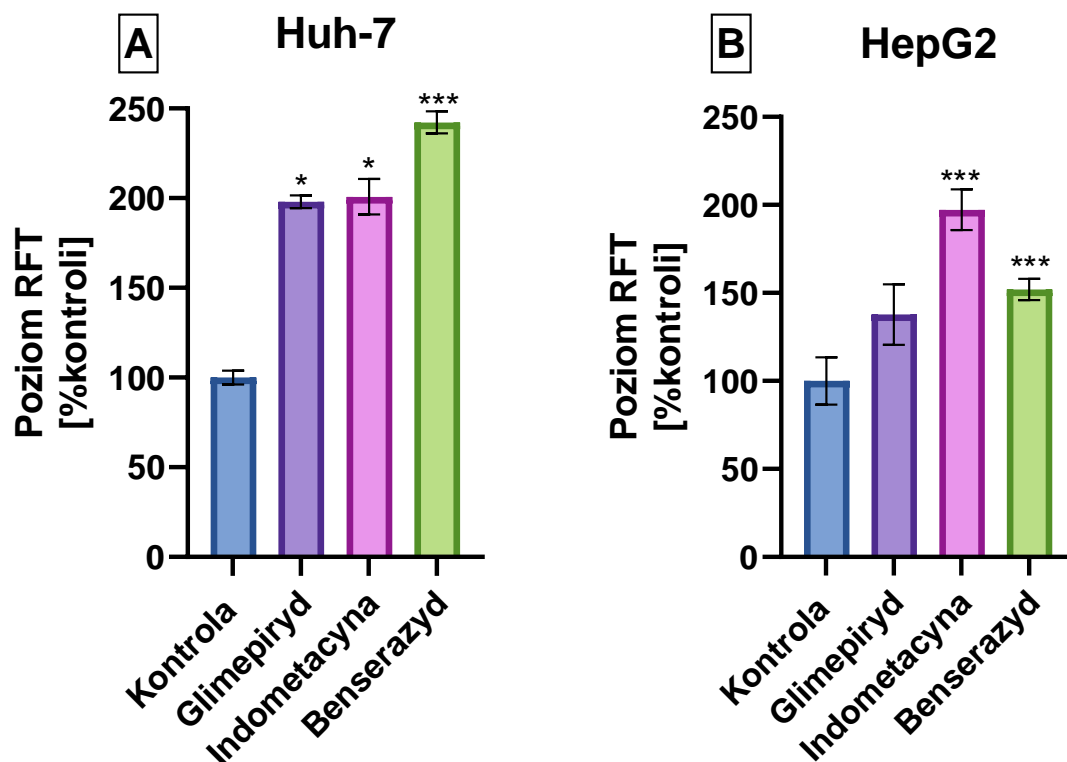
### **7.4.1. Poziom reaktywnych form tlenu powstających pod wpływem badanych związków**

W eksperymencie przebadano wpływ glimepirydu, indometacyny lub benserazydu, a także ich kombinacji z doksorubicyną, na wewnątrzkomórkowy poziom reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach nowotworowych wątroby (linie komórkowe Huh-7 i HepG2). Do pomiaru poziomu RFT wykorzystano sondę H<sub>2</sub>DCF-DA. Wyniki badań zostały przedstawione w postaci wykresów umieszczonych na rycinach 7.12.-7.14.

#### **7.4.1.1. Wpływ glimepirydu, indometacyny i benserazydu na poziom wewnątrzkomórkowych RFT**

W przypadku obu linii komórkowych nowotworu wątroby, linii komórkowej Huh-7 i linii komórkowej HepG2, poddanych działaniu glimepirydu, indometacyny lub benserazydu obserwowano zwiększoną produkcję reaktywnych form tlenu (RFT).

W linii komórkowej Huh-7 zaobserwowano największy wzrost poziomu RFT po zastosowaniu benserazydu, o 142,28%. W przypadku glimepirydu i indometacyny wzrost ten wynosił odpowiednio 98,01% i 100,79% (Ryc. 7.12.A.). Natomiast w przypadku linii komórkowej HepG2 to indometacyna wywołała największy wzrost poziomu RFT - 97,2%. Potraktowanie komórek linii HepG2 glimepirydem lub benserazydem skutkowało odpowiednio 37,79% i 52,04% wzrostem poziomu generowanych form tlenu (Ryc. 7.12.B.).



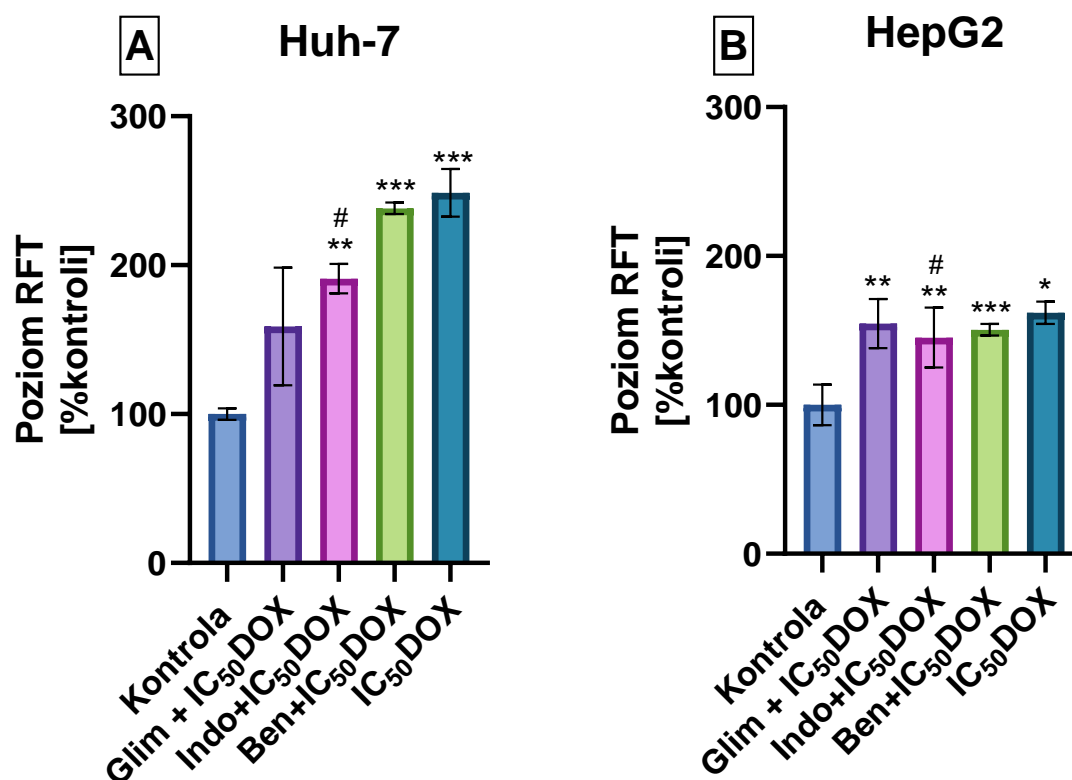
**Ryc. 7.12.** Poziom reaktywnych form tlenu w komórkach linii Huh-7 (A) i HepG2 (B) traktowanych glimepirydem, indometacyną i benserazydem w stężeniu  $IC_{50}$  przez 72 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  SD z trzech niezależnych eksperymentów (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  względem kontroli).

#### 7.4.1.2. Wpływ glimepirydu, indometacyny lub benserazydu w kombinacji z doksorubicyną na poziom RFT

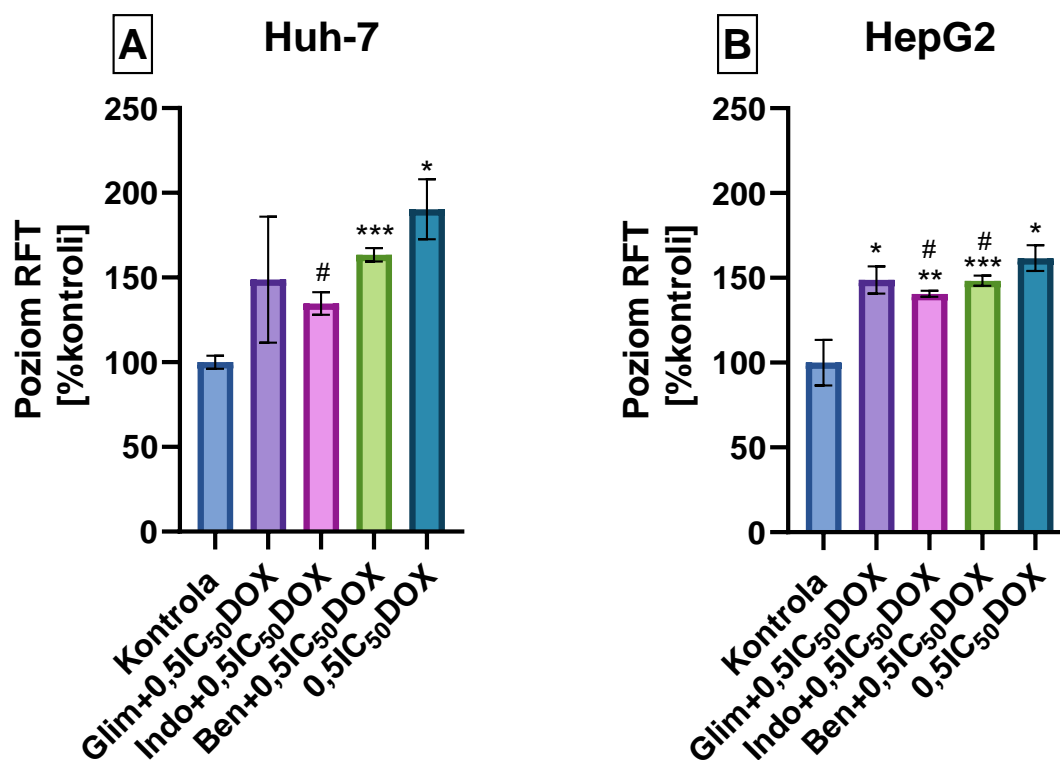
Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że kombinacja glimepirydu, indometacyny lub benserazydu z doksorubicyną zwiększają poziom reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach linii Huh-7 i HepG2.

W linii komórkowej Huh-7 największy wzrost poziomu RFT obserwowano po potraktowaniu komórek kombinacją benserazydu i doksorubicyny, odpowiednio o 138,14% (Ryc. 7.13.A.) i 63,36% (Ryc. 7. 14.A.) w stężeniach  $IC_{50}$  i  $0,5IC_{50}$  doksorubicyny. Natomiast w przypadku linii komórkowej HepG2 największy wzrost poziomu RFT zaobserwowano po połączeniu glimepirydu i doksorubicyny w stężeniach  $IC_{50}$  i  $0,5IC_{50}$ , odpowiednio o 54,58% (Ryc. 7. 13.B.) i 48,78% (Ryc. 7. 14.B.).

Należy jednak zauważyć, że w przypadku połączenia badanych związków z doksorubicyną w stężeniach  $IC_{50}$  lub  $0,5IC_{50}$  poziom RFT utrzymywał się na podobnym poziomie, jak po zastosowaniu samej doksorubicyny (w linii komórkowej HepG2) lub był niższy (w linii komórkowej Huh-7).



**Ryc. 7.13.** Poziom reaktywnych form tlenu w komórkach linii Huh-7 (A) i HepG2 (B) traktowanych glimepirydem (Glim), indometacyną (Indo) i benserazydem (Ben) w stężeniu  $IC_{50}$  w kombinacji z doksorubicyną w stężeniu  $IC_{50}$  przez 72 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  SD z trzech niezależnych eksperymentów (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  względem kontroli, # $p < 0,05$  względem doksorubicyny w stężeniu  $IC_{50}$ ).



**Ryc. 7.14.** Poziom reaktywnych form tlenu w komórkach linii Huh-7 (A) i HepG2 (B) traktowanych glimepirydem (Glim), indometacyną (Indo) i benserazydem (Ben) w stężeniu IC<sub>50</sub> w kombinacji z doksorubicyną w stężeniu 0,5IC<sub>50</sub> przez 72 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnia ± SD z trzech niezależnych (\*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 względem kontroli, #p < 0,05 względem doksorubicyny w stężeniu 0,5IC<sub>50</sub>).

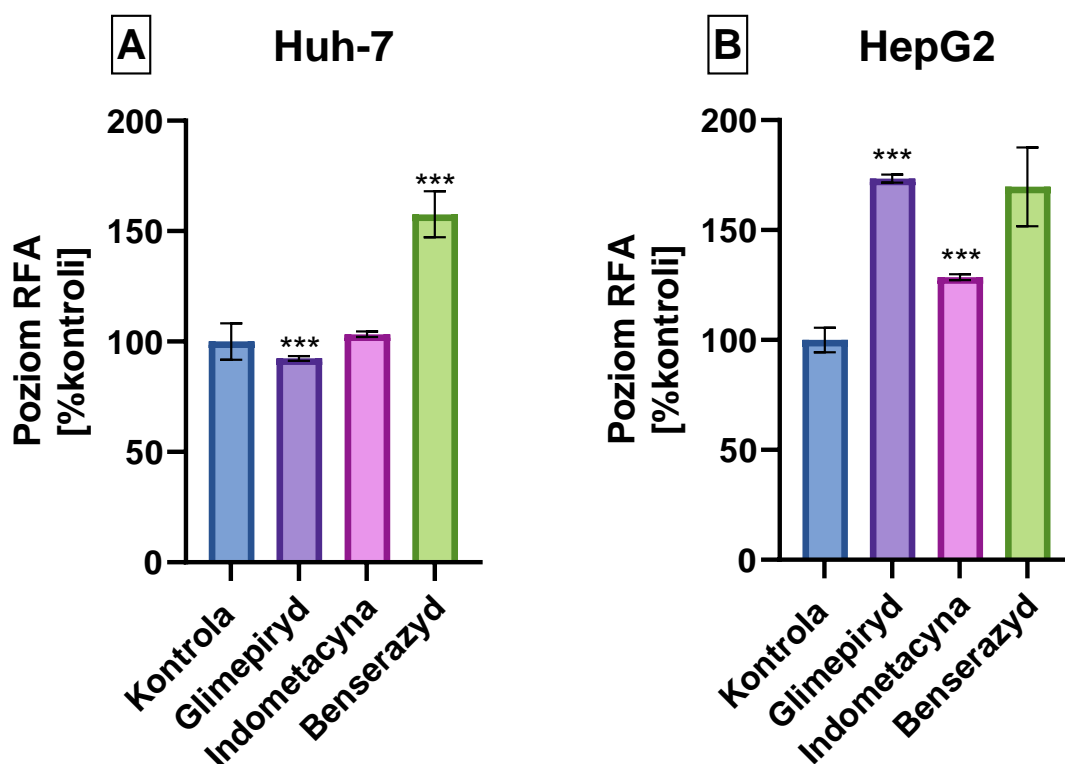
#### 7.4.2. Poziom reaktywnych form azotu powstających pod wpływem badanych związków

W celu zbadania wpływu glimepirydu, indometacyny i benserazydu, stosowanych samodzielnie lub w połączeniu z doksorubicyną, na poziom reaktywnych form azotu (RFA) w komórkach raka wątroby linii Huh-7 i HepG2, zastosowano sondę DAF-FM. Wyniki pomiarów poziomu RFA przedstawiono graficznie na rycinach 7.15.-7.17.

##### 7.4.2.1. Wpływ glimepirydu, indometacyny i benserazydu na poziom RFA

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że glimepiryd, indometacyna i benserazyd zwiększały poziom RFA w komórkach linii HepG2 odpowiednio o 73,34%, 28,57% i 69,68% (Ryc. 7.15.B.). Z kolei w przypadku linii komórkowej Huh-7 tylko benserazyd powodował

znaczący wzrost poziomu RFA, o 57,66%, w porównaniu z komórkami kontrolnymi (Ryc. 7.15.A).



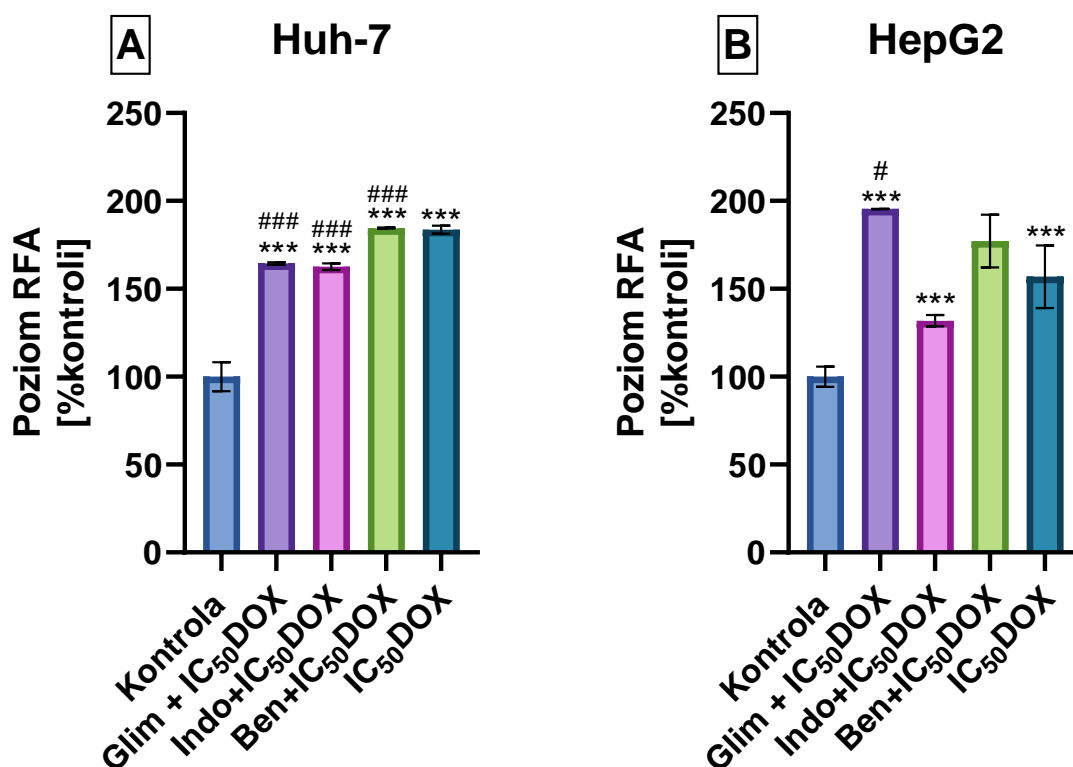
**Ryc. 7.15.** Poziom reaktywnych form azotu w komórkach linii Huh-7 (A) i HepG2 (B) traktowanych glimepirydem, indometacyną i benserazydem w stężeniu  $IC_{50}$  inkubowanych przez 72 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  SD z trzech niezależnych eksperymentów (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  względem kontroli).

#### 7.4.2.2. Wpływ glimepirydu, indometacyny lub benserazydu w kombinacji z doksorubicyną na poziom RFA

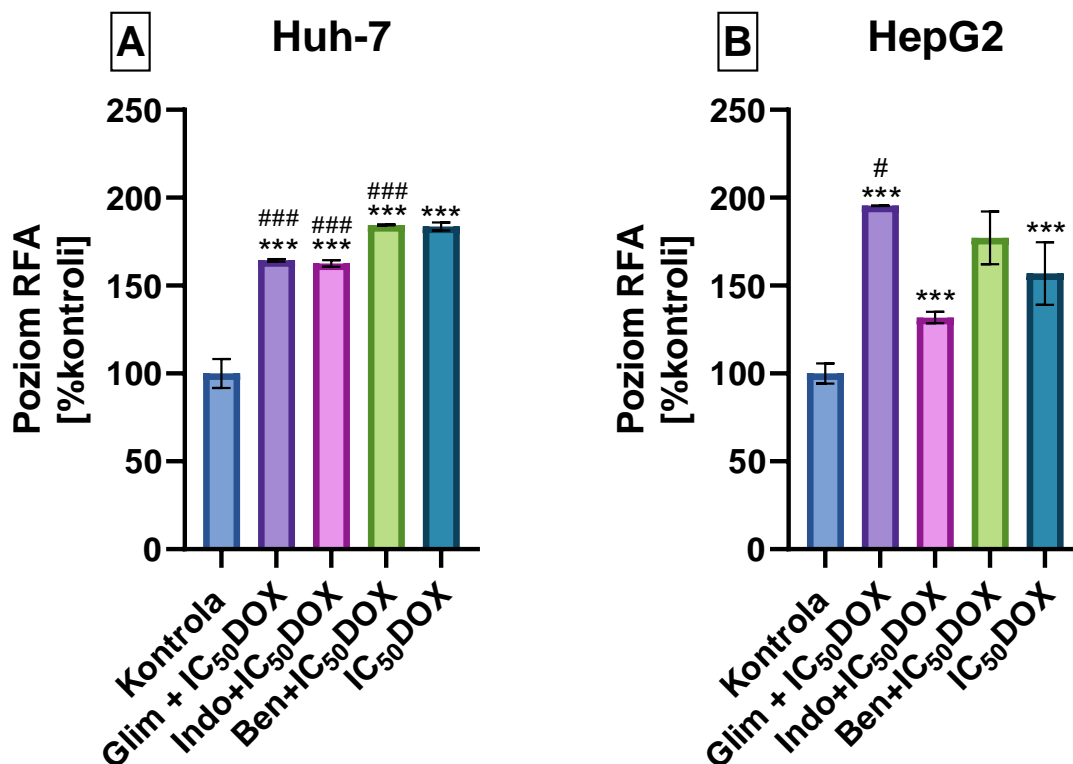
W linii komórkowej Huh-7 glimepiryd, indometacyna i benserazyd w połączeniu z doksorubicyną w stężeniach  $IC_{50}$  lub  $0,5IC_{50}$  powodowały wzrost poziomu RFA w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Jak można zauważyć na rycinie 17.16 i 17.17., połączenie benserazydu i doksorubicyny w stężeniach  $IC_{50}$  i  $0,5IC_{50}$  powodowało znaczący wzrost poziomu RFA, odpowiednio o 138,14% (Ryc. 17.16.A.) i 63,36% (Ryc. 17.17.A.)

w komórkach linii Huh-7. Nie odnotowano natomiast wzrostu poziomu RFA w porównaniu z komórkami traktowanymi samą doksorubicyną w stężeniach  $IC_{50}$  lub  $0,5IC_{50}$ .

W komórkach linii HepG2 wszystkie badane związki w połączeniu z doksorubicyną zwiększały poziom RFA. Jednak tylko glimepiryd i benserazyd w połączeniu z doksorubicyną w stężeniach  $IC_{50}$  (Ryc. 17.16.B.) i  $0,5IC_{50}$  (Ryc. 17.17.B.) wywoływały zwiększenie poziomu RFA w porównaniu do komórek traktowanych samą doksorubicyną, jak i w stosunku do komórek kontrolnych.



**Ryc. 7.16.** Poziom reaktywnych form azotu w komórkach linii Huh-7 (A) i HepG2 (B) traktowanych glimepirydem (Glim), indometacyną (Indo) i benserazydem (Ben) w stężeniu  $IC_{50}$  w kombinacji z doksorubicyną (DOX) w stężeniu  $IC_{50}$  inkubowanych przez 72 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  SD z trzech niezależnych eksperymentów (\*\*\*)  $p < 0,001$  względem kontroli, (#)  $p < 0,05$ , ###  $p < 0,001$  względem doksorubicyny w stężeniu  $IC_{50}$ ).



**Ryc. 7.17.** Poziom reaktywnych form azotu w komórkach linii Huh-7 i HepG2 traktowanych glimepirydem (Glim), indometacyną (Indo) i benserazydem (Ben) w stężeniu IC<sub>50</sub> w kombinacji z doksorubicyną (DOX) w stężeniu 0,5IC<sub>50</sub> inkubowanych przez 72 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnia ± SD z trzech niezależnych eksperymentów (\*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 względem kontroli, #p < 0,05, ###p < 0,001 względem doksorubicyny w stężeniu 0,5IC<sub>50</sub>).

### 7.4.3. Zmiany transbłonowego potencjału mitochondrialnego ( $\Delta\Psi$ )

Ocena potencjału błony mitochondrialnej ( $\Delta\Psi$ ) w komórkach może być wykorzystana do oszacowania stanu bioenergetycznego mitochondriów. W tym celu stosuje się fluorescencyjne sondy kationowe, które są w stanie wnikać do komórek i gromadzić się głównie w macierzy mitochondrialnej w sposób zależny od  $\Delta\Psi$ .

W niniejszej pracy doktorskiej zastosowano sondę MitoTracker CMXRos do oceny stanu mitochondriów i zmian potencjału mitochondrialnego (MMP) w komórkach linii Huh-7 i HepG2. Komórki te były poddane na działanie badanych związków (glimepirydu,

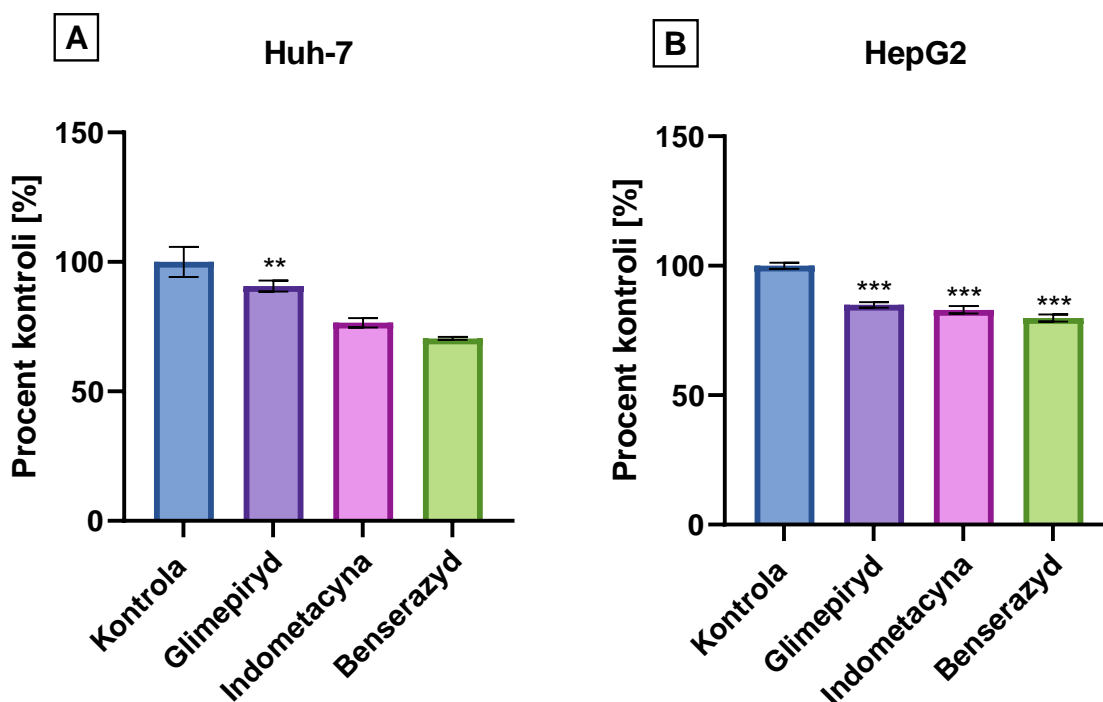


indometacyny, benserazydu) oraz ich kombinacji z dokсорubicyną. Wyniki przedstawiono na Ryc. 17.18-17.20.

#### 7.4.3.1. Wpływ glimepirydu, indometacyny i benserazydu na potencjał błony mitochondrialnej

Po 72-godzinnej inkubacji komórek linii Huh-7 i HepG2 z badanymi związkami zaobserwowano spadek intensywności fluorescencji sondy MitoTracker Red CMXRos, co wskazuje na depolaryzację błony.

W komórkach linii Huh-7, po inkubacji z badanymi związkami w stężeniach  $IC_{50}$ , obserwowano spadek MMP odpowiednio o 9,27%, 23,5%, 29,5% dla glimepirydu, indometacyny oraz benserazydu (Ryc. 17.18.A.). W przypadku komórek linii HepG2 spadek potencjału błony mitochondrialnej wynosił 15,1%, 17% i 20,18% odpowiednio dla glimepirydu, indometacyny oraz benserazydu (Ryc.17.18.B.).



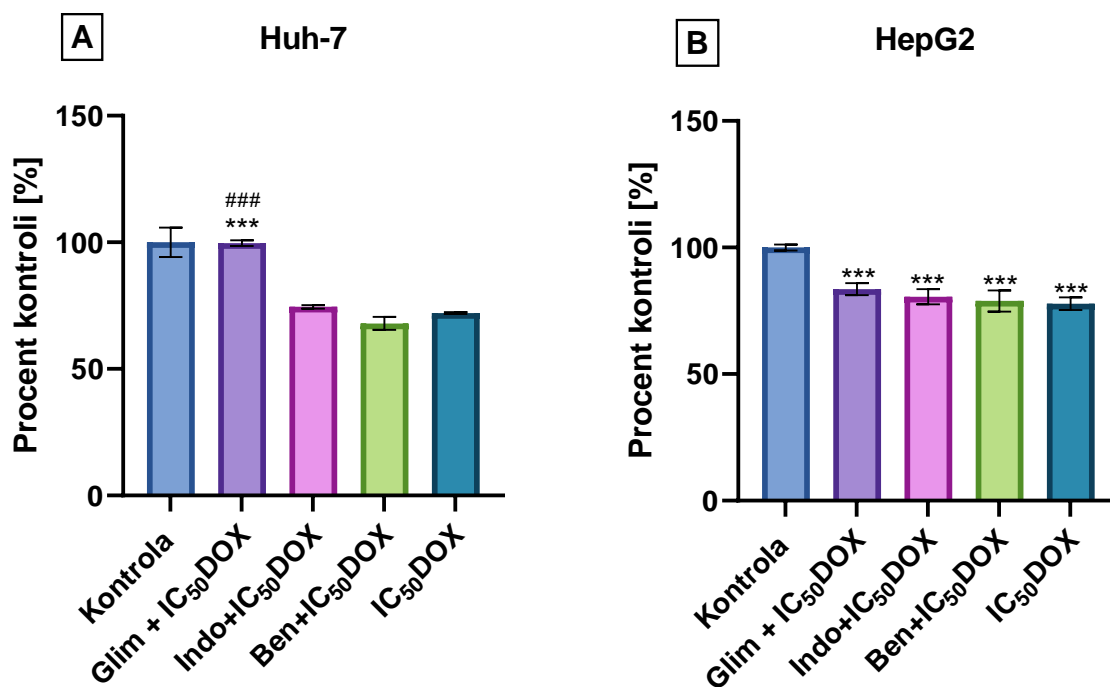
**Ryc. 7.18.** Zmiany potencjału błony mitochondrialnej (MMP) w komórkach linii Huh-7 (A) i HepG2 (B) traktowanych glimepirydem, indometacyną lub benserazydem

w stężeniu  $IC_{50}$  przez 72 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  SD z trzech niezależnych eksperymentów (\*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 względem kontroli).

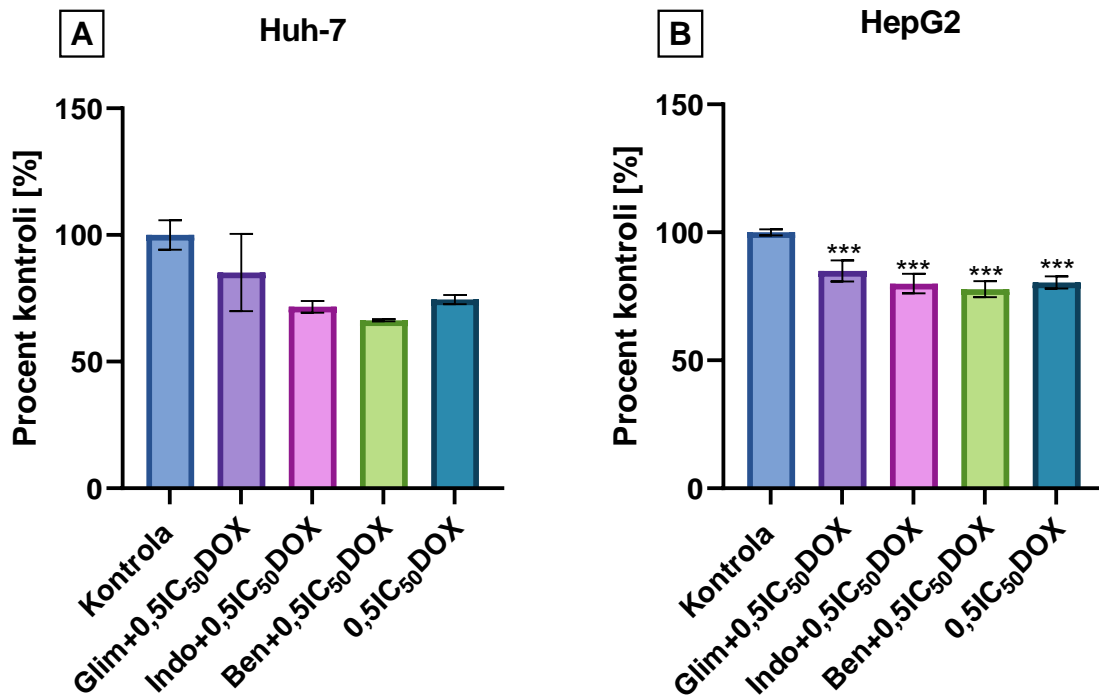
#### **7.4.3.2. Wpływ kombinacji glimepirydu, indometacyny lub benserazydu z doksorubicyną na potencjał błony mitochondrialnej**

W komórkach linii Huh-7 inkubowanych z badanymi potencjalnymi inhibitorami HKII w kombinacji z doksorubicyną w stężeniu  $IC_{50}$  lub  $0.5IC_{50}$  po 72 godzinach inkubacji, obserwowano depolaryzację błony. Jak pokazano na Ryc. 7.20. największy spadek potencjału błony, o 33,64%, wystąpił po zastosowaniu benserazydu w połączeniu z doksorubicyną w stężeniu  $0,5IC_{50}$ . W przypadku kombinacji benserazydu z doksorubicyną w stężeniu  $IC_{50}$  doszło do spadku potencjału błony o 32,03% (Ryc. 7.19.A.). Aczkolwiek, wykonane badanie nie wykazało istotnych statystycznie zmian potencjału błony mitochondrialnej po zastosowaniu kombinacji benserazydu lub indometacyny z doksorubicyną w stężeniu  $IC_{50}$  lub  $0.5IC_{50}$  oraz glimepirydu w połączeniu z doksorubicyną w stężeniu  $0.5IC_{50}$  w komórkach linii Huh-7.

W przypadku komórek linii HepG2 obserwowano spadek MMP po inkubacji z badanymi związkami. Podobnie jak w komórkach linii Huh-7, benserazyd w skojarzeniu z doksorubicyną wywołał najwyższy spadek potencjału błony mitochondrialnej o 21.1 % w stężeniu  $IC_{50}$  (Ryc.7.19.B.) oraz o 22.21% w stężeniu  $0.5IC_{50}$  w linii komórkowej HepG2 (Ryc.7.20.B.).



**Ryc. 7.19.** Zmiany potencjału błony mitochondrialnej (MMP) w komórkach linii Huh-7 (A) i HepG2 (B) traktowanych glimepirydem (Glim), indometacyną (Indo) lub benserazydem (Ben) w stężeniu IC<sub>50</sub> w kombinacji z doksorubicyną stężeniu IC<sub>50</sub> przez 72 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnia ± SD z trzech niezależnych eksperymentów (\*\*p < 0,01 względem kontroli, ###p < 0,001 względem doksorubicyny w stężeniu IC<sub>50</sub>).



**Ryc. 7.20.** Zmiany potencjału błony mitochondrialnej (MMP) w komórkach linii Huh-7 (A) i HepG2 (B) traktowanych glimepirydem (Glim), indometacyną (Indo) lub benserazydem (Ben) w stężeniu IC<sub>50</sub> w kombinacji z doksorubicyną (DOX) stężeniu 0,5IC<sub>50</sub> przez 72 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnia ± SD z trzech niezależnych eksperymentów (\*\*\*p < 0,001 względem kontroli).

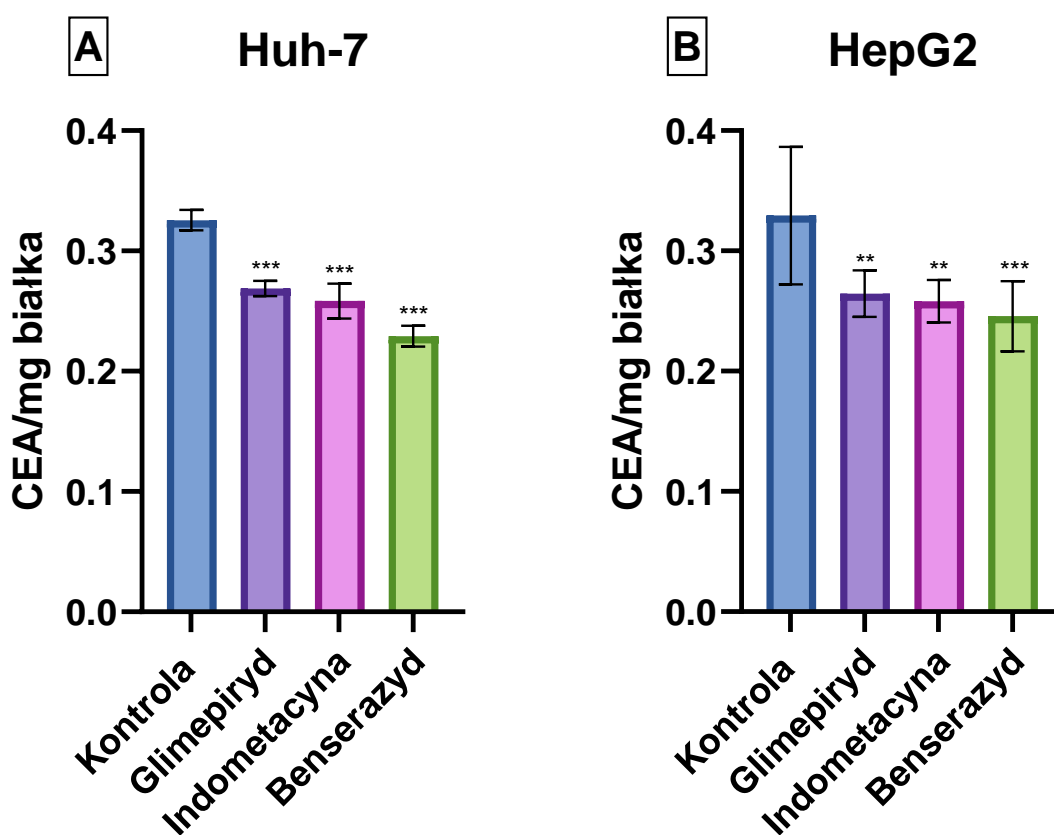
#### 7.4.4. Wpływ badanych związków na całkowity potencjał antyoksydacyjny

W celu ustalenia potencjalnej roli stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego w cytotoksyczności glimepirydu, indometacyny, benserazydu i ich połączenia z doksorubicyną, przeanalizowano molekularne biomarkery uszkodzeń komórki powstających na skutek zwiększonego stresu oksydacyjnego, w tym całkowity potencjał antyoksydacyjny komórek. W badaniu oceniano całkowity potencjał antyoksydacyjny za pomocą testu FRAP (ang. ferric reducing-antioxidant power), za pomocą którego możliwa jest analiza redukcji jonów Fe<sup>3+</sup> do Fe<sup>2+</sup>. Wyniki przedstawiono na Ryc. 7.21-7.23.

#### 7.4.4.1. Wpływ glimepirydu, indometacyny i benserazydu na całkowity potencjał antyoksydacyjny

Badania wykazały, że glimepiryd, indometacyna i benserazyd obniżają potencjał antyoksydacyjny komórek w obu liniach komórkowych Huh-7 i HepG2.

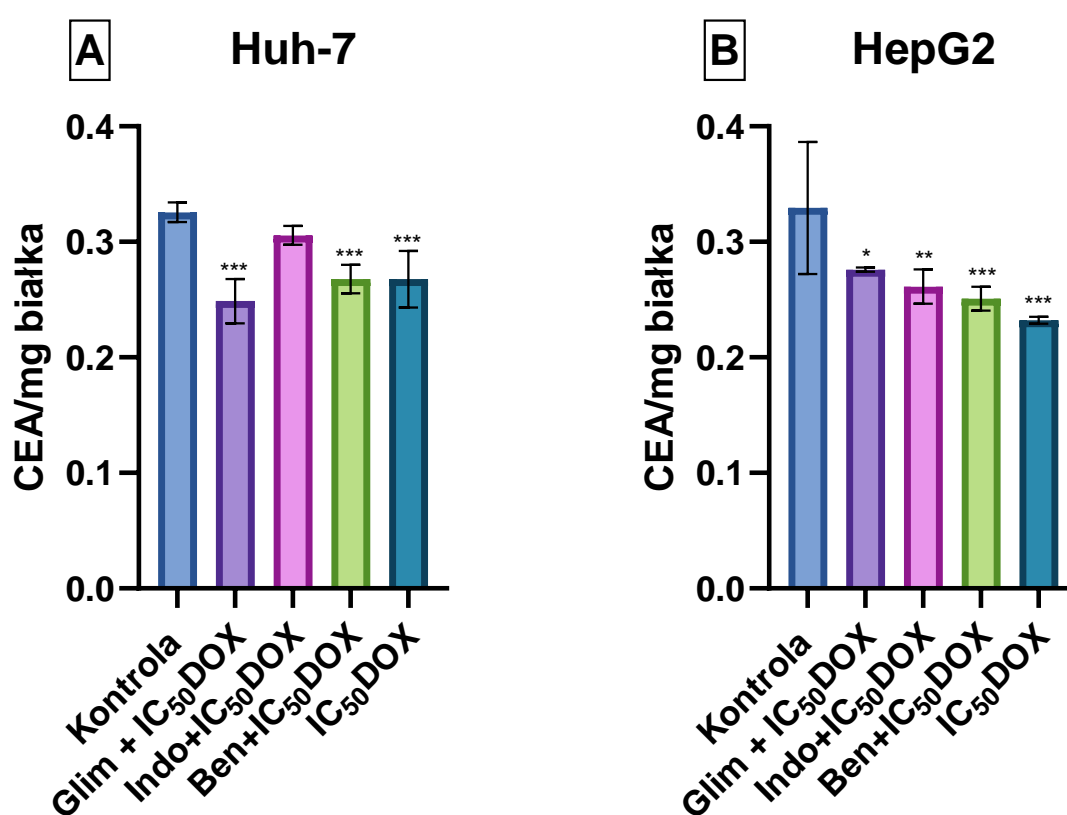
Najniższy poziom potencjału antyoksydacyjnego obserwowano w komórkach inkubowanych z benserazydem w stężeniu  $IC_{50}$ , efekt ten występował w obu badanych liniach komórkowych (Ryc. 7.21.).



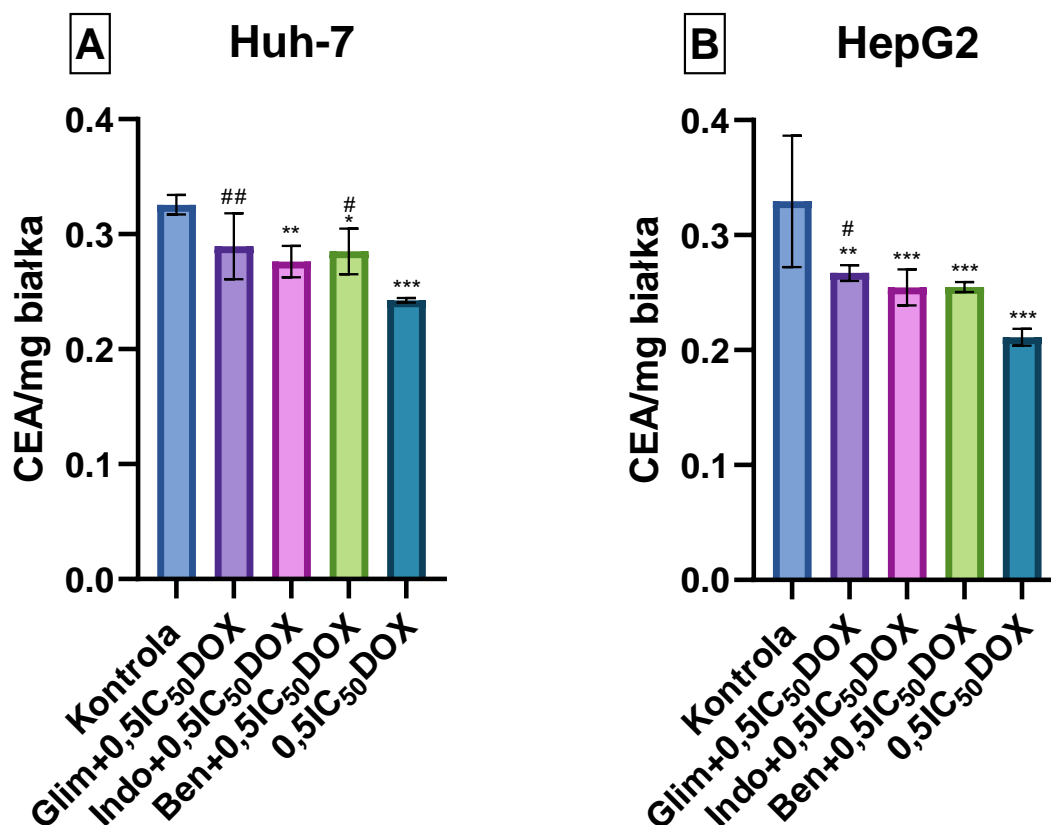
**Ryc. 7.21.** Całkowity potencjał antyoksydacyjny komórek linii Huh-7 (A) i HepG2 (B) traktowanych glimepirydem, indometacyną i benserazydem w stężeniu  $IC_{50}$  przez 72 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  SD z pięciu niezależnych eksperymentów (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  względem kontroli).

#### 7.4.4.2 Wpływ glimepirydu, indometacyny lub benserazydu w kombinacji z doksorubicyną na całkowity potencjał antyoksydacyjny

W linii komórkowej Huh-7, kombinacja glimepirydu z doksorubicyną w stężeniu  $IC_{50}$  spowodowała istotny spadek całkowitego potencjału antyoksydacyjnego (Ryc. 7.22A.), podczas gdy w komórkach linii HepG2 znaczny spadek potencjału antyoksydacyjnego zaobserwowano po zastosowaniu benserazydu w kombinacji z doksorubicyną w stężeniu  $IC_{50}$  (Ryc. 7.22.B.). Co ciekawe, kombinacja indometacyny z doksorubicyną w stężeniu  $0,5IC_{50}$  wywołała spadek potencjału antyoksydacyjnego w obu liniach komórkowych (Ryc. 7.23.).



Ryc. 7.22. Całkowity potencjał antyoksydacyjny komórek linii Huh-7 (A) i HepG2 (B) traktowanych glimepirydem (Glim), indometacyną (Indo) i benserazydem (Ben) w stężeniu  $IC_{50}$  w kombinacji z doksorubicyną (DOX) stężeniu  $IC_{50}$  przez 72 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  SD z pięciu niezależnych eksperymentów (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  względem kontroli).



**Ryc. 7.23.** Całkowity potencjał antyoksydacyjny komórek linii Huh-7 (A) i HepG2 (B) traktowanych glimepirydem (Glim), indometacyną (Indo) i benserazydem (Ben) w stężeniu IC<sub>50</sub> w kombinacji z doksorubicyną (DOX) stężeniu 0,5IC<sub>50</sub> przez 72 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnia ± SD z pięciu niezależnych eksperymentów (\*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 względem kontroli, #p < 0,05, ##p < 0,01 względem doksorubicyny w stężeniu 0,5IC<sub>50</sub>).

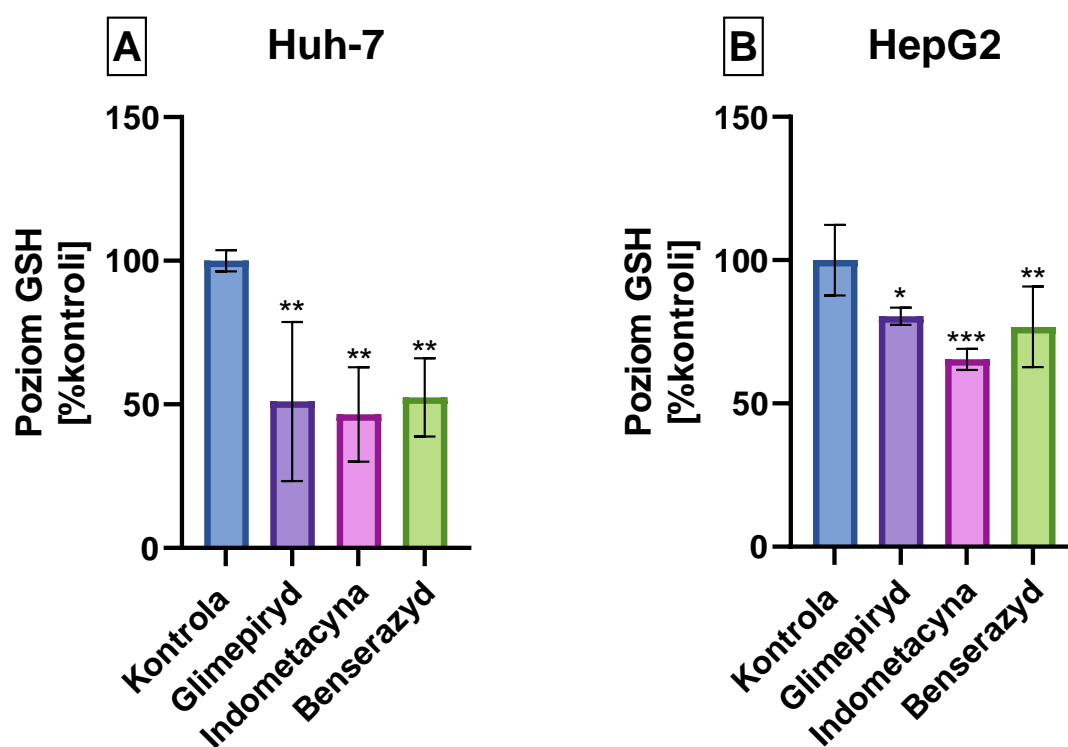
#### 7.4.5. Zmiany poziomu zredukowanego glutationu (GSH)

Glutation jest głównym naturalnym antyoksydantem, odgrywającym kilka ochronnych funkcji w komórce. W ramach niniejszego badania zmierzono poziom GSH w komórkach linii Huh-7 i HepG2, aby określić stres oksydacyjny wywołany przez glimepiryd, indometacynę lub benserazyd oraz ich kombinacje z doksorubicyną. Do oznaczenia poziomu zredukowanego glutationu (GSH) wykorzystano sondę fluorescencyjną monochlorobiman (MCB)

W badaniu komórki inkubowano w stężeniach  $0,5IC_{50}$  lub  $IC_{50}$  (w zależności od związku). Następnie komórki poddano inkubacji przez 72 godziny. Wyniki przedstawiono w postaci wykresów umieszczonych na rycinach 7.24-7.26.

#### 7.4.5.1. Wpływ glimepirydu, indometacyny i benserazydu na poziom GSH

Pomiar poziomu zredukowanego glutationu wykazał istotne różnice między komórkami kontrolnymi, a komórkami potraktowanymi glimepirydem, indometacyną lub benserazydem. Badane związki obniżały poziom GSH w komórkach, jednak największy spadek poziomu zredukowanego glutationu zaobserwowano w komórkach linii Huh-7 (glimepiryd - 51,05%, indometacyna - 46,53%, benserazyd - 52,41%) (Ryc. 7.24.A.), w porównaniu do komórek linii HepG2, gdzie obserwowane zmiany były mniejsze (glimepiryd - 80,47%, indometacyna - 63,39%, benserazyd - 76,72%) (Ryc. 7.24.B.).



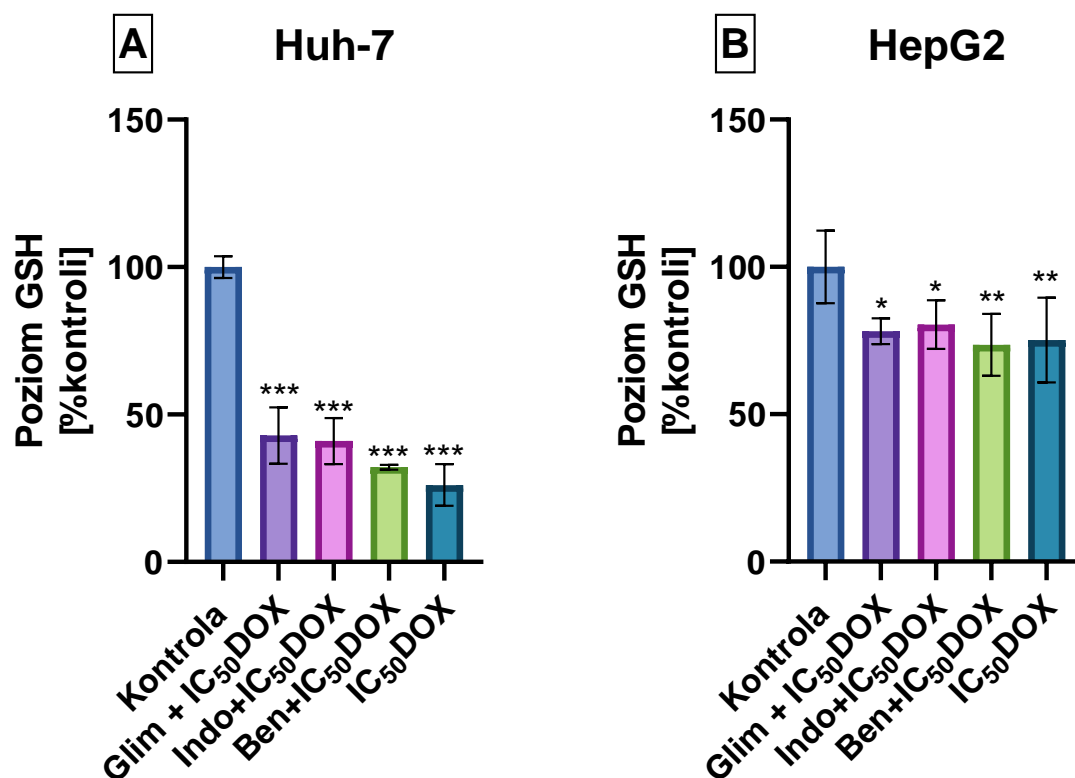
**Ryc. 7.24.** Poziom GSH w komórkach linii Huh-7 i HepG2 traktowanych glimepirydem, indometacyną i benserazydem w stężeniu  $IC_{50}$  przez 72 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  SD z trzech niezależnych eksperymentów (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  względem kontroli).



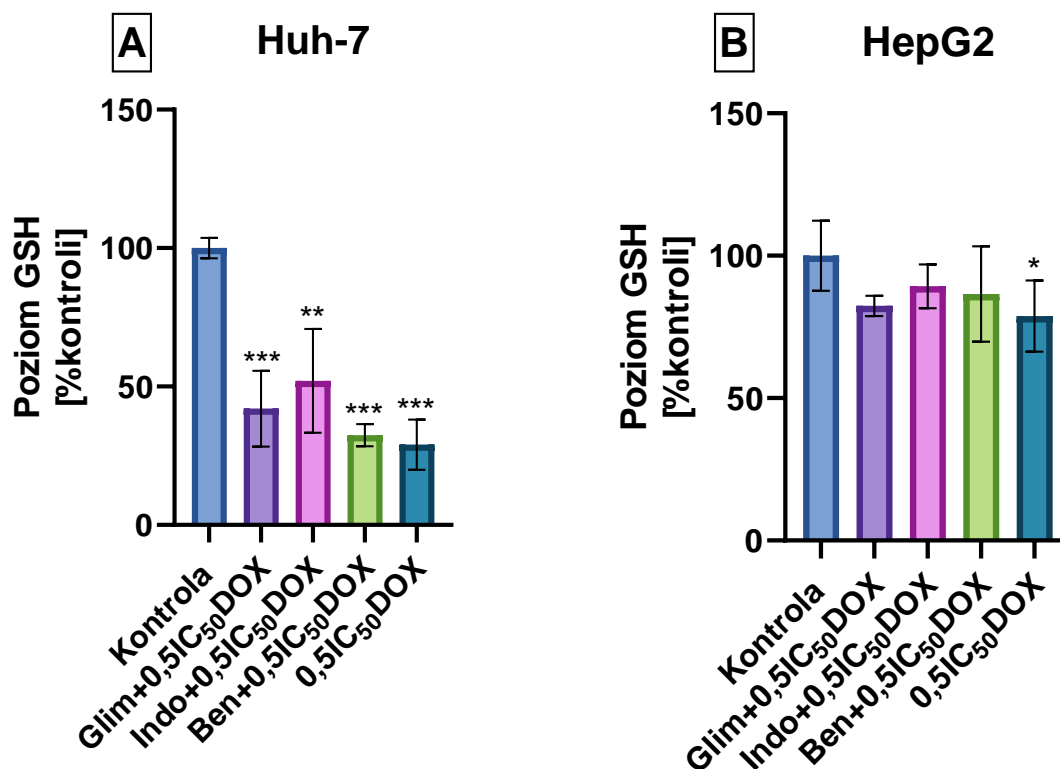
#### **7.4.5.2. Wpływ glimepirydu, indometacyny lub benserazydu w kombinacji z doksorubicyną na poziom GSH**

Przeprowadzone badania wykazały istotny spadek poziomu GSH po zastosowaniu badanych związków w połączeniu z doksorubicyną w stężeniach  $IC_{50}$  lub  $0,5IC_{50}$  w obu liniach komórkowych nowotworu wątroby (Huh-7 i HepG2). W szczególności w komórkach linii Huh-7 zaobserwowano duży spadek poziomu GSH po zastosowaniu kombinacji z doksorubicyną w stężeniu  $0,5IC_{50}$  oraz  $IC_{50}$ .

W przypadku komórek linii Huh-7, zastosowanie połączenia glimepirydu, indometacyny lub benserazydu z doksorubicyną w stężeniach  $IC_{50}$  i  $0,5IC_{50}$  skutkowało istotnym obniżeniem poziomu GSH w porównaniu do komórek kontrolnych. Nie zaobserwowano istotnego spadku poziomu GSH w porównaniu do komórek traktowanych samą doksorubicyną w stężeniach  $IC_{50}$  i  $0,5IC_{50}$  (Ryc. 7.25.A. i Ryc. 7.26.A.). Podobnie, w przypadku komórek linii HepG2, wszystkie trzy związki badane w połączeniu z doksorubicyną spowodowały zmniejszenie poziomu GSH (Ryc. 7.25.B. i Ryc. 7.26.B.), ale tylko połączenie z doksorubicyną w stężeniu  $IC_{50}$  wywołało istotny statystycznie spadek poziomu GSH w porównaniu do komórek kontrolnych (Ryc. 7.25.B.).



**Ryc. 7.25.** Poziom GSH w komórkach linii Huh-7 i HepG2 traktowanych glicemipirydem (Glim), indometacyną (Indo) i benserazydem (Ben) w stężeniu IC<sub>50</sub> w kombinacji z doksorubicyną (DOX) w stężeniu IC<sub>50</sub> przez 72 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnia ± SD z trzech niezależnych eksperymentów(\*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 względem kontroli)



**Ryc. 7.26.** Poziom GSH w komórkach linii Huh-7 i HepG2 traktowanych glimepirydem (Glim), indometacyną (Indo) i benserazydem (Ben) w stężeniu IC<sub>50</sub> w kombinacji z doksorubicyną (DOX) w stężeniu 0,5IC<sub>50</sub> przez 72 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnia ± SD z trzech niezależnych eksperymentów (\*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 względem kontroli).

## 7.5. Identyfikacja rodzaju śmierci komórki

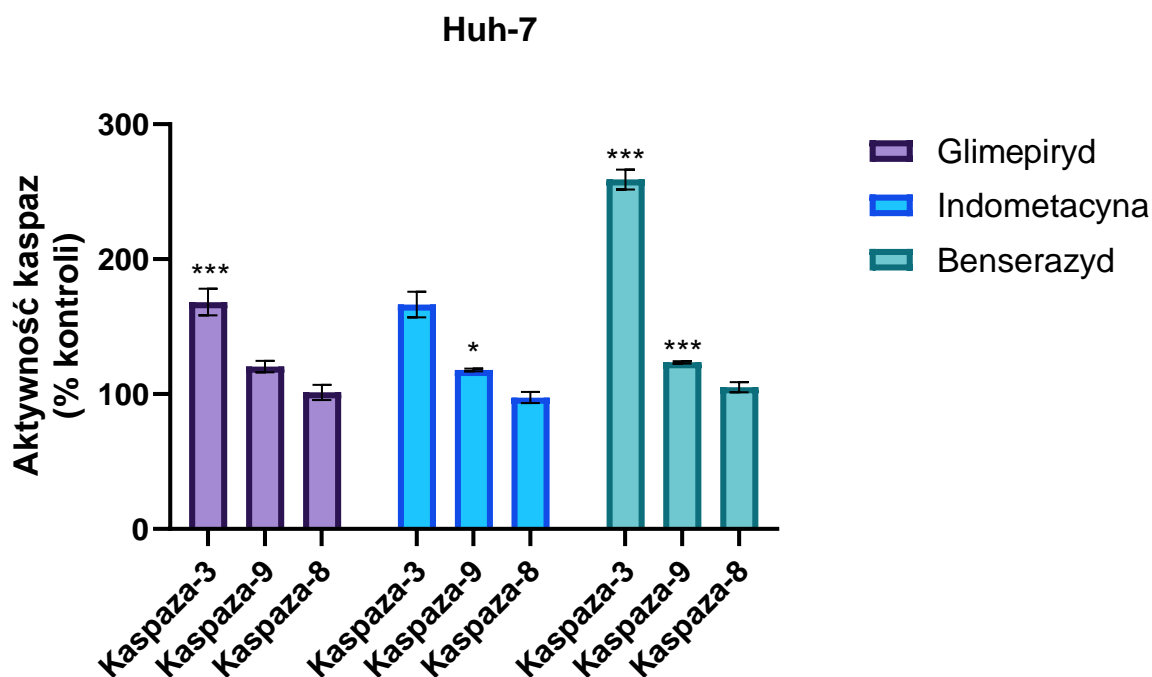
### 7.5.1. Analiza aktywności kaspazy -3, -9, -8

Kaspazy to rodzina proteaz cysteinowych odgrywających kluczową rolę w programowanej śmierci komórki - apoptozie. W badaniu oceniano pro-apoptotyczne właściwości glimepirydu, indometacyny i benserazydu oraz ich kombinacji z doksorubicyną w komórkach nowotworowych linii Huh-7 i HepG2. Celem badania było również ustalenie specyficznych ścieżek programowanej śmierci komórki zaangażowanych w apoptozę. W tym celu przeanalizowano aktywność kaspaz inicjujących-8 i -9 oraz kaspazy efektorowej-3. Wyniki przedstawiono na rycinie 7.27-7.32. W badaniu wartość fluorescencji lub absorbancji

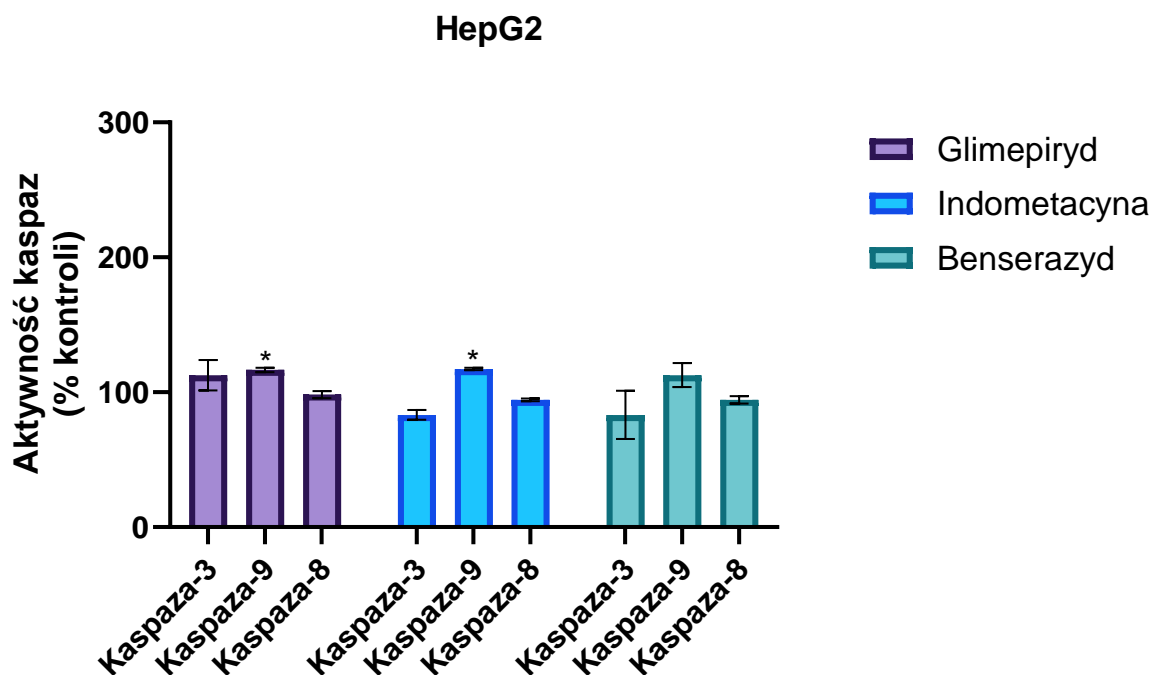
(w zależności od zastosowanej metody pomiaru) kontroli, komórek nie traktowanych badanym związkiem, przyjęto za 100%.

### 7.5.1.1. Analiza aktywności kaspazy -3, -9, -8 w komórkach linii Huh-7 oraz linii HepG2 inkubowanych z glimepirydem, indometacyną lub benserazydem

Przedstawione na rycinie 7.27. i 7.28. wyniki wskazują, że glimepiryd, indometacyna lub benserazyd prowadziły do zwiększenia aktywności kaspazy-3 i -9 w obu badanych liniach komórkowych. Glimepiryd powodował wzrost aktywności kaspazy-3 i -9 o 68,18% i 20,38% w komórkach linii Huh-7 (Ryc. 7.27), natomiast w komórkach linii HepG2 wzrost wynosił odpowiednio o 12,6% i 16,56% (Ryc. 7.28.). Benserazyd i indometacyna zwiększały aktywność kaspazy-3 odpowiednio o 159,03% i 66,39% oraz aktywność kaspazy-9 o 23,56% i 17,83% w komórkach linii Huh-7 (Ryc. 7.27). W komórkach linii HepG2 benserazyd i indometacyna nie zwiększały aktywności kaspazy-3, ale aktywność kaspazy-9 wzrosła o 12,73% i 17,19% (Ryc. 7.28.).



Ryc. 7.27. Zmiany aktywności kaspazy-3, -9 i -8 w komórkach linii Huh-7 traktowanych glimepirydem, indometacyną lub benserazydem w stężeniu IC<sub>50</sub> przez 72 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnia ± SD z trzech niezależnych eksperymentów (\*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 względem kontroli).



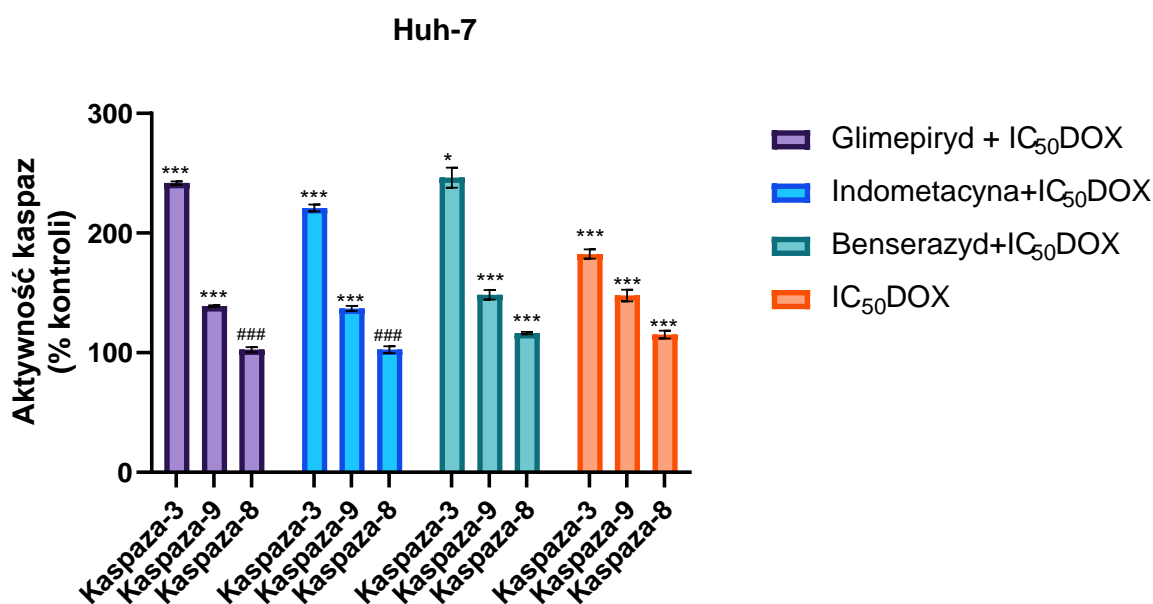
**Ryc. 7.28.** Zmiany aktywności kaspazy-3, -9 i -8 w komórkach linii HepG2 traktowanych glimepirydem, indometacyną lub benserazydem w stężeniu  $IC_{50}$  przez 72 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  SD z trzech niezależnych eksperymentów (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  względem kontroli).

#### **7.5.1.2. Analiza aktywności kaspazy -3, -9, -8 w komórkach linii Huh-7 oraz linii HepG2 inkubowanych z glimepirydem, indometacyną lub benserazydem w kombinacji z doksorubicyną**

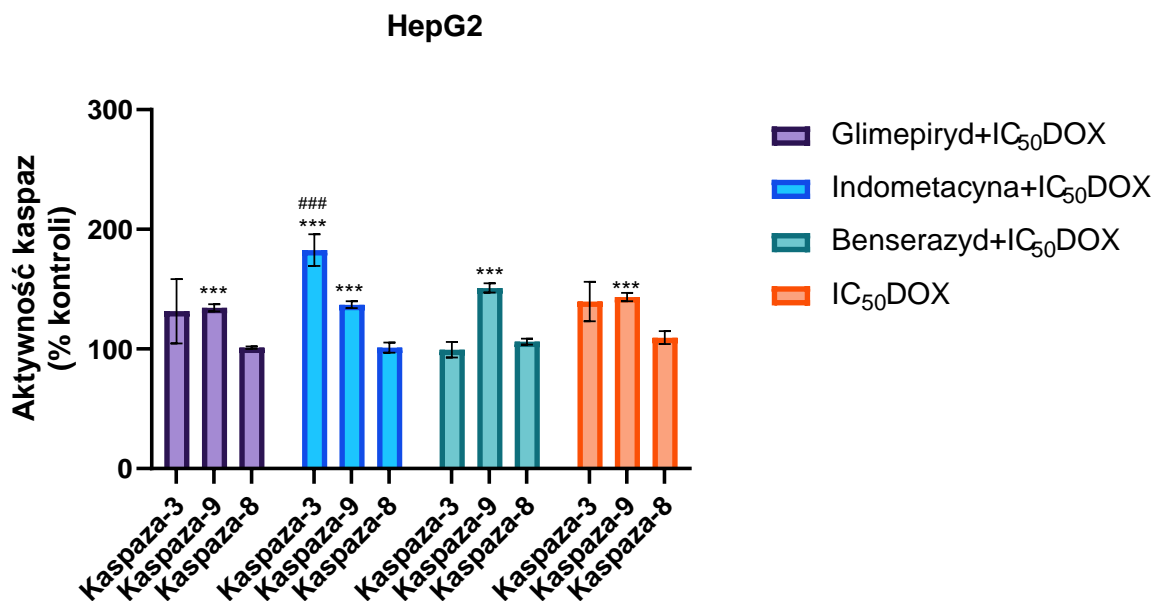
W komórkach linii Huh-7 poddanych działaniu kombinacji glimepirydu z doksorubicyną w stężeniu  $IC_{50}$ , aktywność kaspazy-3 i -9 wzrosła odpowiednio o 141,7% i 38,85% (Ryc. 7.29.). Natomiast przy stężeniu  $0,5IC_{50}$  doksorubicyny wzrost aktywności kaspazy-3 i -9 wynosił odpowiednio 84,83% i 38,85% (Ryc. 7.31.). W przypadku komórek linii HepG2, połączenie glimepirydu z doksorubicyną w stężeniu  $IC_{50}$  indukowało wzrost aktywności kaspazy-3 i -9 odpowiednio o 31,53% i 34,39% (Ryc. 7.30.). Natomiast przy stężeniu  $0,5IC_{50}$  doksorubicyny wzrost aktywności kaspazy-3 i -9 wynosił odpowiednio 15,72% i 31,21% (Ryc. 7.31.).

Benserazyd w skojarzeniu z doksorubicyną w stężeniu  $IC_{50}$  powodował wzrost aktywności kaspazy-3 i -9 odpowiednio o 146,3% i 48,4% (Ryc. 7.29), podczas gdy połączenie benserazydu z doksorubicyną w stężeniu  $0,5IC_{50}$  prowadziło do wzrostu aktywności kaspazy-3 i -9 o 110,9% i 48,4% w komórkach linii Huh-7 (Ryc. 7.31.). W przypadku komórek linii HepG2 benserazyd w skojarzeniu z doksorubicyną w stężeniu  $IC_{50}$  powodował wzrost aktywności kaspazy-9 o 50,96% (Ryc. 7.30.), a w połączeniu z doksorubicyną w stężeniu  $0,5IC_{50}$  dochodziło do wzrostu o 46,47% (Ryc. 7.32.).

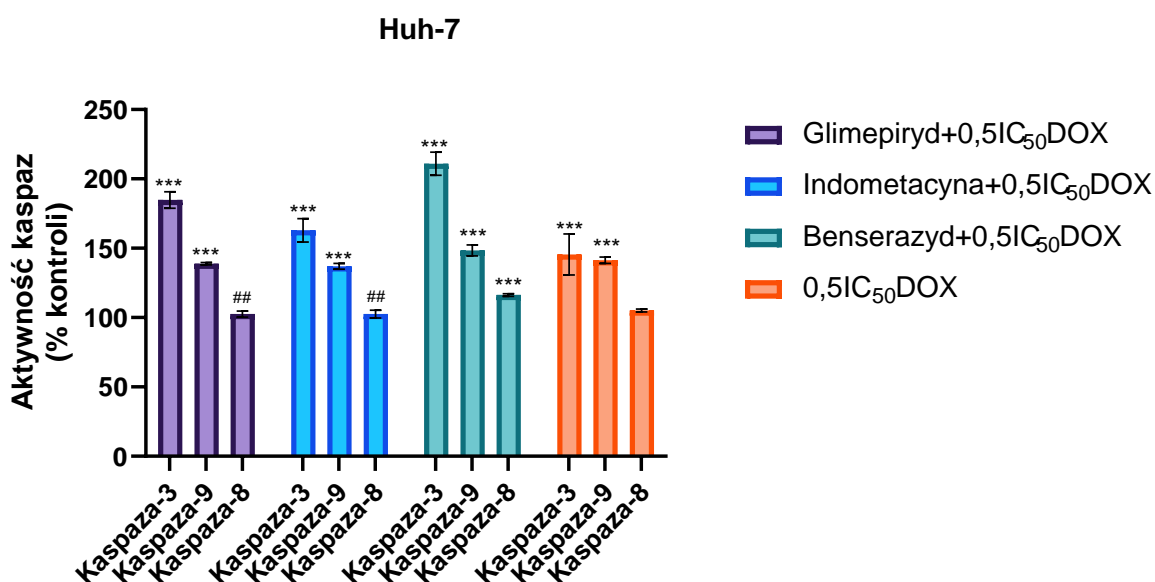
Wyniki wskazują, że indometacyna w połączeniu z doksorubicyną zarówno w stężeniu  $IC_{50}$ , jak i  $0,5IC_{50}$ , znacząco zwiększała aktywność kaspazy-3 i -9 w komórkach linii Huh-7, o czym świadczy wzrost odpowiednio o 110,9% i 36,94% (Ryc. 7.29) w stężeniu  $IC_{50}$  oraz wzrost o 62,92% i 36,94% w stężeniu  $0,5IC_{50}$  (Ryc. 7.31.). W komórkach linii HepG2 indometacyna w skojarzeniu z doksorubicyną w stężeniu  $IC_{50}$  powodowała znaczny wzrost aktywności kaspazy-3 i -9 o 82,55% i 36,9% (Ryc. 7.30.), natomiast połączenie w stężeniu  $0,5IC_{50}$  powodowało wzrost aktywności tylko kaspazy-9 o 41,4% (Ryc. 7.32.).



**Ryc. 7.29.** Zmiany aktywności kaspazy-3, -9 i -8 w komórkach linii Huh-7 traktowanych glimepirydem, indometacyną lub benserazydem w stężeniu  $IC_{50}$  w kombinacji z doksorubicyną (DOX) stężeniu  $IC_{50}$  przez 72 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  SD z trzech niezależnych eksperymentów (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  względem kontroli, # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$  względem doksorubicyny w stężeniu  $IC_{50}$ ).

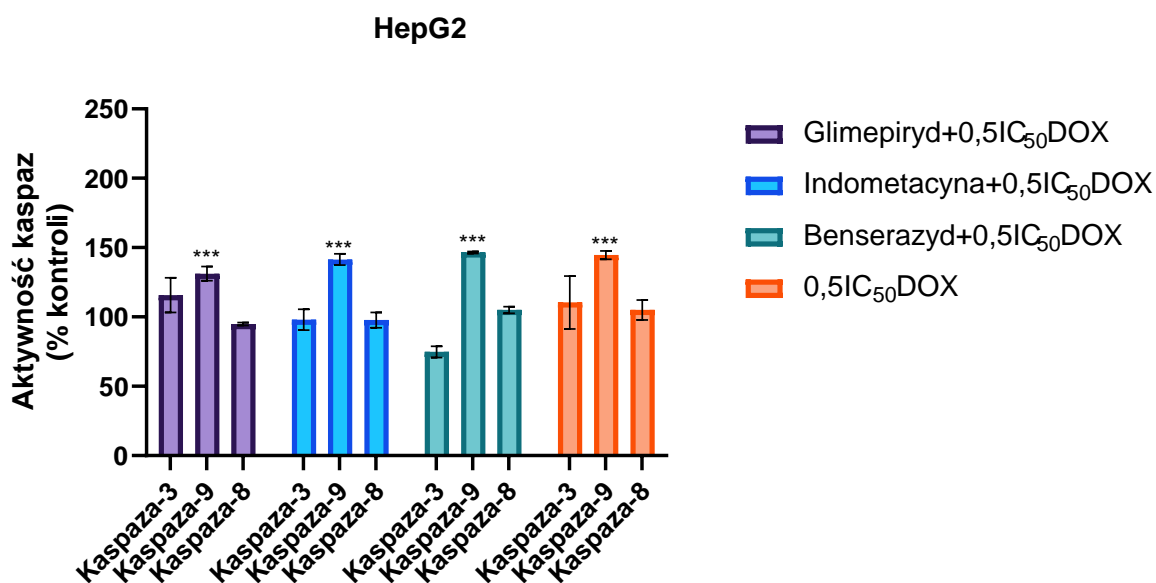


**Ryc. 7.30.** Zmiany aktywności kaspazy-3, -9 i -8 w komórkach linii HepG2 traktowanych glimepirydem, indometacyną lub benserazydem w stężeniu IC<sub>50</sub> w kombinacji z doksorubicyną (DOX) stężeniu IC<sub>50</sub> przez 72 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnia ± SD z trzech niezależnych eksperymentów (\*\*\*)p < 0,001 względem kontroli, ###p < 0,001 względem doksorubicyny w stężeniu IC<sub>50</sub>).



**Ryc. 7.31.** Zmiany aktywności kaspazy-3, -9 i -8 w komórkach linii Huh-7 traktowanych glimepirydem, indometacyną lub benserazydem w stężeniu IC<sub>50</sub> w kombinacji z doksorubicyną (DOX) stężeniu 0,5IC<sub>50</sub> przez 72 godziny. Wyniki przedstawiono

jako średnia  $\pm$  SD z trzech niezależnych eksperymentów (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  względem kontroli, # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$  względem Doksorubicyny w stężeniu  $0,5IC_{50}$ ).



**Ryc. 7.32.** Zmiany aktywności kaspazy-3, -9 i -8 w komórkach linii HepG2 traktowanych glimepirydem, indometacyną lub benserazydem w stężeniu  $IC_{50}$  w kombinacji z doksorubicyną (DOX) stężeniu  $0,5IC_{50}$  przez 72 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  SD z trzech niezależnych eksperymentów (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  względem kontroli).

### 7.5.2. Zmiany wewnątrzkomórkowego poziomu $Ca^{2+}$ w komórkach linii Huh-7 i HepG2

Wapń jest kluczowym przekaźnikiem informacji w komórkach i nadzoruje wiele funkcji komórkowych, w tym proces śmierci komórki. Stężenie wapnia zmienia się w różnych obszarach komórkowych, a w cytoplazmie pozostaje na stosunkowo niskim poziomie, co zapewnia skuteczną sygnalizację wewnątrzkomórkową oraz ogranicza potencjalne efekty cytotoksyczne.

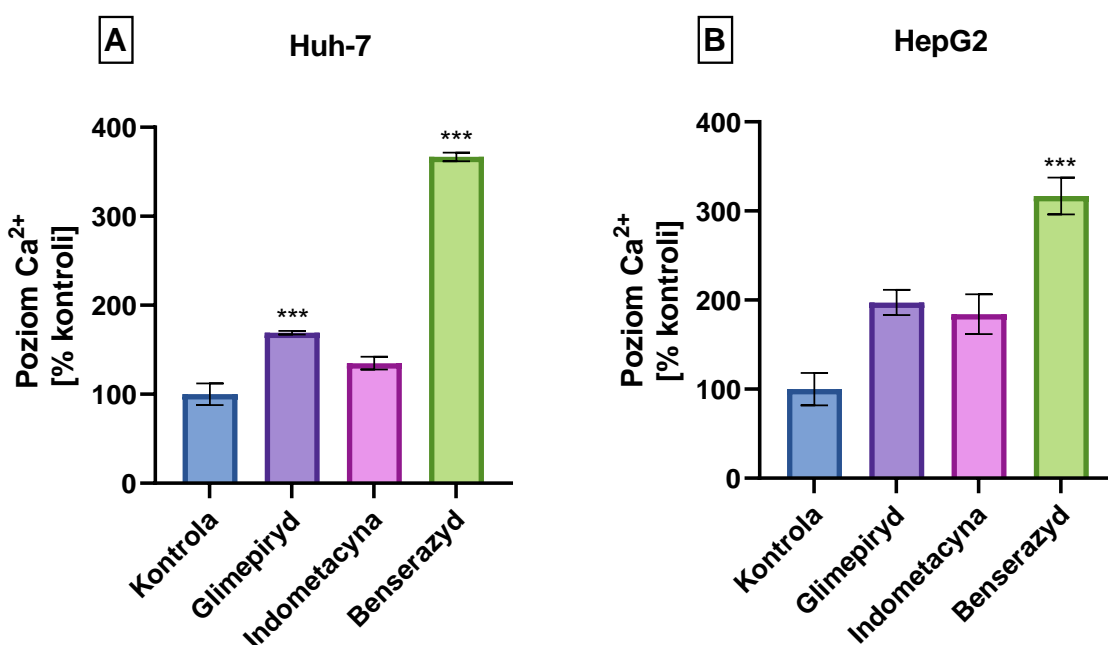
Przeprowadzono analizę zmian poziomu  $Ca^{2+}$  w komórkach linii Huh-7 i HepG2 traktowanych glimepirydem, indometacyną lub benserazydem samodzielnie lub w połączeniu



z doksorubicyną. Do pomiaru poziomu  $\text{Ca}^{2+}$  wykorzystano sondę fluorescencyjną Fluo-3-AM. Wyniki przedstawiono na rycinach 7.33-7.35.

### 7.5.2.1. Wpływ glimepirydu, indometacyny lub benserazydu na poziom wewnątrzkomórkowego $\text{Ca}^{2+}$

Wyniki przedstawione na Ryc. 31. wyraźnie pokazują, że badane związki zwiększały poziom wewnątrzkomórkowego wapnia w obu liniach komórkowych nowotworu wątroby. W linii komórkowej linii Huh-7, po inkubacji z badanymi związkami w stężeniach  $\text{IC}_{50}$ , najwyższy wzrost poziomu jonów wapnia obserwowano w komórkach traktowanych benserazydem (366,7%) (Ryc. 7.33.A). Podobnie w przypadku linii komórkowej linii HepG2, najwyższy poziom wapnia obserwowany był po potraktowaniu komórek benserazydem w stężeniu  $\text{IC}_{50}$  (316,93%) (Ryc. 7.33.B).

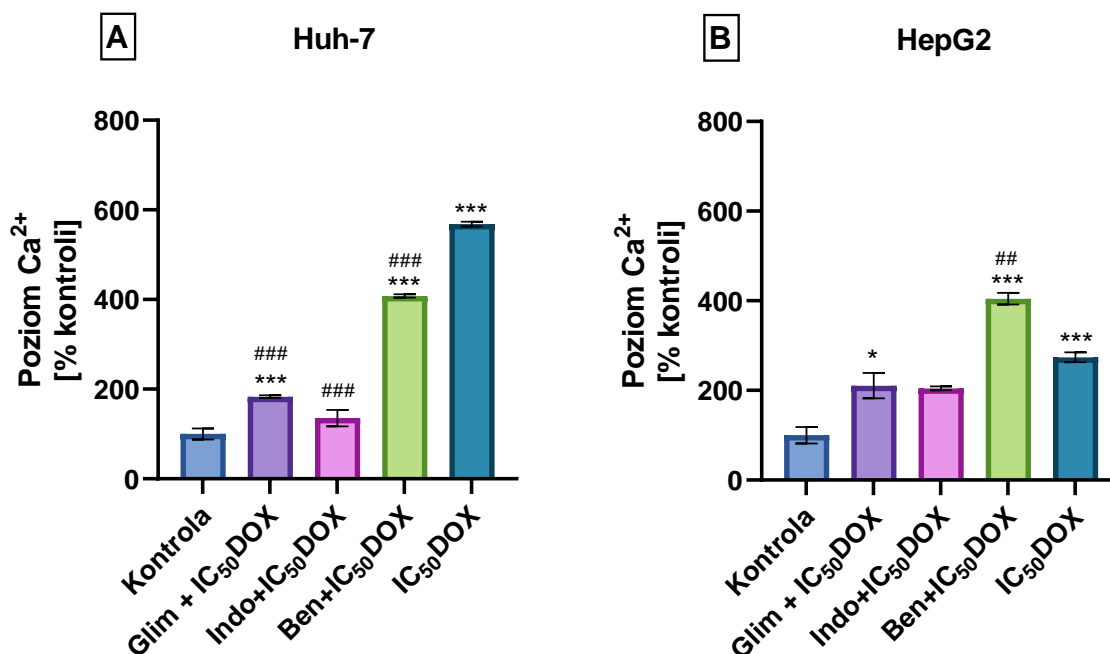


**Ryc. 7.33.** Wpływ glimepirydu, indometacyny i benserazydu w stężeniu  $\text{IC}_{50}$  na wewnątrzkomórkowy poziom  $\text{Ca}^{2+}$  w komórkach linii Huh-7 (A) i HepG2 (B). Komórki inkubowano ze związkami przez 72 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  SD z trzech niezależnych eksperymentów (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  względem kontroli).

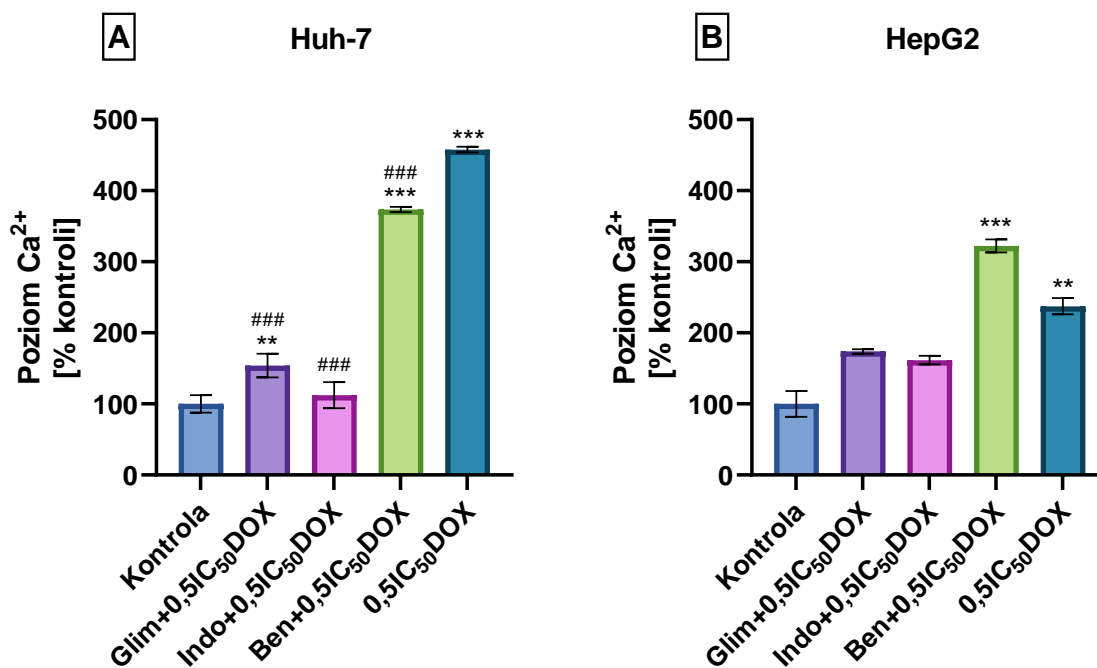
### 7.5.2.2. Wpływ glimepirydu, indometacyny lub benserazydu w połączeniu z doksorubicyną na poziom wewnątrzkomórkowego $\text{Ca}^{2+}$

Po 72-godzinnej inkubacji zaobserwowano wzrost poziomu wapnia w obu liniach komórkowych, które były traktowane kombinacją glimepirydu, indometacyny lub benserazydu z doksorubicyną o stężeniu  $\text{IC}_{50}$  i  $0,5\text{IC}_{50}$ .

Największy wzrost poziomu  $\text{Ca}^{2+}$  zanotowano w przypadku benserazydu w połączeniu z doksorubicyną w stężeniu  $\text{IC}_{50}$ , co spowodowało wzrost o 407,91% w komórkach linii Huh-7 (Ryc. 7.34.A) i 404,46% w komórkach linii HepG2 (Ryc. 7.34.B.). To połączenie spowodowało podobnie znaczący wzrost poziomu wapnia przy stężeniu  $0,5\text{IC}_{50}$  doksorubicyny, co skutkowało wzrostem o 373,63% w komórkach linii Huh-7 (Ryc. 7.35.A.) i 322,2% w komórkach linii HepG2 (Ryc. 7.35.B.).



**Ryc. 7.34.** Wpływ glimepirydu (Glim), indometacyny (Indo) i benserazydu (Ben) w stężeniu  $\text{IC}_{50}$  w kombinacji z doksorubicyną (DOX) stężeniu  $\text{IC}_{50}$  na wewnątrzkomórkowy poziom  $\text{Ca}^{2+}$  w komórkach linii Huh-7 (A) i HepG2 (B). Komórki inkubowano ze związkami przez 72 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  SD z trzech niezależnych eksperymentów (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  względem kontroli, ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$  względem doksorubicyny w stężeniu  $\text{IC}_{50}$ ).



**Ryc. 7.35.** Wpływ glimepirydu (Glim), indometacyny (Indo) i benserazydu (Ben) w stężeniu IC<sub>50</sub> w kombinacji z doksorubicyną (DOX) stężeniu 0,5IC<sub>50</sub> na wewnątrzkomórkowy poziom Ca<sup>2+</sup> w komórkach linii Huh-7 (A) i HepG2 (B). Komórki inkubowano ze związkami przez 72 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnia ± SD z trzech niezależnych eksperymentów (\*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 względem kontroli, ###p < 0,001 względem doksorubicyny w stężeniu 0,5IC<sub>50</sub>).

### 7.5.3. Analiza faz cyklu komórkowego

W celu dokładniejszego scharakteryzowania działania badanych związków, przeprowadzono analizę cyklu komórkowego. Profile rozkładu faz cyklu komórkowego dla linii komórkowych HepG2 i Huh-7, traktowanych związkami przedstawiono w tabeli 5 oraz tabeli 6. Komórki inkubowano przez 72 godziny, po tym czasie wykonywano pomiar rozkładu faz cyklu komórkowego.

#### 7.5.3.1. Wpływ glimepirydu, indometacyny lub benserazydu na rozkład faz cyklu komórkowego

Wyniki analizy cytometrycznej cyklu komórkowego wskazują, że badane związki (glimepiryd, indometacyna i benserazyd) wywołują wzrost odsetka komórek w populacji subG1 w komórkach linii HepG2 i Huh-7 (Tabela 5).

W komórkach HepG2 i Huh-7 inkubowanych z glimepirydem, benserazydem lub indometacyną zaobserwowano zaburzenia przebiegu cyklu komórkowego, co przejawiało się wzrostem odsetka komórek w fazie subG1. Najwyższy odsetek komórek w fazie subG1 (komórki apoptotyczne) obserwowano w komórkach linii HepG2 po inkubacji z glimepirydem w stężeniu  $IC_{50}$ , który wyniósł 40,13%. W komórkach HepG2 po zastosowaniu glimepirydu, benserazydu lub indometacyny nie obserwowano wzrostu odsetka komórek w fazie S oraz fazie G2/M (Tabela 5B). Natomiast w komórkach linii Huh-7, najwyższy wzrost komórek w fazie subG1 (8,85%) zaobserwowano po zastosowaniu benserazydu. Po zastosowaniu indometacyny zaobserwowano istotnie wyższy odsetek komórek Huh-7 w fazie S (10,29%) oraz fazie G2/M (13,33%) (Tabela 5A).

**Tabela 5.** Analiza rozkładu faz cyklu komórkowego w komórkach linii Huh-7 (A) oraz linii HepG2 (B) po inkubacji ze stężeniem IC<sub>50</sub> badanych związków. Komórki utrwalano i barwiono jodkiem propidyny. Wyniki przedstawiono jako średnia ± SD z trzech niezależnych eksperymentów. Poziom istotności statystycznej oznaczono gwiazdkami (\*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 względem kontroli) lub skrótem "ns" dla różnic nieistotnych statystycznie.

(A) Huh-7

Związek	subG1		G1		S		G2/M	
	$\bar{x} \pm SD$	Poziom istotności statystycznej	$\bar{x} \pm SD$	Poziom istotności statystycznej	$\bar{x} \pm SD$	Poziom istotności statystycznej	$\bar{x} \pm SD$	Poziom istotności statystycznej
Kontrola	0,58 ± 0,5	-	82,6 ± 1,91	-	5,55 ± 0,51	-	10,15 ± 0,27	-
Glimepiryd	5,83 ± 0,44	***	84,53 ± 2,57	***	3,01 ± 0,41	ns	5,72 ± 1,25	***
Indometacyna	8,71 ± 0,11	***	65,1 ± 3,48	***	10,29 ± 1,52	*	13,33 ± 0,51	*
Benserazyd	8,85 ± 1,09	***	77,7 ± 2,13	***	3,38 ± 0,51	ns	8,71 ± 0,11	ns

(B) HepG2

Związek	subG1		G1		S		G2/M	
	$\bar{x} \pm SD$	Poziom istotności statystycznej	$\bar{x} \pm SD$	Poziom istotności statystycznej	$\bar{x} \pm SD$	Poziom istotności statystycznej	$\bar{x} \pm SD$	Poziom istotności statystycznej
Kontrola	1,29 ± 0,35	-	72,53 ± 2,82	-	10,11 ± 0,41	-	15,53 ± 3,47	-
Glimepiryd	40,13 ± 6,13	***	46,1 ± 3,47	***	8,76 ± 4,67	ns	4,22 ± 1,89	***
Indometacyna	30,63 ± 6,36	***	58,43 ± 4,77	***	2,5 ± 0,86	**	7,91 ± 1,16	**
Benserazyd	31,1 ± 4,96	***	44,1 ± 2,6	***	8,41 ± 0,5	ns	14,47 ± 1,22	ns

### **7.5.3.2. Wpływ glimepirydu, indometacyny lub benserazydu w połączeniu z doksorubicyną na rozkład faz cyklu komórkowego**

Po 72 godzinach inkubacji obserwowano wzrost odsetka komórek w populacji subG1 w obu liniach komórkowych po traktowaniu kombinacją glimepirydu, indometacyny lub benserazydu z doksorubicyną o stężeniu  $IC_{50}$ .

Największy wzrost zaobserwowano w przypadku glimepirydu w połączeniu z doksorubicyną o stężeniu  $IC_{50}$ , co skutkowało wzrostem do około 30,47% w komórkach linii Huh-7 (Tabela 6A) i 69,55% w komórkach linii HepG2 (Tabela 6B).

Zastosowanie połączenia indometacyny lub benserazydu z doksorubicyną również skutkowało wzrostem populacji komórek w fazie subG1. Dla linii komórkowej Huh-7, połączenie indometacyny z doksorubicyną wywołało wzrost do około 15,7%, a połączenie benserazydu z doksorubicyną spowodowało wzrost do około 19% (Tabela 6A). Natomiast dla linii komórkowej HepG2, indometacyna w kombinacji z doksorubicyną wywołała wzrost do 54,8%, a benserazyd w połączeniu z doksorubicyną do około 50,2% (Tabela 6B). W obu liniach komórkowych po zastosowaniu połączenia benserazydu z doksorubicyną obserwowany był wzrost odsetka komórek w fazie G2/M odpowiednio do około 11,8% i 17,23% odpowiednio dla linii komórkowej Huh-7 i HepG2 w porównaniu do kontroli (Tabela 6).

**Tabela 6.** Analiza rozkładu faz cyklu komórkowego w komórkach linii Huh-7 (A) oraz linii HepG2 (B) po inkubacji ze stężeniem IC<sub>50</sub> badanych związków w kombinacji z doksorubicyną w stężeniu IC<sub>50</sub> lub 0,5IC<sub>50</sub>. Komórki utrwalano i barwiono jodkiem propidyny. Wyniki przedstawiono jako średnia ± SD z trzech niezależnych eksperymentów. Poziom istotności statystycznej oznaczono gwiazdkami (\*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 względem kontroli, #p < 0,05, ##p < 0,01, ###p < 0,001 względem doksorubicyny w stężeniu IC<sub>50</sub> lub 0,5IC<sub>50</sub>) lub skrótem "ns" dla różnic nieistotnych statystycznie.

(A) Huh-7

Związek	subG1		G1		S		G2/M	
	$\bar{x} \pm SD$	Poziom istotności statystycznej	$\bar{x} \pm SD$	Poziom istotności statystycznej	$\bar{x} \pm SD$	Poziom istotności statystycznej	$\bar{x} \pm SD$	Poziom istotności statystycznej
<b>Kontrola</b>	0,58 ± 0,5	-	82,6 ± 1,91	-	5,55 ± 0,51	-	10,15 ± 0,27	-
<b>Glimepiryd + DOX</b>	30,47 ± 5,15	*** ns	51,53 ± 3,46	*** ns	8,82 ± 0,56	ns ns	6,21 ± 0,26	** ###
<b>Indometacyna + DOX</b>	15,7 ± 1,39	*** ##	64,7 ± 2,61	*** ns	9,07 ± 0,91	ns ns	9,84 ± 0,73	ns #
<b>Benserazyd + DOX</b>	19 ± 0,67	*** ns	60,53 ± 1,14	*** ns	7,81 ± 1,23	ns ns	11,8 ± 1,23	ns ###
<b>DOX</b>	19,33 ± 4	***	58,47 ± 4,33	***	7,37 ± 3,63	ns	14,57 ± 1,86	***

(B) HepG2

	subG1	G1	S	G2/M
--	-------	----	---	------

Związek	$\bar{x} \pm SD$	Poziom istotności statystycznej		$\bar{x} \pm SD$	Poziom istotności statystycznej		$\bar{x} \pm SD$	Poziom istotności statystycznej		$\bar{x} \pm SD$	Poziom istotności statystycznej	
<b>Kontrola</b>	1,29 ± 0,35	-		72,53 ± 2,82	-		10,11 ± 0,41	-		15,53 ± 3,47	-	
<b>Glimepiryd + DOX</b>	69,55 ± 2,76	***	###	18 ± 1,01	***	ns	3,59 ± 0,57	*	ns	8,02 ± 1,19	**	###
<b>Indometacyna + DOX</b>	54,8 ± 2,26	***	ns	29,17 ± 3,23	***	###	6,88 ± 2,23	ns	ns	5,98 ± 0,92	***	###
<b>Benserazyd + DOX</b>	50,2 ± 2,36	***	ns	19,37 ± 0,8	***	ns	7,21 ± 0,5	ns	ns	17,23 ± 1,16	ns	###
<b>DOX</b>	44,77 ± 1,11	***		14,13 ± 0,38	***		1,99 ± 0,031	**		31,2 ± 1,91	***	



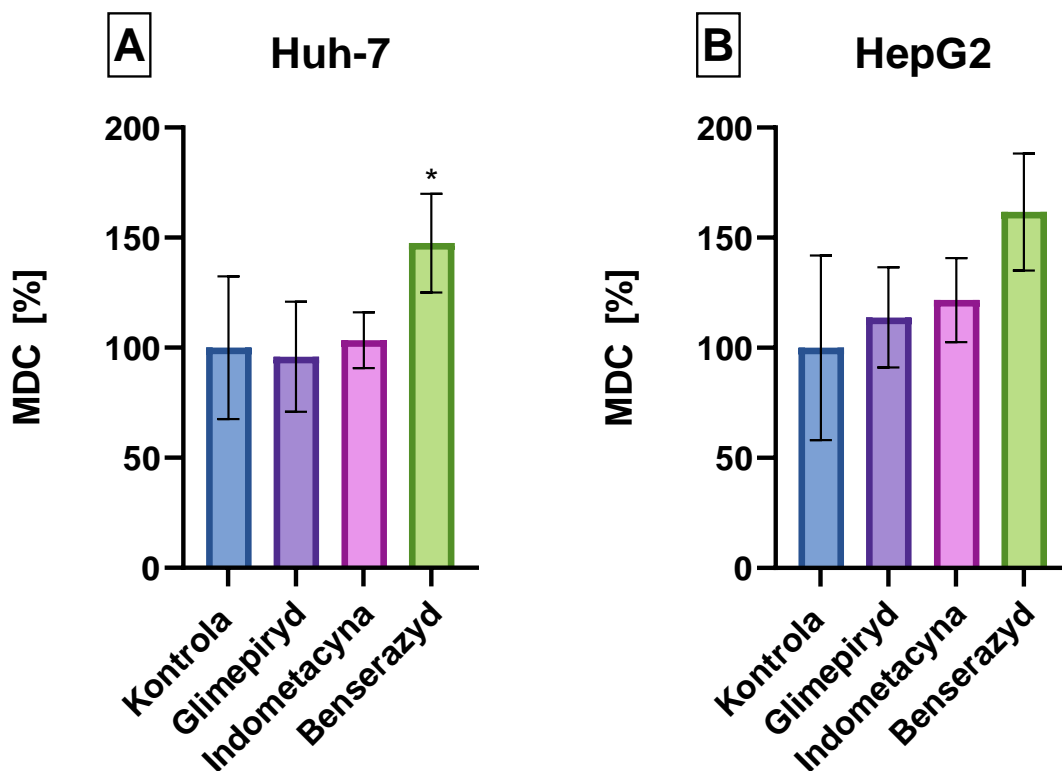
#### **7.5.4. Analiza procesu autofagii**

Autofagia odnosi się do procesu zamykania organelli, białek i lipidów w dwumembranowych pęcherzykach wewnątrz komórki (autofagosomach), których zawartość jest następnie dostarczana do lizosomu w celu degradacji. W przeciwieństwie do nekrozy i apoptozy, autofagia jest przede wszystkim mechanizmem przetrwania, który reguluje jakość i ilość wewnątrzkomórkowych białek i organelli.

W celu oceny zdolności do indukcji procesu autofagii przez glimepiryd, indometacynę i benserazyd oraz ich kombinacji z doksorubicyną w komórkach linii Huh-7 i HepG2 wykorzystano technikę barwienia monodansylokadaweryną (MDC). Monodansylokadaweryna jest związkiem fluorescencyjnym dzięki reszcie dansylowej sprzężonej z kadaweryną i gromadzi się w kwaśnych autofagosomach. Wyniki przedstawiono na rycinach 7.36-7.39.

##### **7.5.4.1. Indukcja procesu autofagii przez glimepiryd, indometacynę lub benserazyd w komórkach linii Huh-7 i HepG2**

Wyniki przedstawione na rycinie 7.36. wskazują, że związki mają zdolność indukowania procesu autofagii w komórkach linii HepG2. Największy wzrost odsetka intensywności procesu autofagii zaobserwowano po zastosowaniu benserazydu (Huh-7 - 147,5%; HepG2 - 161,71%). Jednakże, nie stwierdzono zmian istotnych statystycznie po zastosowaniu glimepirydu i indometacyny w komórkach linii Huh-7 (Ryc. 7.36.A.). W przypadku komórek linii HepG2, zastosowanie wszystkich trzech inhibitorów HKII nie wykazało istotnych statystycznie zmian (Ryc. 7.36.B.).

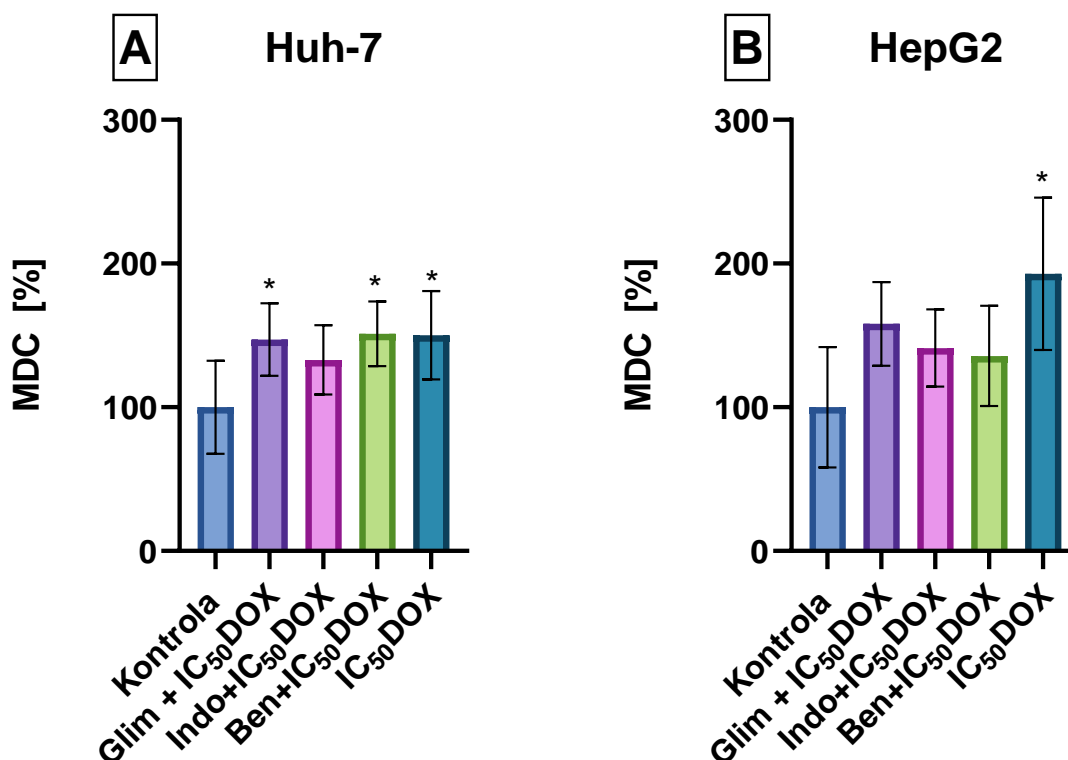


**Ryc. 7.36.** Zawartość MDC w komórkach linii Huh-7 (A) i HepG2 (B) traktowanych glimepirydem, indometacyną lub benserazydem w stężeniu  $IC_{50}$ . Komórki inkubowano ze związkami przez 72 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  SD z trzech niezależnych eksperymentów (\* $p < 0,05$  względem kontroli).

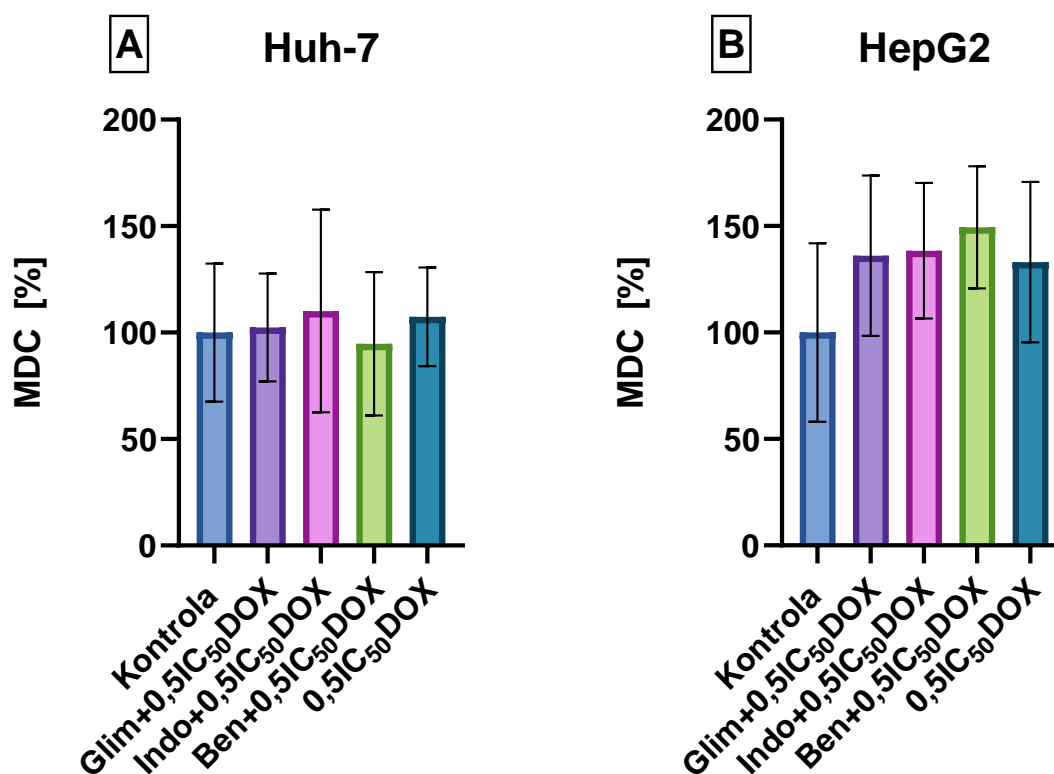
#### 7.5.4.2. Indukcja procesu autofagii przez glimepiryd, indometacynę lub benserazyd w kombinacji z doksorubicyną w komórkach linii Huh-7 i HepG2

Zaobserwowano istotny wzrost intensywności fluorescencji monodansylokadaweryny w komórkach linii Huh-7 po zastosowaniu kombinacji glimepirydu (147,23%) lub benserazydu (151,17%) z doksorubicyną w stężeniu  $IC_{50}$  (Ryc. 7.37.A.). Jednakże, kombinacja doksorubicyny w stężeniu  $IC_{50}$  z badanymi związkami (glimepiryd, indometacyna lub benserazyd) nie powodowała istotnych zmian w komórkach linii HepG2 (Ryc. 7.37.B.).

Wyniki przedstawione na rycinie 7.38B. wskazują, że kombinacja glimepirydu (147,23%) lub benserazydu (151,17%) z doksorubicyną w stężeniu  $0,5IC_{50}$  jest zdolna do indukowania procesu autofagii w komórkach linii HepG2. Warto jednak podkreślić, że otrzymane wyniki z oceny procesu autofagii w komórkach linii Huh-7 i linii HepG2 nie są istotne statystycznie (Ryc. 7.38.).



**Ryc. 7.37.** Zawartość MDC w komórkach linii Huh-7 (A) i HepG2 (B) traktowanych glimepirydem (Glim), indometacyną (Indo) i benserazydem (Ben) w stężeniu  $IC_{50}$  w kombinacji z doksorubicyną (DOX) stężeniu  $IC_{50}$ . Komórki inkubowano ze związkami przez 72 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnia  $\pm$  SD z trzech niezależnych eksperymentów (\* $p < 0,05$  względem kontroli).



**Ryc. 7.38.** Zawartość MDC w komórkach linii Huh-7 (A) i HepG2 (B) traktowanych glimepirydem (Glim), indometacyną (Indo) i benserazydem (Ben) w stężeniu IC<sub>50</sub> w kombinacji z doksorubicyną (DOX) stężeniu 0,5IC<sub>50</sub>. Komórki inkubowano ze związkami przez 72 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnia ± SD z trzech niezależnych eksperymentów (\*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 względem kontroli, #p < 0,05, ##p < 0,01, ###p < 0,001 względem doksorubicyny w stężeniu 0,5IC<sub>50</sub>).

## 8. Dyskusja

Wiele lat temu, wraz z odkryciem dodatkowych cech nowotworu (przeprogramowanie metabolizmu energetycznego), terapia przeciwnowotworowa wkroczyła w nową erę. Ze względu na fundamentalne różnice metaboliczne między komórkami prawidłowymi i nowotworowymi celowanie w zmodyfikowany metabolizm komórek zaczęto uznawać za potencjalny sposób osiągnięcia selektywności terapeutycznej (Darvin i in. 2018). Jednak postępy terapeutyczne w zakresie metabolizmu są znacznie skromniejsze, częściowo ze względu na niuanse w rozszyfrowaniu złożonych i wzajemnie powiązanych szlaków metabolicznych. Co więcej, dynamiczny metaboliczny kontakt pomiędzy komórkami nowotworowymi, a mikrośrodowiskiem guza, czy też z układem odpornościowym, dodaje kolejne warstwy złożoności do modulowania metabolizmu (Jung i Le 2021, Wang i in. 2022). Niemniej jednak, poczyniono znaczne postępy w kierunku klinicznego zastosowania modulatorów metabolizmu, co można przypisać ogromnym wysiłkom naukowców, których celem jest poznanie złożoności metabolizmu nowotworów i identyfikacji związków o korzystnych profilach farmakokinetycznych (Li i in. 2020).

W prawdzie w badaniach przedklinicznych wykazano skuteczność leków ukierunkowanych na enzymy metabolizmu glukozy, ale ich kliniczne przełożenie pozostaje jak dotąd ograniczone. Ogólnie rzecz biorąc, istnieją trzy główne ograniczenia w rozwoju terapii ukierunkowanych na enzymy metabolizmu glukozy (Zhou i in. 2022). Po pierwsze, kluczowym wyzwaniem w opracowywaniu drobnocząsteczkowych inhibitorów jest fakt, że większość enzymów metabolizmu glukozy występuje w wielu izoformach, a struktury różnych izoform są bardzo podobne (Granchi i in. 2013, Liu i in. 2022). Niska selektywność leków prowadzi do wystąpienia działań niepożądanych. Ponadto, związki te mogą powodować kompensacyjną aktywację innych izoform w guzie, zmniejszając tym samym skuteczność tych środków (Fulda i in. 2010, Zhang i in. 2022).

Chociaż rozwój inhibitorów metabolizmu był/jest pełen wyzwań i rozczarowań, w ostatnim czasie udało się osiągnąć znaczny postęp, tym bardziej, że odkryto skuteczne kombinacje leków. Połączenie tych inhibitorów z innymi lekami przeciwnowotworowymi może wykazać wzmocnione działanie przeciwnowotworowe. Coraz więcej dowodów wskazuje, że glikoliza tlenowa nie tylko promuje proliferację komórek nowotworowych, ale jest również związana z opornością na chemioterapię (Woo i in. 2015). Dlatego leki ukierunkowane na glikolizę mogą stanowić wartościowe uzupełnienie chemioterapii. Wydaje się, że mechanizm, w którym to następuje, polega na tym, że inhibitory glikolizy pozbawiają komórki nowotworowe dopływu energii, zmniejszając tym samym oporność komórek nowotworowych na chemioterapeutyki. Chociaż żaden pojedynczy modulator metabolizmu glukozy nie jest obecnie stosowany jako schemat leczenia pierwszego rzutu, to połączenie modulatorów metabolizmu glukozy z konwencjonalnymi lekami przeciwnowotworowymi może stać się obiecującą strategią leczenia nowotworów (Akins i in. 2018, Chelakkot i in. 2023).

Niniejsze badania miały na celu identyfikację potencjalnych inhibitorów heksokinazy II (HKII) - kluczowego enzymu w szlaku glikolitycznym, który ulega nadekspresji w wielu typach nowotworów. Za pomocą badań *in silico*, wybrano grupę związków o właściwościach hamujących aktywność HKII i oceniono ich aktywność biologiczną w warunkach *in vitro*.

Zespół BioHPC z Katolickiego Uniwersytetu San Antonio UCAM w Murcii przeprowadził badania komputerowe (*in silico*), które umożliwiły wyodrębnienie najbardziej obiecujących substancji, jako potencjalnych inhibitorów HKII do dalszych badań biologicznych. Wybrane związki zostały następnie zsyntetyzowane oraz udostępnione przez zespół z Politechniki Śląskiej w Gliwicach.

W pierwszym etapie przeprowadzono badania przesiewowe mające na celu określenie zdolności wybranych substancji do inhibicji HKII na czystym enzymie (warunki *in solution*), wraz z równoległą analizą związków opisywanych przez literaturę jako inhibitory HKII (2-deoksyglukoza, 3-bromopirogronian, metformina) (Meng i in. 2022, Rai i in. 2019, Repas i in. 2022). Przebadano 16 związków będącymi potencjalnymi inhibitorami HKII, z których wyłoniono 3 substancje - glimepiryd, indometacynę i benserazyd - które poddawano dalszym analizom. Ogromnym atutem badanych związków jest fakt, że są stosowanymi klinicznie lekami:

- BENSERAZYD w połączeniu z L-DOPA jest lekiem stosowanymi w leczeniu choroby Parkinsona.
- INDOMETACYNA jest niesteroidowym lekiem przeciwzapalnym,
- GLIMEPIRYD jest lekiem przeciwcukrzycowym.

Aktywność biologiczną badanych związków oceniano w wielu obszarach, obejmujących ich zdolność do hamowania aktywności HKII zarówno w komórce (*in vitro*), jak i w roztworze (*in solution*), cytotoksyczność, wpływ na cytotoksyczność leków przeciwnowotworowych (doksorubicyny) oraz zdolność do indukowania stresu oksydacyjnego i śmierci komórki.

W trakcie badań nad potencjalnymi inhibitorami HKII napotkano jednak wiele trudności, w tym problem tworzenia przez nie agregatów. Agregaty te składają się z wielu małych cząsteczek w roztworze wodnym i są problemem dla badaczy zajmujących się opracowywaniem leków. Koloidy o rozmiarach od 50 do 500 nm tworzą się spontanicznie i w sposób odwracalny w buforze, co jest regulowane przez krytyczne stężenie agregacji (CAC). Po utworzeniu koloidu, białka adsorbują się na jego powierzchni, co powoduje częściową denaturację i niespecyficzną inhibicję (McGovern i in. 2003).

Wykazano, że zjawisko tworzenia koloidów jest głównym źródłem wyników fałszywie pozytywnych w badaniach przesiewowych i testach wirtualnych. Ponadto, tworzenie agregatów nie jest ograniczone do badanych cząsteczek, ale jest wspólną cechą wielu cząsteczek organicznych, odczynników, a nawet zatwierdzonych leków.

Tworzenie się agregatów przez potencjalne inhibitory może nie tylko ograniczać ich skuteczność, ale także prowadzić do błędnej interpretacji wyników w układach biologicznych. W szczególności, inhibitory małowcząsteczkowe ulegając agregacji, mogą zakłócać badania aktywności enzymów poprzez niespecyficzne hamowanie aktywności enzymów lub powodowanie sztucznej inhibicji z powodu tworzenia się agregatów enzymów z inhibitorami (Owen i in. 2012).

Aby rozwiązać ten problem, podjęto próby zidentyfikowania odpowiedniego rozpuszczalnika, który nie tylko zapobiegnie tworzeniu się agregatów, ale również nie będzie szkodliwy dla komórek. Dzięki badaniom przeprowadzonym przez Owensa i jego zespół (2012), ustalono, że DMSO w stężeniu 0,1% oraz Tween-80 w stężeniu 0,025% jako rozpuszczalniki nie powodują tworzenia się agregatów, a także nie wykazują toksyczności dla wybranych linii komórkowych (Owen i in. 2012). W związku z powyższym rozpuszczalniki te zostały wykorzystane w dalszych badaniach do oceny potencjalnych inhibitorów HKII.

W warunkach laboratoryjnych i w badaniach przesiewowych roztwory leków są przygotowywane głównie w DMSO, który jest postrzegany jako "uniwersalny rozpuszczalnik" zdolny do rozpuszczania większości małych cząsteczek w wysokich stężeniach (nawet do 100 mM). DMSO zawiera atom siarki, co pozwala mu na koordynację z kompleksami platyny, wypierając ligandy i zmieniając strukturę kompleksów. Jednakże, kolejnym wyzwaniem napotykanym w trakcie badań jest fakt, że zmiana struktury kompleksów może spowodować ich niestabilność w DMSO, co z kolei wpływa na ich aktywność biologiczną.

Massart i inni (1993) po raz pierwszy donieśli, że DMSO zmniejsza cytotoksyczność cisplatyny wobec hodowanych tyreocytów. Niemniej jednak, cisplatyna i inne kompleksy platyny są często rozpuszczane w DMSO w doświadczeniach biologicznych, a nawet roztwory cisplatyny w DMSO były wykorzystywane w warunkach klinicznych (Massart i in. 1993). Takie postępowanie może wynikać z braku zrozumienia wpływu DMSO na aktywność kompleksów platyny w biologii nowotworów.



Zastosowanie DMSO z dodatkiem Tween-80 jako rozpuszczalnika wiązało się z pewnym mankamentem w badaniach nad potencjalnymi inhibitorami HKII, wprowadzając pewne ograniczenia i utrudniając weryfikację efektu synergistycznego między inhibitorami HKII a cisplatyną. Takie wyzwania są istotne w kontekście planowanego leku, który niestety nie został ostatecznie wprowadzony ze względu na fakt, że DMSO z dodatkiem Tween-80 może utrudniać interpretację wyników i być przyczyną braku jednoznacznych dowodów na synergistyczne działanie tych substancji. Świadczy to o tym jak kluczowy jest wybór odpowiedniego rozpuszczalnika w przypadku eksperymentów z udziałem kompleksów platyny.

W celu uzyskania bardziej kompleksowego obrazu wpływu glimepirydu, indometacyny i benserazydu na aktywność HKII przeprowadzono badania na enzymie wyizolowanym z komórek (Huh-7 i HepG2), jak i enzymie komercyjnym w warunkach *in solution*.

Według literatury, stężenie inhibitora, które wykazuje znaczące, choć niecałkowite, hamowanie aktywności enzymu, zazwyczaj występuje w zakresie stężeń mikromolarnych, a  $IC_{50}$  (stężenie inhibitora, które wywołuje połowiczne działanie hamujące na daną strukturę biologiczną) oscyluje około 10  $\mu M$  (Aljamal i Badawneh 2017). Wyniki otrzymane w niniejszej pracy wykazały, że glimepiryd, indometacyna i benserazyd hamują aktywność heksokinazy II w warunkach *in solution* oraz w komórce.

Chociaż działanie hamujące glimepirydu na HKII nie było wcześniej opisywane, wyniki tych badań pokazują, że dochodzi do zahamowania aktywności enzymu zarówno w roztworze, jak i w komórkach.

Badania nad inhibicją enzymu w roztworze i w komórkach, wykazały, że indometacyna hamuje aktywność heksokinazy II (HKII). Jednak badania przeprowadzone przez Aljamala i Badawneh (2017) wykazały, że indometacyna wiąże się również z heksokinazą I (HKI), inną izoformą heksokinazy, która ulega ekspresji między innymi w erytrocytach. Autorzy donieśli, że indometacyna zmniejszyła aktywność HKI o 15% w erytrocytach (Aljamal i Badawneh 2017). Sugeruje to, że indometacyna może mieć niską selektywność względem heksokinazy II.

Benserazyd jest związkiem, który w ostatnim czasie opisany został jako potencjalny inhibitor heksokinazy II (HKII), kluczowego enzymu w glikolizie. Li i in. (2017) podali, że benserazyd hamował HKII o 50% w stężeniu 5,52  $\mu\text{M}$ , ale Zhou i in. (2020) wykazali, że benserazyd wiąże się bezpośrednio z kinazą pirogronianową M2 (PKM2), innym enzymem glikolitycznym i zmniejsza jej aktywność, hamując w ten sposób wzrost komórek czerniaka (Li i in. 2017, Zhou i in. 2020). W niniejszej pracy wykazano, że benserazyd hamuje zarówno aktywność HKII w komórkach nowotworu wątrobowokomórkowego Huh-7 i HepG2, jak i aktywność enzymu HKII w roztworze. Jednakże dane literaturowe sugerują, że benserazyd może mieć również powinowactwo do innych białek, co może wpływać na wyniki uzyskane w badaniach.

Biorąc pod uwagę kluczową rolę HKII w metabolizmie i apoptozie komórek nowotworowych, można przypuszczać, że połączenie inhibitora HKII z istniejącymi chemioterapeutykami może zwiększyć wrażliwość tych komórek. W celu oceny cytotoksyczności badanych związków oraz ich kombinacji z dokсорubicyną i doboru odpowiednich stężeń do dalszej analizy, przeprowadzono test przeżywalności MTT.

W badaniu przeprowadzonym na komórkach linii Huh-7 i HepG2 zbadano właściwości cytotoksyczne glimepirydu, indometacyny i benserazydu oraz ich wpływ na cytotoksyczność dokсорubicyny. Wyniki wykazały, że wszystkie trzy związki zmniejszyły liczbę żywych komórek. Glimepiryd sklasyfikowany jako sulfonilomocznik trzeciej generacji, jest doustnym lekiem przeciwcukrzycowym stosowanym w leczeniu cukrzycy typu 2 (Basit i in. 2012). Wpływ glimepirydu na nowotwory jest kontrowersyjny. Badania wykazały, że glimepiryd nie zwiększa ogólnego ryzyka zachorowania na raka, podczas gdy niektóre badania wskazywały, że glimepiryd zwiększa ryzyko zachorowania na raka jelita grubego i raka wątrobowokomórkowego u pacjentów z cukrzycą typu 2 (Chang i in. 2012, Shin i in. 2020). Badania przeprowadzone przez Zhan i zespół (2022) pokazują, że monoterapia glimepirydem powoduje zwiększenie liczby cytotoksycznych limfocytów T i hamuje wzrost guza okrężnicy. Jednakże glimepiryd zmniejsza efekt terapeutyczny inhibitora immunologicznego punktu kontrolnego anty-PD1 na wzrost guza CT26. Monoterapia glimepirydem lub anty-PD1 nie wykazywała wpływu na wzrost czerniaka, podczas gdy w przypadku raka jelita grubego jest inaczej. Jednak połączenie glimepirydu

i anty-PD1 znacząco ograniczało wzrost czerniaka. Wyniki te wskazują, że wpływ glimepirydu na poszczególne nowotwory jest zróżnicowany (Zhan i in. 2022). Natomiast w mysim modelu glejaka wielopostaciowego (GBM) połączenie radioterapii i glimepirydu znacząco zmniejszyło wzrost GBM i poprawiło przeżywalność w ortotopowym mysim modelu ksenoprzeszczepu GBM (Kang i in. 2021).

W niniejszej pracy przeprowadzono wstępne badania efektów i mechanizmów działania glimepirydu na komórki nowotworu wątroby. Wyniki eksperymentów *in vitro* wykazały, że glimepiryd hamował proliferację linii komórkowych nowotworu wątroby (Huh-7 i HepG2). Ponadto, zaobserwowano wyraźny efekt synergistyczny, gdy glimepiryd połączono z doksorubicyną w obu liniach komórkowych.

W przypadku połączenia indometacyny lub benserazydu z doksorubicyną, nie stwierdzono zwiększenia cytotoksyczności antracykliny w komórkach HepG2. Jednak badania przeprowadzone przez Ye i wsp. wykazały, że indometacyna może uwrażliwiać komórki ludzkiego raka wątrobowokomórkowego HepG2 na doksorubicynę poprzez znaczne zwiększenie wewnątrzkomórkowej akumulacji i retencji doksorubicyny (Ye i in. 2011). Z kolei wahania pomiędzy działaniem antagonistycznym i synergistycznym obserwowano w linii komórkowej Huh-7, gdy benserazyd był stosowany z doksorubicyną.

Powszechnie uważa się, że toksyczność doksorubicyny jest skorelowana ze zdolnością tego związku do generowania reaktywnych form tlenu (RFT), które oddziałują z błonami komórkowymi, białkami i DNA (Kciuk i in. 2023). W komórkach nowotworowych zwiększony stres oksydacyjny stwarza większe zapotrzebowanie na czynniki redukujące i stymuluje metabolizm glukozy (Coleman i in. 2008). W rezultacie metabolizm glukozy jest ściśle związany z obroną antyoksydacyjną. Jest to zgodne z badaniami nad mechanizmem działania inhibitorów glikolizy, gdzie powszechnie obserwuje się stres oksydacyjny komórkach poddanych ich działaniu (Saed i in. 2011, Shutt i in. 2010).

W pracy wykorzystano sondy fluorescencyjne H<sub>2</sub>DCF-DA oraz DAF-FM w celu określenia wpływu glimepirydu, indometacyny bądź benserazydu oraz ich kombinacji z doksorubicyną na powstawanie RFT i RFA w komórkach.

Związki stosowane samodzielnie, jak i w połączeniu z doksorubicyną powodowały wzrost poziomu reaktywnych form tlenu oraz azotu. Wyniki badań wykazały, że interakcja pomiędzy doksorubicyną a glimepirydem, indometacyną bądź benserazydem nie jest prostym zsumowaniem stresu oksydacyjnego generowanego przez oba związki. Warty uwagi jest fakt, że kombinacja inhibitorów z doksorubicyną w stężeniu  $IC_{50}$  oraz  $0,5IC_{50}$  nie generowała wzrostu poziomu RFT i RFA w porównaniu z komórkami potraktowanymi jedynie samą doksorubicyną.

Heksokinaza II (HKII) może pełnić rolę białka księżycowego (podrozdział 1.4). Zgodnie z tą hipotezą, HKII może pełnić funkcje wykraczające poza fosforylację glukozy (Lu i Hunter 2018, Rodríguez-Saavedra i in. 2021). Poprzez bezpośrednie zużywanie mitochondrialnego ATP, HKII może zwiększać wydajność transportu elektronów poprzez kompleksy ETS i zmniejszać prawdopodobieństwo, że niesparowane elektrony będą reagować z tlenem macierzy mitochondrialnej w celu wytworzenia RFT (Da-Silva i in. 2004, Lopez-Lazaro 2008). Podwyższony stres oksydacyjny może zaburzyć potencjał błony mitochondrialnej i prawidłowe funkcjonowanie łańcucha transportu elektronów, co prowadzić może do zaburzenia metabolizmu energetycznego i apoptozy komórek (Nguyen i Pandey 2019, Perillo i in. 2020).

Do oceny całkowitej pojemności antyoksydacyjnej w komórkach Huh-7 i HepG2 wykorzystano metodę spektrofotometryczną z TPTZ opierającą się na szybkiej redukcji żelaza Fe(III) w kompleksie z TPTZ przez antyoksydanty obecne w badanym układzie, tworząc żelazo Fe(II)-TPTZ o niebieskim zabarwieniu (Amarowicz i Pegg 2019). Zaobserwowano złożone interakcje na poziomie równowagi oksydacyjno-redukcyjnej, które mogą być ściśle związane z zaburzeniami metabolizmu energetycznego. Wyniki badań wykazały, że komórki inkubowane z glimepirydem, indometacyną bądź benserazydem oraz ich kombinacją z doksorubicyną wykazywały obniżoną zdolność antyoksydacyjną w porównaniu z komórkami nie poddanymi działaniu tych związków. Największy spadek odnotowano po zastosowaniu samej doksorubicyny. Zmiany w wewnątrzkomórkowym stanie redoks komórek traktowanych glimepirydem, indometacyną bądź benserazydem oraz ich kombinacją z doksorubicyną były związane z uszczupleniem ich całkowitej pojemności antyoksydacyjnej.

Jednym z następstw prooksydacyjnego działania związków może być także zubożenie poziomu zredukowanego glutationu. Ten wewnątrzkomórkowy antyoksydant tiolowy odbudowuje uszkodzone cząsteczki poprzez donację wodoru, redukcję  $H_2O_2$  i nadtlenków lipidów oraz odgrywa ważną rolę w detoksykacji leków (Chennuru i Saleem 2013, Zatorska i in. 2003). W konsekwencji reszty tiolowe glutationu reagują z reaktywnymi formami tlenu, co prowadzi do spadku stężenia jego zredukowanej formy. Wiele badań potwierdza kluczową rolę GSH w regulacji ekspresji genów i apoptozy (Circu i Aw 2008, Musaogullari i in. 2020). Aktywność przeciwutleniająca była oceniana na podstawie poziomu zredukowanego glutationu (GSH). W komórkach Huh-7 i HepG2 traktowanych glimepirydem, indometacyną bądź benserazydem oraz ich kombinacją z doksorubicyną zaobserwowano spadek poziomu GSH. Przedstawione wyniki wskazywały, że komórki prawdopodobnie utraciły zdolność regeneracji glutationu i obrony antyoksydacyjnej.

Oprócz glukozy, glutamina jest kolejnym ważnym substratem energetycznym, stanowi istotne źródło węgla i azotu dla komórki oraz jest istotnie zaangażowana w syntezę GSH. Pośrednio może być również źródłem NADPH (Cluntun i in. 2017, Gong i in. 2022). Oprócz zwiększonego wykorzystania glukozy, zwiększone zużycie glutaminy jest drugą cechą charakterystyczną dla komórek nowotworowych. Z tego powodu wskazane byłoby zbadanie, jak intensywnie komórki wykorzystują glutaminę w warunkach upośledzonego metabolizmu glukozy i związanej z tym upośledzonej obrony antyoksydacyjnej (niski poziom GSH). Istnieje kilka sprzecznych doniesień na temat zdolności komórek nowotworowych do wykorzystania glutaminy przy jednoczesnym zahamowaniu metabolizmu glukozy (Fan i in. 2013, Wang i in. 2018, Zhang i in. 2017).

Mitochondria są ważnymi punktami kontrolnymi procesu apoptozy, ponieważ mogą uwalniać kofaktory kaspaz. W istocie, wewnątrzkomórkowy szlak apoptotyczny związany jest z dysfunkcją mitochondriów, w tym zmianą potencjału błony mitochondrialnej (MMP), zwiększoną produkcją reaktywnych form tlenu (RFT) i zmianą homeostazy mitochondrialnego  $Ca^{2+}$  (Fleury i in. 2002)

Nie ulega wątpliwości, że śmierć komórki należy do licznych funkcji komórkowych, na które  $\text{Ca}^{2+}$  wywiera złożoną rolę regulacyjną. Od dawna wiadomo, że w neuronach i innych typach komórek niekontrolowany wzrost stężenia cytozolowego  $\text{Ca}^{2+}$  może wywoływać apoptozę (Berridge i in. 2000, Demaurex i Distelhorst 2003, Rimessi i in. 2008). Warto zaznaczyć, że wzrost napływu jonów  $\text{Ca}^{2+}$  do mitochondriów może prowadzić do pęcznienia mitochondriów oraz przerwania lub pęknięcia błony zewnętrznej, co skutkuje uwolnieniem mitochondrialnych czynników apoptotycznych do cytozolu (Pinton i in. 2008).

Kolejnym celem prezentowanych badań było określenie wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia oraz zmiany potencjału błony mitochondrialnej. Badane w niniejszej pracy potencjalne inhibitory HKII oraz ich kombinacje z doksorubicyną powodowały spadek potencjału błony mitochondrialnej oraz wzrost poziomu jonów wapnia w komórkach Huh-7 i HepG2.

Uwolnienie do cytozolu mitochondrialnych czynników apoptotycznych, takich jak cytochrom c, odgrywa kluczową rolę w inicjacji procesu apoptozy. Zachodzi ono zazwyczaj po zależnym od wapnia pęcznieniu mitochondriów i permeabilizacji błony mitochondrialnej. Po uwolnieniu, cytochrom c uczestniczy w tworzeniu kompleksu białkowego znanego jako apoptosom. Apoptosom jest odpowiedzialny za aktywację nieaktywnej pro-kaspazy-9, przekształcając ją w aktywną kaspazę-9. Aktywowana kaspaza-9 z kolei, aktywuje pro-kaspazę-3, co prowadzi do aktywacji efektorowej kaspazy-3. Ta kaskada kaspaz prowadzi do fragmentacji kluczowych białek i ostatecznej śmierci komórki (Hussar 2022). Analizę aktywności proteaz cysteinowych (kaspaz) rozpoczęto od określenia poziomu aktywacji kaspaz: -8 i -9, zaangażowanych odpowiednio w zewnętrzną i wewnętrzną ścieżkę apoptozy. Uzyskane wyniki sugerują, że glimepiryd, indometacyna i benserazyd samodzielnie, jak również w połączeniu z doksorubicyną mogą indukować zależny od mitochondriów szlak apoptotyczny, który jest skorelowany z aktywacją kaspazy-9.

W przypadku glimepirydu Szymczak-Pajor wraz z zespołem wykazali, że związek ten zwiększał wewnątrzkomórkowy poziom wapnia oraz aktywność kaspazy-3 w komórkach raka trzustki 1.2B4 (Szymczak-Pajor i in. 2021). Badania, przeprowadzone przez Zhang i zespół (2000), sugerują, że indometacyna jest w stanie hamować proliferację komórek i indukować apoptozę w sposób zależny od stężenia i czasu, zarówno w pierwotnych komórkach przewlekłej białaczki szpikowej CML, jak i w komórkach ostrej białaczki szpikowej K562. Wyniki badań wskazują, że indometacyna obniżała ekspresję mRNA antyapoptotycznego białka Bcl-2. Dodatkowo, wyniki Western Blot potwierdziły, że indometacyna spowodowała obniżenie poziomu białka Bcl-2 (Zhang i in. 2000). Kolejne badanie wykazało, że apoptoza komórek CML indukowana przez indometacynę była związana z aktywacją kaspazy-3 lub kaspazy-8, przy jednoczesnym wzroście poziomu wewnątrzkomórkowego wapnia (Zhang i in. 2004).

Podczas gdy Li i zespół (2017) wykazali, korzystając z cytometrii przepływowej (analiza eksternalizacji fosfatydyloseryny), że benserazyd indukował proces apoptozy. Równocześnie, efekt indukowania apoptozy przez benserazyd został potwierdzony za pomocą analizy Western Blot, która wykazała zmianę poziomu białka Bcl-2 i Bax (Li i in. 2017).

W celu dokładniejszego zrozumienia molekularnych mechanizmów leżących u podstaw działania związków (glimepiryd, indometacyna i benserazyd) oraz ich kombinacji z doksorubicyną, przeprowadzono badania dotyczące zmian komórkowych związanych z zatrzymaniem cyklu komórkowego. Analiza cytometryczna rozkładu faz cyklu komórkowego wykazała, że stosowanie badanych związków (samodzielnie lub w połączeniu z doksorubicyną) spowodowało istotny wzrost frakcji komórek nowotworu wątroby Huh-7 i HepG2 w fazie subG1 cyklu komórkowego w porównaniu z komórkami kontrolnymi lub komórkami traktowanymi jedynie doksorubicyną, co wskazuje na indukcję zatrzymania cyklu komórkowego w subG1 przez te środki. W obu liniach komórkowych obserwowano również wzrost frakcji komórek w fazie G2/M po zastosowaniu połączenia benserazydu z doksorubicyną, natomiast jedynie zastosowania indometacyny samodzielnie obserwowano dodatkowo wzrost odsetka komórek w fazie S oraz fazie G2/M.

Wykazano, że niesteroidowe leki przeciwzapalne, takie jak indometacyna, hamują proliferację i indukują apoptozę w ludzkich komórkach nowotworu jelita grubego. Badania Xu i Zhanga wykazały, że indometacyna hamuje proliferację komórek nowotworu jelita grubego poprzez zwiększenie stosunku komórek w fazie G0/G1, co prowadziło do apoptozy (Xu i Zhang 2005). Nagromadzenie komórek w fazie G0/G1 sugeruje, że uległy one apoptotycznej śmierci komórkowej przed replikacją DNA, opóźniając progresję z fazy G1 do fazy S.

Stwierdzono, że wiele związków cytotoksycznych odgrywa ważną rolę w zatrzymaniu cyklu komórkowego w punkcie kontrolnym G2/M (Ling i in. 1996, Stark i Taylor 2004). Apoptoza (typ I) i autofagia (typ II) to dwa główne typy programowanej śmierci komórki (PCD). Apoptoza, najczęściej definiowany typ PCD, jest kontrolowana przez sygnały wewnątrzkomórkowe i/lub zewnątrzkomórkowe. W ciągu ostatnich trzech dekad szlaki sygnałowe zaangażowane w apoptozę zostały szeroko poznane w wielu komórkach nowotworowych. W obliczu ograniczonej dostępności energii komórki inicjują proces "samozjadania" określany mianem autofagii (Jiang i in. 2015). Autofagia jest aktywowana i regulowana przez czynniki wywołujące stres w komórce, takie jak niedotlenienie, reaktywne formy tlenu (RFT), stres osmotyczny i niedobór składników odżywczych. Potencjalne mechanizmy molekularne pomiędzy tymi dwoma typami PCD pozostają nieuchwytnie. W niektórych okolicznościach autofagia może indukować apoptozę, podczas gdy w innych uczestniczy w ścieżce prowadzącej do zahamowania apoptozy, a w konsekwencji do zatrzymania procesu indukcji śmierci komórki (Redza-Dutordoir i Averill-Bates 2021, Wang i in. 2017).

Autofagia może pełnić w różnych warunkach zarówno rolę supresyjną, jak i promującą rozwój nowotworów. Degraduje ona uszkodzone mitochondria i inne organelle komórkowe, aby utrzymać przy życiu komórki (Yun i Lee 2018). Co więcej, autofagia indukowana przez HKII została uznana za czynnik wpływający na oporność na chemioterapię w niektórych rodzajach nowotworów (Liu i in. 2019, Zhang i in. 2018).

Badając ochronną rolę HKII Tan i Miyamoto odkryli, że 2-deoksy-D-glukoza (2-DG), analog glukozy, zmniejsza intensywność rozwoju procesu autofagii i zwiększa śmierć kardiomiocytów indukowaną niedoborem glukozy. Spostrzeżenie to sugeruje, że



HKII działa stymulująco na proces autofagii w przypadku braku glukozy, co zostało dodatkowo poparte obserwacjami, że autofagia indukowana niedoborem glukozy jest osłabiona przez obniżenie ekspresji HKII (Tan i Miyamoto 2015).

W niniejszych badaniach indukcja procesu autofagii była niewielka lub nie występowała (po zastosowaniu samych związków w komórkach Huh-7). Widoczny wzrost procesu autofagii zaobserwowano po zastosowaniu kombinacji glimepirydu, indometacyny bądź benserazydu z doksorubicyną w stężeniu  $IC_{50}$ . Może to sugerować, że uszkodzenia wywołane przez badane związki są na tyle duże, że proces autofagii nie jest w stanie ich usunąć i tym samym uchronić komórki przed śmiercią.

W badaniach naukowych kompleksowe przeprogramowanie metabolizmu glukozy w komórkach nowotworowych, zwłaszcza w komórkach raka wątrobowokomórkowego (HCC), stanowi ważny obszar zainteresowania. W tych komórkach obserwuje się wyłączenie ekspresji niektórych enzymów niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania hepatocytów, ale nie dla komórek HCC. Jednocześnie, komórki nowotworowe wykazują wzmożoną ekspresję enzymów umożliwiających przyspieszony metabolizm glukozy. Takie metaboliczne rozróżnienie między komórkami HCC a hepatocytami stwarza możliwości selektywnego ukierunkowania na komórki nowotworowe (DeWaal i in. 2018).

W wielu badaniach potwierdzono wysoki poziom ekspresji HKII w różnych nowotworowych liniach komórkowych (Mathupala i in. 2006, Wolf i in. 2011). W niniejszym badaniu przeprowadzono porównanie poziomu HKII między komórkami nowotworu wątrobowokomórkowego Huh-7 i HepG2, a również prawidłowymi komórkami linii HMEC-1. Analiza poziomu heksokinazy II przy użyciu techniki Western blot wykazała istotnie wyższy poziom w komórkach HCC (raka wątrobowokomórkowego) niż w komórkach prawidłowych. Warto podkreślić, że w komórkach linii Huh-7 zaobserwowano jeszcze wyższy poziom HKII niż w komórkach linii HepG2.

Otrzymane wyniki można przełożyć na kontekst badań przeprowadzonych przez Schicht i współpracowników (2022). W ich badaniach scharakteryzowano profile metaboliczne pierwotnych ludzkich komórek raka wątrobowokomórkowego (PHC), linii komórkowych raka wątrobowokomórkowego (HCL) oraz pierwotnych ludzkich

hepatocytów (PHH), w celu zrozumienia różnic w ich stopniach różnicowania. Okazuje się, że poziom HKII był niski w komórkach PHC i HCC-PHH (izolowanych z próbek chirurgicznych od pacjentów z rakiem wątrobowokomórkowym), podczas gdy w liniach komórkowych HepG2 i Huh-7 poziom ten był znacząco podwyższony. Interesującym jest również fakt, że poziom heksokinazy II był wyższy w komórkach linii Huh-7 niż w komórkach linii HepG2. Wszystko to sugeruje, że istnieje zróżnicowany poziom ekspresji HKII w zależności od linii komórek raka wątrobowokomórkowego, co może wpływać na ich metabolizm i różnicowanie (Schicht i in. 2022).

Muller i inni już w 1994 roku donieśli, że inkubacja szczurzych komórek trzustki RINm5F i komórek tłuszczowych z glimepirydem zmniejszała poziom glukokinazy związanej z mitochondriami i mitochondrialną poryną (VDAC) do około 50-30%. Dane te sugerują, że glimepiryd, który hamuje regulowany przez ATP kanał potasowy w komórkach  $\beta$ , może mieć dodatkowo wewnątrzkomórkowe miejsce działania w komórkach wysepek Langerhansa i adipocytów na poziomie regulacji wiązania glukokinazy z VDAC (Muller i in. 1994).

Jak zaznaczono wcześniej, wiele prac wykazało księżycową rolę HKII w ochronie przed apoptozą. Wiążąc się z mitochondrialnym VDAC, blokuje ona przejście ważnych dla szlaku apoptotycznego białek, takich jak Bax i Bak, utrwalając swoją antyapoptotyczną rolę (Pastorino i in. 2002). Ponadto, nadekspresja heksokinazy II wydaje się zmniejszać indukowaną stresem oksydacyjnym akumulację mitochondrialnego Bax, co prowadzi do przypuszczenia, że heksokinaza i Bax mogą konkurować o wspólne miejsca wiązania w mitochondriach (Gall i in. 2011). Antyapoptotyczny efekt heksokinazy II jest zgodny z obserwowaną w wielu typach nowotworów podwyższoną aktywnością heksokinazy II (Mathupala i in. 2006). Pastorino i inni badali wpływ indometacyny oraz jej kombinacji z klotrimazolem na translokację białka proapoptycznego Bax do mitochondriów podczas apoptozy, gdzie pośredniczy ono w uwalnianiu białek z przestrzeni międzybłonowej, w tym cytochromu c. Zaobserwowali oni, że traktowanie komórek raka szyjki macicy HeLa indometacyną powodowało niewielkie wiązanie Bax do mitochondriów. Otrzymane przez nich wyniki implikują, że indometacyna w niewielkim stopniu powodowała odłączenie HKII od błony mitochondrialnej. Natomiast w komórkach preinkubowanych

z klotrimazolem, a następnie poddanych działaniu indometacyny, nastąpił wyraźny wzrost wiązania Bax we frakcji mitochondrialnej, co sugeruje odłączenie HKII od zewnętrznej błony mitochondrialnej (Pastorino i in. 2002). Natomiast Li i zespół w swoich badaniach nad benserazydem wykorzystując badania *in silico* wykazali, że benserazyd konkuruje z glukozą o miejsce wiążące w heksokinazie II, nie odłączając jej od błony mitochondrialnej (Li i in. 2017).

Podsumowując, wyniki badań wykazały, że glimepiryd, indometacyna i benserazyd zmniejszały aktywność heksokinazy II w roztworze oraz w komórkach linii Huh-7 i HepG2. Jednak według danych literaturowych indometacyna i benserazyd mogą nie być specyficznymi inhibitorami HKII. Zarówno doksorubicyna, jak i badane inhibitory, gdy były stosowane samodzielnie jak i w kombinacji indukowały stres oksydacyjny w liniach komórkowych Huh-7 i HepG2, prowadząc do zmniejszenia poziomu GSH i całkowitego potencjału antyoksydacyjnego.

Należy jednak dokładniej zbadać mechanizm synergistycznego działania pomiędzy glimepirydem i doksorubicyną w celu potencjalnego wykorzystania inhibitorów glikolizy do uwrażliwienia komórek nowotworowych na działanie tego chemioterapeutyku, tym bardziej, że obserwowany synergizm działania przeciwnowotworowego może nie być związany ze stresem oksydacyjnym.

## 9. Analiza SWOT w kontekście zastosowania inhibitorów HKII w leczeniu nowotworów

Analiza SWOT to wszechstronna metoda, która może być stosowana nie tylko w biznesie, ale także w różnych dziedzinach naukowych. Nazwa pochodzi od pierwszych liter słów:

- strengths (mocne strony),
- weaknesses (słabe strony),
- opportunities (szanse),
- threats (zagrożenia).

Dzięki tej metodzie można dokładnie ocenić sytuację, zidentyfikować mocne i słabe strony, szanse i zagrożenia oraz wypracować odpowiednie strategie działania. Analiza SWOT pomaga w ustaleniu odpowiednich strategii działania, takich jak redukcja zagrożeń lub wykorzystanie szans, eliminacja słabych stron i wzmacnianie mocnych stron. Pozwala to na wypracowanie najbardziej efektywnych rozwiązań i minimalizuje ryzyko niepowodzenia.

W przypadku niniejszej pracy doktorskiej, analiza SWOT pomogła w identyfikacji silnych i słabych stron pracy, szans i zagrożeń związanych z tematem badawczym. Silnymi stronami mogą być np. aktywność biologiczna badanych związków, ich stosowanie kliniczne oraz potencjalne zastosowanie w leczeniu nowotworów. Słabe strony natomiast mogą obejmować np. ograniczenia wynikające z badań *in vitro*, brak selektywności związków w stosunku do innych izoform heksokinazy lub potencjalne problemy z tworzeniem agregatów. Wśród szans można wymienić np. potencjalne dalsze badania nad sposobami leczenia nowotworów wątroby i innych typów nowotworów, a także badania nad zastosowaniem inhibitorów HKII w połączeniu z chemioterapeutykami w celu zwiększenia wrażliwości komórek nowotworowych. Zagrożeniem może być natomiast potencjalne wystąpienie działań niepożądanych lub ryzyko interakcji z innymi już stosowanymi lekami (Ryc. 9.1).



Ryc. 9.1. Analiza SWOT przeprowadzonych w niniejszej pracy doktorskiej badań

## 10. Wnioski

Nadrzędnym celem niniejszej pracy było przebadanie i wyłonienie związków, które finalnie można byłoby wskazać, jako te, które spełniają kryteria stawiane INHIBITOROM heksokinazy II. W ramach wykonanych prac badawczych dokonano wnikliwej oceny oddziaływania z komórkami raka wątrobowokomórkowego (linia komórkowa Huh-7 i HepG2) trzech związków, czyli GLIMEPIRYDU, INDOMETACYNINY oraz BENSERAZYDU. Substancje te są powszechnie używane w medycynie jako leki, co uczyniło je dodatkowo ciekawym obiektem badań w tej pracy.

Na podstawie otrzymanych wyników można sformułować następujące wnioski dotyczące właściwości i działania glimepirydu, indometacyny oraz benserazydu:

1. Hamują aktywność heksokinazy II (HKII),
2. Są cytotoksyczne
3. Działają prooksydacyjnie
4. Wywołują apoptozę

Analiza poziomu białka HKII przy użyciu techniki Western Blot wykazała różnicowanie poziomu heksokinazy II w liniach komórkowych raka wątrobowokomórkowego (Huh-7 z wyższym poziomem i HepG2 z niższym poziomem). Przy czym wyniki potwierdzają, że w komórkach prawidłowych (HMEC-1) poziom tego białka jest na niskim poziomie.

Ponadto, udało się udowodnić, że **SYNERGIA pomiędzy glimepirydem a doksorubicyną** może stanowić podwaliny pod nowy schemat terapeutyczny. W kontekście potencjalnego wykorzystania glimepirydu w celu podniesienia wrażliwości komórek nowotworowych na doksorubicynę oraz uwzględniając uzyskane wyniki (takie jak inhibicja HKII, aktywność cytotoksyczna, efekty prooksydacyjne oraz indukcja apoptozy), warto zaznaczyć, że zgłoszona do opatentowania kombinacja glimepirydu z doksorubicyną wskazuje obecnie na glimepiryd jako obiecujący inhibitor HKII. Jednak konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań w celu głębszego opisanie synergicznego oddziaływania między glimepirydem a doksorubicyną, co jest nieodzowne dla pełnego zrozumienia potencjalnych korzyści terapeutycznych płynących z połączenia tych substancji.

## 11. Streszczenie

Zrozumienie i wyjaśnienie procesów leżących u podstaw metabolizmu w komórkach nowotworowych stało się celem wielu badań ukierunkowanych na znalezienie i opracowanie nowych strategii przeciwnowotworowych. Jednym z wyzwań (również w niniejszej pracy) stała się próba zahamowania glikolizy poprzez wpływ na jeden z jej enzymów – heksokinazę II (HKII), którego zwiększona ekspresja obserwowana jest powszechnie w komórkach nowotworowych. W związku z powyższym przeprowadzono badania tej izoformy enzymu w celu oceny przeciwnowotworowej aktywności „potencjalnych” inhibitorów heksokinazy II (HKII), wyselekcjonowanych technikami *in silico*, oraz wyboru najbardziej efektywnej pochodnej (spośród przebadanych) pod kątem wykorzystania jej jako inhibitora HKII. W pracy zweryfikowano hipotezę badawczą, która zakładała, że: *nowe inhibitory heksokinazy II wykazują działanie przeciwnowotworowe na drodze hamowania aktywności HKII i/lub zwiększają indeks terapeutyczny znanych cytostatyków.*

Powyższą hipotezę badawczą zweryfikowano na ludzkich liniach komórkowych raka wątrobowokomórkowego (HepG2 i Huh-7), poddając je działaniu glimepirydu, indometacyny oraz benserazydu zarówno samodzielnie, jak i w połączeniu z doksorubicyną. W celu oceny aktywności biologicznej badanych związków oraz ich kombinacji z doksorubicyną, oceniano zdolność do hamowania aktywności HKII zarówno w komórce (*in vitro*), jak i w roztworze (*in solution*), cytotoksyczność, wpływ na cytotoksyczność leków przeciwnowotworowych (doksorubicyny) oraz zdolność do indukowania stresu oksydacyjnego i śmierci komórki.

Uzyskane wyniki wskazują, że badane związki - benserazyd, indometacyna i glimpiryd:

- ✓ hamują aktywność HKII w komórce, jak i w roztworze,
- ✓ wpływają na działanie cytotoksyczne doksorubicyny (efekt synergistyczny w kombinacji z glimepirydem),
- ✓ powodują wzrost poziomu reaktywnych form tlenu oraz azotu,
- ✓ powodują spadek potencjału mitochondrialnego ( $\Delta\Psi$ ), całkowitego potencjału,
- ✓ antyoksydacyjnego komórek oraz poziomu zredukowanego glutationu,
- ✓ indukują apoptozę na ścieżce mitochondrialnej,

- ✓ zwiększają poziom wewnątrzkomórkowego  $\text{Ca}^{2+}$ ,
- ✓ nie indukują lub słabo indukują proces autofagii,
- ✓ kombinacje glimepirydu, indometacyny bądź benserazydu z doksorubicyną indukują proces autofagii.

Uzyskane wyniki wskazują, że badane związki - glimepiryd, indometacyna i benserazyd - wykazują zdolność do hamowania aktywności heksokinazy II (HKII). Interesującym odkryciem jest synergistyczny efekt połączenia glimepirydu z doksorubicyną, co sugeruje potencjalne zastosowanie tego związku jako modulatora cytotoksyczności antracykliny.

Jednakże, aby wykorzystać inhibitory glikolizy, takie jak glimepiryd, w celu uwrażliwienia komórek nowotworowych na działanie doksorubicyny, konieczne są dalsze badania. Ważne jest zrozumienie mechanizmów działania tych związków w połączeniu z doksorubicyną oraz ich wpływu na komórki nowotworowe i prawidłowe. Podsumowując, przeprowadzone badania ukazują znaczenie i możliwość ukierunkowania terapii na metabolizm nowotworów jako realną opcję terapeutyczną.



## 12. Summary

Understanding and explaining the processes underlying metabolism in cancer cells has become the goal of many studies aimed at finding and developing new anticancer strategies. One of the challenges (including in the thesis) has been to try to inhibit glycolysis by affecting one of its enzymes, hexokinase II (HKII), whose increased expression is observed in cancer cells. Accordingly, a study of this isoform of the enzyme was carried out to evaluate the anticancer activity of 'potential' inhibitors of hexokinase II (HKII), selected by *in silico* techniques, and to select the most effective derivative (among those tested) for use as an HKII inhibitor. The study verified the research hypothesis, which was that: *new hexokinase II inhibitors exhibit antitumor activity through inhibition of HKII activity and/or increase the therapeutic index of known cytostatic agents.*

The above research hypothesis was verified on human hepatocellular carcinoma cell lines (HepG2 and Huh-7) by treating them with glimepiride, indomethacin and benserazide alone and in combination with doxorubicin, incubated for 72 hours. To evaluate the biological activity of the tested compounds and their combination with doxorubicin, the ability to inhibit HKII activity both in the cell (*in vitro*) and in solution (*in solution*), cytotoxicity, the effect on cytotoxicity of anticancer drugs (doxorubicin) and the ability to induce oxidative stress and cell death were evaluated.

The results show that the tested compounds - benserazide, indomethacin and glimepiride:

- ✓ inhibit HKII activity in the cell as well as in solution,
- ✓ affect the cytotoxic effect of doxorubicin (synergistic effect in combination with glimepiride),
- ✓ cause an increase in the levels of reactive oxygen species and nitrogen,
- ✓ cause a decrease in mitochondrial potential ( $\Delta\Psi$ ), total cellular antioxidant potential and levels of reduced glutathione,
- ✓ induce apoptosis in the mitochondrial pathway,
- ✓ increase intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels,
- ✓ do not induce or weakly induce the autophagy process,

- ✓ combinations of glimepiride, indomethacin or benserazide with doxorubicin induce the autophagy process.

In conclusion, the results obtained indicate that the tested compounds - glimepiride, indomethacin and benserazide - show the ability to inhibit hexokinase II (HKII) activity. An interesting finding is the synergistic effect of combining glimepiride with doxorubicin, which suggests the potential use of this compound as a modulator of anthracycline cytotoxicity.

However, further research is needed to use glycolysis inhibitors, such as glimepiride, to sensitize cancer cells to doxorubicin. It is important to understand the mechanisms of action of these compounds in combination with doxorubicin and their effects on cancer cells and normal cells. In conclusion, the research conducted demonstrates the importance and possibility of targeting cancer metabolism as a viable therapeutic option.

### 13. Literatura

1. Abu-Hamad, Salah, Hilal Zaid, Adrian Israelson, Edna Nahon, i Varda Shoshan-Barmatz. 2008. „Hexokinase-I protection against apoptotic cell death is mediated via interaction with the voltage-dependent anion channel-1: Mapping the site of binding”. *Journal of Biological Chemistry* 283(19):13482–90. doi: 10.1074/jbc.M708216200.
2. Adamczyk, Malgorzata, Karen Van Eunen, Barbara M. Bakker, i Hans V. Westerhoff. 2011. „Enzyme kinetics for systems biology: When, why and how”. w *Methods in Enzymology*. T. 500.
3. Akins, Nicholas S., Tanner C. Nielson, i Hoang V. Le. 2018. „Inhibition of Glycolysis and Glutaminolysis: An Emerging Drug Discovery Approach to Combat Cancer”. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 18(6). doi: 10.2174/1568026618666180523111351.
4. Aljamal, Jalal A., i Muwaffag Badawneh. 2017. „In vitro inhibition of human erythrocyte hexokinase by various hyperglycemic drugs”. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 31(8). doi: 10.1002/jbt.21910.
5. Alqahtani, Ali, Zubair Khan, Abdurahman Alloghbi, Tamer S. Said Ahmed, Mushtaq Ashraf, i Danae M. Hammouda. 2019. „Hepatocellular carcinoma: Molecular mechanisms and targeted therapies”. *Medicina (Lithuania)* 55(9).
6. Altman, Brian J., Zachary E. Stine, i Chi V. Dang. 2016. „From Krebs to clinic: Glutamine metabolism to cancer therapy”. *Nature Reviews Cancer* 16(10).
7. Amarowicz, Ryszard, i Ronald B. Pegg. 2019. „Natural antioxidants of plant origin”. S. 1–81 w *Advances in Food and Nutrition Research*. T. 90. Academic Press Inc.
8. Andreone, T. L., R. L. Printz, S. J. Pilgis, M. A. Magnuson, i D. K. Granner. 1989. „The amino acid sequence of rat liver glucokinase deduced from cloned cDNA”. *Journal of Biological Chemistry* 264(1). doi: 10.1016/s0021-9258(17)31266-8.
9. Aquina, Christopher T., Mariam F. Eskander, i Timothy M. Pawlik. 2022. „Liver-Directed Treatment Options Following Liver Tumor Recurrence: A Review of the Literature”. *Frontiers in Oncology* 12.

10. Balcerczyk, Aneta, Mirosław Soszynski, i Grzegorz Bartosz. 2005. „On the specificity of 4-amino-5-methylamino-2',7'- difluorofluorescein as a probe for nitric oxide”. *Free Radical Biology and Medicine* 39(3). doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.03.017.
11. Basit, Abdul, Musarrat Riaz, i Asher Fawwad. 2012. „Glimepiride: Evidence-based facts, trends, and observations”. *Vascular Health and Risk Management* 8(1). doi: 10.2147/HIV.S33194.
12. Bender, R. A. 2013. „Glycolysis”. S. 346–49 w *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*. Elsevier Inc.
13. Benzie, Iris F. F., i J. J. Strain. 1996. „The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of «antioxidant power»: The FRAP assay”. *Analytical Biochemistry* 239(1). doi: 10.1006/abio.1996.0292.
14. De Berardinis, Ralph J., i Navdeep S. Chandel. 2016. „Fundamentals of cancer metabolism”. *Science Advances* 2(5).
15. Berndt, Nikolaus, Johannes Eckstein, Niklas Heucke, Tilo Wuensch, Robert Gajowski, Martin Stockmann, David Meierhofer, i Hermann Georg Holzhütter. 2021. „Metabolic heterogeneity of human hepatocellular carcinoma: implications for personalized pharmacological treatment”. *FEBS Journal* 288(7). doi: 10.1111/febs.15587.
16. Berridge, Michael J., Peter Lipp, i Martin D. Bootman. 2000. „The versatility and universality of calcium signalling”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1(1).
17. Biederbick, A., H. F. Kern, i H. P. Elsasser. 1995. „Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles”. *European Journal of Cell Biology* 66(1).
18. Birsoy, Kivanç, Tim Wang, Richard Possemato, Omer H. Yilmaz, Catherine E. Koch, Walter W. Chen, Amanda W. Hutchins, Yetis Gultekin, Tim R. Peterson, Jan E. Carette, Thijn R. Brummelkamp, Clary B. Clish, i David M. Sabatini. 2013. „MCT1-mediated transport of a toxic molecule is an effective strategy for targeting glycolytic tumors”. *Nature Genetics* 45(1). doi: 10.1038/ng.2471.

19. Bose, Sminu, Cissy Zhang, i Anne Le. 2021. „Glucose Metabolism in Cancer: The Warburg Effect and Beyond”. w *Advances in Experimental Medicine and Biology*. T. 1311.
20. Boukouris, Aristeidis E., Sotirios D. Zervopoulos, i Evangelos D. Michelakis. 2016. „Metabolic Enzymes Moonlighting in the Nucleus: Metabolic Regulation of Gene Transcription”. *Trends in Biochemical Sciences* 41(8).
21. Brand, Martin D., i David G. Nicholls. 2011. „Assessing mitochondrial dysfunction in cells”. *Biochemical Journal* 435(2).
22. Brooks Robey, R., Judith Weisz, Nancy Kuemmerle, Anna C. Salzberg, Arthur Berg, Dustin G. Brown, Laura Kubik, Roberta Palorini, Fahd Al-Mulla, Rabeah Al-Temaimi, Annamaria Colacci, Chiara Mondello, Jayadev Raju, Jordan Woodrick, A. Ivana Scovassi, Neetu Singh, Monica Vaccari, Rabindra Roy, Stefano Forte, Lorenzo Memeo, Hosni K. Salem, Amedeo Amedei, Roslida A. Hamid, Graeme P. Williams, Leroy Lowe, Joel Meyer, Francis L. Martin, William H. Bisson, Ferdinando Chiaradonna, i Elizabeth P. Ryan. 2015. „Metabolic reprogramming and dysregulated metabolism: Cause, consequence and/or enabler of environmental carcinogenesis?” *Carcinogenesis* 36.
23. Butler, Lisa M., Ylenia Perone, Jonas Dehairs, Leslie E. Lupien, Vincent de Laat, Ali Talebi, Massimo Loda, William B. Kinlaw, i Johannes V. Swinnen. 2020. „Lipids and cancer: Emerging roles in pathogenesis, diagnosis and therapeutic intervention”. *Advanced Drug Delivery Reviews* 159.
24. Cai, Junting, Miranda K. Culley, Yutong Zhao, i Jing Zhao. 2018. „The role of ubiquitination and deubiquitination in the regulation of cell junctions”. *Protein and Cell* 9(9).
25. Catalina-Rodriguez, Olga, Vamsi K. Kolukula, York Tomita, Anju Preet, Ferdinando Palmieri, Anton Wellstein, Stephen Byers, Amato J. Giaccia, Eric Glasgow, Chris Albanese, i Maria Laura Avantaggiati. 2012. „The mitochondrial citrate transporter, CIC, is essential for mitochondrial homeostasis”. *Oncotarget* 3(10). doi: 10.18632/oncotarget.714.
26. Catanzaro, Daniela, Edoardo Gaude, Genny Orso, Carla Giordano, Giulia Guzzo, Andrea Rasola, Eugenio Ragazzi, Laura Caparrotta, Christian Frezza, i Monica

- Montopoli. 2015. „Inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase sensitizes cisplatin-resistant cells to death”. *Oncotarget* 6(30). doi: 10.18632/oncotarget.4945.
27. Cereto-Massagué, Adrià, María José Ojeda, Cristina Valls, Miquel Mulero, Santiago Garcia-Vallvé, i Gerard Pujadas. 2015. „Molecular fingerprint similarity search in virtual screening”. *Methods* 71(C). doi: 10.1016/j.ymeth.2014.08.005.
28. Chang, Chia Hsuin, Jou Wei Lin, Li Chiu Wu, Mei Shu Lai, i Lee Ming Chuang. 2012. „Oral insulin secretagogues, insulin, and cancer risk in type 2 diabetes mellitus”. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 97(7). doi: 10.1210/jc.2012-1162.
29. Chaudhry, Raheel, i Matthew Varacallo. 2018. *Biochemistry, Glycolysis*.
30. Chelakkot, Chaithanya, Vipin Shankar Chelakkot, Youngkee Shin, i Kyoung Song. 2023. „Modulating Glycolysis to Improve Cancer Therapy”. *International Journal of Molecular Sciences* 24(3).
31. Chen, Chen, Zehua Wang, i Yanru Qin. 2022. „Connections between metabolism and epigenetics: mechanisms and novel anti-cancer strategy”. *Frontiers in Pharmacology* 13.
32. Chen, Zhao, Hui Zhang, Weiqin Lu, i Peng Huang. 2009. „Role of mitochondria-associated hexokinase II in cancer cell death induced by 3-bromopyruvate”. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1787(5). doi: 10.1016/j.bbabi.2009.03.003.
33. Cheng, Hui, Meng Wang, Jingjing Su, Yueyue Li, Jiao Long, Jing Chu, Xinyu Wan, Yu Cao, i Qinglin Li. 2022. „Lipid Metabolism and Cancer”. *Life* 12(6).
34. Chennuru, Anusha, i Mohamed T. S. Saleem. 2013. „Antioxidant, lipid lowering, and membrane stabilization effect of sesamol against doxorubicin-induced cardiomyopathy in experimental rats”. *BioMed Research International* 2013. doi: 10.1155/2013/934239.
35. Chou, Ting Chao. 2006. „Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies”. *Pharmacological Reviews* 58(3).

36. Chu, Yu Ju, Hwai I. Yang, Hui Chen Wu, Mei Hsuan Lee, Jessica Liu, Li Yu Wang, Sheng Nan Lu, Chin Lan Jen, San Lin You, Regina M. Santella, i Chien Jen Chen. 2018. „Aflatoxin B1 exposure increases the risk of hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus infection or alcohol consumption”. *European Journal of Cancer* 94. doi: 10.1016/j.ejca.2018.02.010.
37. Circu, Magdalena L., i Tak Yee Aw. 2008. „Glutathione and apoptosis”. *Free Radical Research* 42(8).
38. Ciscato, Francesco, Lavinia Ferrone, Ionica Masgras, Claudio Laquatra, i Andrea Rasola. 2021. „Hexokinase 2 in cancer: A prima donna playing multiple characters”. *International Journal of Molecular Sciences* 22(9).
39. Cluntun, Ahmad A., Michael J. Lukey, Richard A. Cerione, i Jason W. Locasale. 2017. „Glutamine Metabolism in Cancer: Understanding the Heterogeneity”. *Trends in Cancer* 3(3).
40. Coleman, Mitchell C., Carla R. Asbury, David Daniels, Juan Du, Nukhet Aykin-Burns, Brian J. Smith, Ling Li, Douglas R. Spitz, i Joseph J. Cullen. 2008. „2-Deoxy-d-glucose causes cytotoxicity, oxidative stress, and radiosensitization in pancreatic cancer”. *Free Radical Biology and Medicine* 44(3). doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.08.032.
41. Crissien, Ana Maria, i Catherine Frenette. 2014. „Current management of hepatocellular carcinoma”. *Gastroenterology and Hepatology* 10(3).
42. Daina, Antoine, Olivier Michielin, i Vincent Zoete. 2017. „SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules”. *Scientific Reports* 7. doi: 10.1038/srep42717.
43. Danhier, Pierre, Piotr Bański, Valéry L. Payen, Debora Grasso, Luigi Ippolito, Pierre Sonveaux, i Paolo E. Porporato. 2017. „Cancer metabolism in space and time: Beyond the Warburg effect”. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1858(8). doi: 10.1016/j.bbabi.2017.02.001.
44. Darvin, Pramod, Salman M. Toor, Varun Sasidharan Nair, i Eyad Elkord. 2018. „Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers”. *Experimental and Molecular Medicine* 50(12).

45. Da-Silva, Wagner Seixas, Armando Gómez-Puyou, Marietta Tuena De Gómez-Puyou, Rafael Moreno-Sanchez, Fernanda G. De Felice, Leopoldo De Meis, Marcus F. Oliveira, i Antonio Galina. 2004. „Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defense. Steady-state ADP formation as a regulatory mechanism of membrane potential and reactive oxygen species generation in mitochondria”. *Journal of Biological Chemistry* 279(38). doi: 10.1074/jbc.M403835200.
46. DeBerardinis, Ralph J., Julian J. Lum, Georgia Hatzivassiliou, i Craig B. Thompson. 2008. „The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation”. *Cell Metabolism* 7(1).
47. Demaurex, Nicolas, i Clark Distelhorst. 2003. „Cell biology: Apoptosis - The calcium connection”. *Science* 300(5616).
48. Denko, Nicholas C. 2008. „Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour”. *Nature Reviews Cancer* 8(9).
49. Desai, Jasmin Radhika, Sebastian Ochoa, Petra Alexandra Prins, i Aiwu Ruth He. 2017. „Systemic therapy for advanced hepatocellular carcinoma: An update”. *Journal of Gastrointestinal Oncology* 8(2).
50. Devendran, Rangunathan, Vignesh Ramesh, i Prabu Gnanasekaran. 2022. „Fundamentals of cell metabolism and cancer”. w *Understanding Cancer: From Basics to Therapeutics*.
51. DeWaal, Dannielle, Veronique Nogueira, Alexander R. Terry, Krushna C. Patra, Sang Min Jeon, Grace Guzman, Jennifer Au, Christopher P. Long, Maciek R. Antoniewicz, i Nissim Hay. 2018. „Hexokinase-2 depletion inhibits glycolysis and induces oxidative phosphorylation in hepatocellular carcinoma and sensitizes to metformin”. *Nature Communications* 9(1). doi: 10.1038/s41467-017-02733-4.
52. Djafarzadeh, Siamak, i Stephan M. Jakob. 2017. „High-resolution respirometry to assess mitochondrial function in permeabilized and intact cells”. *Journal of Visualized Experiments* 2017(120). doi: 10.3791/54985.
53. Dong, Yang, Rongfu Tu, Hudan Liu, i Guoliang Qing. 2020. „Regulation of cancer cell metabolism: oncogenic MYC in the driver’s seat”. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5(1).



54. Doyle, Adam, Andre Gorgen, Hala Muaddi, Aloysious D. Aravinthan, Assaf Issachar, Oleg Mironov, Wei Zhang, John Kachura, Robert Beecroft, Sean P. Cleary, Anand Ghanekar, Paul D. Greig, Ian D. McGilvray, Markus Selzner, Mark S. Cattral, David R. Grant, Leslie B. Lilly, Nazia Selzner, Eberhard L. Renner, Morris Sherman, i Gonzalo Sapisochin. 2019. „Outcomes of radiofrequency ablation as first-line therapy for hepatocellular carcinoma less than 3 cm in potentially transplantable patients”. *Journal of Hepatology* 70(5). doi: 10.1016/j.jhep.2018.12.027.
55. Dreyfuss, D., G. Jondeau, R. Couturier, J. Rahmani, P. Assayag, i F. Coste. 1989. „Tall T waves during metabolic acidosis without hyperkalemia: A prospective study”. *Critical Care Medicine* 17(5). doi: 10.1097/00003246-198905000-00005.
56. Duraj, Tomás, Josefa Carrión-Navarro, Thomas N. Seyfried, Noemí García-Romero, i Angel Ayuso-Sacido. 2021. „Metabolic therapy and bioenergetic analysis: The missing piece of the puzzle”. *Molecular Metabolism* 54.
57. El-Serag, Hashem B. 2011. *Hepatocellular Carcinoma*. T. 365.
58. Van Eunen, Karen, Jildau Bouwman, Pascale Daran-Lapujade, Jarne Postmus, André B. Canelas, Femke I. C. Mensonides, Rick Orij, Isil Tuzun, Joost Van Den Brink, Gertien J. Smits, Walter M. Van Gulik, Stanley Brul, Joseph J. Heijnen, Johannes H. De Winde, M. Joost Teixeira De Mattos, Carsten Kettner, Jens Nielsen, Hans V. Westerhoff, i Barbara M. Bakker. 2010. „Measuring enzyme activities under standardized in vivo-like conditions for systems biology”. *FEBS Journal* 277(3). doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07524.x.
59. Fabri, Mario, Matteo Villa, Michal A. Stanczak, Joy Edwards-Hicks, Mauro Corrado, i Erika L. Pearce. 2021. „Research Techniques Made Simple: Profiling Cellular Energy Metabolism”. *Journal of Investigative Dermatology* 141(12).
60. Fan, Jing, Jurre J. Kamphorst, Robin Mathew, Michelle K. Chung, Eileen White, Tomer Shlomi, i Joshua D. Rabinowitz. 2013. „Glutamine-driven oxidative phosphorylation is a major ATP source in transformed mammalian cells in both normoxia and hypoxia”. *Molecular Systems Biology* 9. doi: 10.1038/msb.2013.65.

61. Farooq, Zeenat, Hagar Ismail, Sheraz Ahmad Bhat, Brian T. Layden, i Md Wasim Khan. 2023. „Aiding Cancer’s “Sweet Tooth”: Role of Hexokinases in Metabolic Reprogramming”. *Life* 13(4).
62. Ferreira, Juliana C., Abdul Rahman Khrbtli, Cameron L. Shetler, Samman Mansoor, Liaqat Ali, Ozge Sensoy, i Wael M. Rabeh. 2021. „Linker residues regulate the activity and stability of hexokinase 2, a promising anticancer target”. *Journal of Biological Chemistry* 296. doi: 10.1074/JBC.RA120.015293.
63. Fitian, Asem I., i Roniel Cabrera. 2017. „Disease monitoring of hepatocellular carcinoma through metabolomics”. *World Journal of Hepatology* 9(1). doi: 10.4254/wjh.v9.i1.1.
64. Fleury, Christophe, Bernard Mignotte, i Jean Luc Vayssière. 2002. „Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling”. *Biochimie* 84(2–3). doi: 10.1016/S0300-9084(02)01369-X.
65. Flöter, Jessica, Irem Kaymak, i Almut Schulze. 2017. „Regulation of metabolic activity by p53”. *Metabolites* 7(2).
66. Fraser, John K., Fu-Kuen Lin, i Michael V Berridge. 1988. *Expression and Modulation of Specific, High Affinity Binding Sites for Erythropoietin on the Human Erythroleukemic Cell Line K562*. T. 7.
67. Fulda, Simone, Lorenzo Galluzzi, i Guido Kroemer. 2010. „Targeting mitochondria for cancer therapy”. *Nature Reviews Drug Discovery* 9(6).
68. Gall, Jonathan M., Vincent Wong, David R. Pimental, Andrea Havasi, Zhiyong Wang, John G. Pastorino, Ramon G. B. Bonegio, John H. Schwartz, i Steven C. Borkan. 2011. „Hexokinase regulates Bax-mediated mitochondrial membrane injury following ischemic stress”. *Kidney International* 79(11):1207–16. doi: <https://doi.org/10.1038/ki.2010.532>.
69. Gameiro, Paulo A., Juanjuan Yang, Ana M. Metelo, Rocio Pérez-Carro, Rania Baker, Zongwei Wang, Alexandra Arreola, W. Kimryn Rathmell, Aria Olumi, Pilar López-Larrubia, Gregory Stephanopoulos, i Othon Iliopoulos. 2013. „In vivo HIF-mediated reductive carboxylation is regulated by citrate levels and sensitizes VHL-deficient cells to glutamine deprivation”. *Cell Metabolism* 17(3). doi: 10.1016/j.cmet.2013.02.002.

70. Garcia, Sara N., Rita C. Guedes, i M. Matilde Marques. 2018. „Unlocking the Potential of HKII in Cancer Metabolism and Therapeutics”. *Current Medicinal Chemistry* 26(41). doi: 10.2174/0929867326666181213092652.
71. Gauthier, Angela, i Mitchell Ho. 2013. „Role of sorafenib in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma: An update”. *Hepatology Research* 43(2).
72. Gazgalis, Dimitris, Mehreen Zaka, Mehreen Zaka, Bilal Haider Abbasi, Diomedes E. Logothetis, Mihaly Mezei, i Meng Cui. 2020. „Protein Binding Pocket Optimization for Virtual High-Throughput Screening (vHTS) Drug Discovery”. *ACS Omega* 5(24). doi: 10.1021/acsomega.0c00522.
73. Gerencser, Akos A., Andy Neilson, Sung W. Choi, Ursula Edman, Nagendra Yadava, Richard J. Oh, David A. Ferrick, David G. Nicholls, i Martin D. Brand. 2009. „Quantitative microplate-based respirometry with correction for oxygen diffusion”. *Analytical Chemistry* 81(16). doi: 10.1021/ac900881z.
74. Gimeno, Aleix, María José Ojeda-Montes, Sarah Tomás-Hernández, Adrià Cereto-Massagué, Raúl Beltrán-Debón, Miquel Mulero, Gerard Pujadas, i Santiago Garcia-Vallvé. 2019. „The light and dark sides of virtual screening: What is there to know?” *International Journal of Molecular Sciences* 20(6).
75. Gnaiger, Erich, Rosmarie Steinlechner-Maran, Gabriela Méndez, Thomas Eberl, i Raimund Margreiter. 1995. „Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen”. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 27(6). doi: 10.1007/BF02111656.
76. Gong, Tengfang, Changbing Zheng, Xidan Ou, Jie Zheng, Jiayi Yu, Shuyu Chen, Yehui Duan, i Wei Liu. 2022. „Glutamine metabolism in cancers: Targeting the oxidative homeostasis”. *Frontiers in Oncology* 12.
77. Granchi, Carlotta, Ilaria Paterni, Reshma Rani, i Filippo Minutolo. 2013. „Small-molecule inhibitors of human LDH5”. *Future Medicinal Chemistry* 5(16).
78. Grazie, Marco Le, Maria Rosa Biagini, Mirko Tarocchi, Simone Polvani, i Andrea Galli. 2017. „Chemotherapy for hepatocellular carcinoma: The present and the future”. *World Journal of Hepatology* 9(21).

79. Gu, Xia, Yuan Ma, Yi Liu, i Qiang Wan. 2021. „Measurement of mitochondrial respiration in adherent cells by Seahorse XF96 Cell Mito Stress Test”. *STAR Protocols* 2(1). doi: 10.1016/j.xpro.2020.100245.
80. Gurtu, Vanessa, Steven R. Kain, i Guohong Zhang. 1997. „Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis”. *Analytical Biochemistry* 251(1). doi: 10.1006/abio.1997.2220.
81. Hamed, Manal A., i Sanaa A. Ali. 2013. „Non-viral factors contributing to hepatocellular carcinoma”. *World Journal of Hepatology* 5(6). doi: 10.4254/wjh.v5.i6.311.
82. Hanahan, Douglas, i Robert A. Weinberg. 2000. „The hallmarks of cancer”. *Cell* 100(1).
83. Hanahan, Douglas, i Robert A. Weinberg. 2011. „Hallmarks of cancer: The next generation”. *Cell* 144(5).
84. Hay, Nissim. 2016. „Reprogramming glucose metabolism in cancer: Can it be exploited for cancer therapy?” *Nature Reviews Cancer* 16(10).
85. Hayes, Patti, Claire Fergus, Magda Ghanim, Cansu Cirzi, Lyubomyr Burtnyak, Callum J. McGrenaghan, Francesca Tuorto, Derek P. Nolan, i Vincent P. Kelly. 2020. „Queuine micronutrient deficiency promotes warburg metabolism and reversal of the mitochondrial ATP synthase in hela cells”. *Nutrients* 12(3). doi: 10.3390/nu12030871.
86. Heiden, Matthew G. Vander, Lewis C. Cantley, i Craig B. Thompson. 2009. „Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation”. *Science* 324(5930).
87. Vander Heiden, Matthew G., i Ralph J. DeBerardinis. 2017. „Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology”. *Cell* 168(4).
88. Hensley, Christopher T., Ajla T. Wasti, i Ralph J. DeBerardinis. 2013. „Glutamine and cancer: Cell biology, physiology, and clinical opportunities”. *Journal of Clinical Investigation* 123(9).
89. Herst, Patries M., Georgia M. Carson, David A. Eccles, i Michael V. Berridge. 2022. „Bioenergetic and Metabolic Adaptation in Tumor Progression and Metastasis”. *Frontiers in Oncology* 12. doi: 10.3389/fonc.2022.857686.

90. Huang, Ao, Xin Rong Yang, Wen Yuan Chung, Ashley R. Dennison, i Jian Zhou. 2020. „Targeted therapy for hepatocellular carcinoma”. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5(1).
91. Hussar, Piret. 2022. „Apoptosis Regulators Bcl-2 and Caspase-3”. *Encyclopedia* 2(4). doi: 10.3390/encyclopedia2040111.
92. Iessi, Elisabetta, Rosa Vona, Camilla Cittadini, i Paola Matarrese. 2021. „Targeting the Interplay between Cancer Metabolic Reprogramming and Cell Death Pathways as a Viable Therapeutic Path”. *Biomedicines* 9(12).
93. Irwin, John J., i Brian K. Shoichet. 2016. „Docking Screens for Novel Ligands Conferring New Biology”. *Journal of Medicinal Chemistry* 59(9).
94. Jeffery, Constance J. 2018. „Protein moonlighting: What is it, and why is it important?” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 373(1738).
95. Jiang, Bo. 2017. „Aerobic glycolysis and high level of lactate in cancer metabolism and microenvironment”. *Genes and Diseases* 4(1).
96. Jiang, Xuejun, Michael Overholtzer, i Craig B. Thompson. 2015. „Autophagy in cellular metabolism and cancer”. *Journal of Clinical Investigation* 125(1).
97. Judge, Ayesha, i Michael S. Dodd. 2020. „Metabolism”. *Essays in Biochemistry* 64(4):607–47. doi: 10.1042/EBC20190041.
98. Jung, Jin G., i Anne Le. 2021. „Metabolism of Immune Cells in the Tumor Microenvironment”. w *Advances in Experimental Medicine and Biology*. T. 1311.
99. Juszczak, Karolina, Anna Kubicka, Radosław Kitel, Grzegorz Dzido, Magdalena Łabieniec-Watała, Serafin Zawadzki, Agnieszka Marczak, Krzysztof Walczak, Karolina Matczak, i Mateusz D. Tomczyk. 2022. „Hexokinase 2 Inhibition and Biological Effects of BNBZ and Its Derivatives: The Influence of the Number and Arrangement of Hydroxyl Groups”. *International Journal of Molecular Sciences* 23(5). doi: 10.3390/ijms23052616.
100. Kalathil, Suresh Gopi, i Yasmin Thanavala. 2021. „Natural killer cells and t cells in hepatocellular carcinoma and viral hepatitis: Current status and perspectives for future immunotherapeutic approaches”. *Cells* 10(6).

101. Kamencic, Huse, Andrew Lyon, Phyllis G. Paterson, i Bernhard H. J. Juurlink. 2000. „Monochlorobimane fluorometric method to measure tissue glutathione”. *Analytical Biochemistry* 286(1). doi: 10.1006/abio.2000.4765.
102. Kang, Hyunkoo, Sungmin Lee, Kyeongmin Kim, Jaewan Jeon, Seok Gu Kang, Hye Sook Youn, Hae Yu Kim, i Bu Hyun Youn. 2021. „Downregulated CLIP3 induces radioresistance by enhancing stemness and glycolytic flux in glioblastoma”. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 40(1). doi: 10.1186/s13046-021-02077-4.
103. Kciuk, Mateusz, Adrianna Gielecińska, Somdutt Mujwar, Damian Kołat, Żaneta Kaluzińska-Kołat, Ismail Celik, i Renata Kontek. 2023. „Doxorubicin—An Agent with Multiple Mechanisms of Anticancer Activity”. *Cells* 12(4).
104. Kholmukhamedov, Andaleb, Justin M. Schwartz, i John J. Lemasters. 2013. „Mitotracker probes and mitochondrial membrane potential”. *Shock* 39(6). doi: 10.1097/shk.0b013e318292300d.
105. Kim, Min Hyun, i Hyeyoung Kim. 2013. „Oncogenes and Tumor Suppressors Regulate Glutamine Metabolism in Cancer Cells”. *Journal of Cancer Prevention* 18(3). doi: 10.15430/jcp.2013.18.3.221.
106. Ko, Ying Hui, Marina Domingo-Vidal, Megan Roche, Zhao Lin, Diana Whitaker-Menezes, Erin Seifert, Claudia Capparelli, Madalina Tuluc, Ruth C. Birbe, Patrick Tassone, Joseph M. Curry, Àurea Navarro-Sabaté, Anna Manzano, Ramon Bartrons, Jaime Caro, i Ubaldo Martinez-Outschoorn. 2016. „TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator (TIGAR) metabolically reprograms carcinoma and stromal cells in breast cancer”. *Journal of Biological Chemistry* 291(51). doi: 10.1074/jbc.M116.740209.
107. Kolb, Peter, i John Irwin. 2009. „Docking Screens: Right for the Right Reasons?” *Current Topics in Medicinal Chemistry* 9(9). doi: 10.2174/156802609789207091.
108. Kumar, Ashutosh, i Kam Y. J. Zhang. 2015. „Hierarchical virtual screening approaches in small molecule drug discovery”. *Methods* 71(C). doi: 10.1016/j.ymeth.2014.07.007.

109. Lee, Nathan C. W., Maria Annunziata Carella, Salvatore Papa, i Concetta Bubici. 2018. „High expression of glycolytic genes in Cirrhosis correlates with the risk of developing liver cancer”. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 6(OCT). doi: 10.3389/fcell.2018.00138.
110. Lehúede, Camille, Fanny Dupuy, Rebecca Rabinovitch, Russell G. Jones, i Peter M. Siegel. 2016. „Metabolic plasticity as a determinant of tumor growth and metastasis”. *Cancer Research* 76(18).
111. Lemberg, Kathryn M., Sadakatali S. Gori, Takashi Tsukamoto, Rana Rais, i Barbara S. Slusher. 2022. „Clinical development of metabolic inhibitors for oncology”. *Journal of Clinical Investigation* 132(1). doi: 10.1172/JCI148550.
112. Li, Jiaqi, Jie Qing Eu, Li Ren Kong, Lingzhi Wang, Yaw Chyn Lim, Boon Cher Goh, i Andrea L. A. Wong. 2020. „Targeting metabolism in cancer cells and the tumour microenvironment for cancer therapy”. *Molecules* 25(20).
113. Li, Wei, Mengzhu Zheng, Shuangping Wu, Suyu Gao, Mei Yang, Zhimei Li, Qiuxia Min, Weiguang Sun, Lixia Chen, Guangya Xiang, i Hua Li. 2017. „Benserazide, a dopadecarboxylase inhibitor, suppresses tumor growth by targeting hexokinase 2”. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 36(1). doi: 10.1186/s13046-017-0530-4.
114. Li, Wenzhuo, Song Zhang, Yingying Zhao, Shuaiyu Huang, i Jiangshan Zhao. 2017. „Molecular docking and molecular dynamics simulation analyses of urea with ammoniated and ammoxidized lignin”. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 71. doi: 10.1016/j.jmgm.2016.11.005.
115. Li, Xinjian, Willie Yu, Xu Qian, Yan Xia, Yanhua Zheng, Jong Ho Lee, Wei Li, Jianxin Lyu, Ganesh Rao, Xiaochun Zhang, Chao Nan Qian, Steven G. Rozen, Tao Jiang, i Zhimin Lu. 2017. „Nucleus-Translocated ACSS2 Promotes Gene Transcription for Lysosomal Biogenesis and Autophagy”. *Molecular Cell* 66(5). doi: 10.1016/j.molcel.2017.04.026.
116. Li, Zhihong, i Brett H. Graham. 2012. „Measurement of mitochondrial oxygen consumption using a Clark electrode”. *Methods in Molecular Biology* 837. doi: 10.1007/978-1-61779-504-6\_5.

117. Liberti, Maria V., i Jason W. Locasale. 2016. „The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?” *Trends in Biochemical Sciences* 41(3).
118. Lin, Hong, Jin Zeng, Ren Xie, Mark J. Schulz, Rosanna Tedesco, Junya Qu, Karl F. Erhard, James F. MacK, Kaushik Raha, Alan R. Rendina, Lawrence M. Szewczuk, Patricia M. Kratz, Anthony J. Jurewicz, Ted Cecconie, Stan Martens, Patrick J. McDevitt, John D. Martin, Stephenie B. Chen, Yong Jiang, Leng Nickels, Benjamin J. Schwartz, Angela Smallwood, Baoguang Zhao, Nino Campobasso, Yanqiu Qian, Jacques Briand, Cynthia M. Rominger, Catherine Oleykowski, Mary Ann Hardwicke, i Juan I. Luengo. 2016. „Discovery of a Novel 2,6-Disubstituted Glucosamine Series of Potent and Selective Hexokinase 2 Inhibitors”. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 7(3). doi: 10.1021/acsmchemlett.5b00214.
119. Ling, Yi He, Adel K. El-Naggar, Waldemar Priebe, i Roman Perez-Soler. 1996. „Cell cycle-dependent cytotoxicity, G2/M phase arrest, and disruption of p34cdc2/cyclin B1 activity induced by doxorubicin in synchronized P388 cells”. *Molecular Pharmacology* 49(5).
120. Lionta, Evanthia, George Spyrou, Demetrios Vassilatis, i Zoe Cournia. 2014. „Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: Principles, Applications and Recent Advances”. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 14(16). doi: 10.2174/1568026614666140929124445.
121. Lis, Paweł, Mariusz Dylag, Katarzyna Niedźwiecka, Young H. Ko, Peter L. Pedersen, Andre Goffeau, i Stanisław Ułaszewski. 2016. „The HK2 dependent «Warburg effect» and mitochondrial oxidative phosphorylation in cancer: Targets for effective therapy with 3-bromopyruvate”. *Molecules* 21(12).
122. Liu, Chunyan, Xiuli Wang, i Youzhong Zhang. 2019. „The Roles of HKII on Tumorigenesis of Cervical Cancer”. *Technology in Cancer Research and Treatment* 18. doi: 10.1177/1533033819871306.
123. Liu, Grace Y., i David M. Sabatini. 2020. „mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21(4).
124. Liu, Gui Hong, Tao Chen, Xin Zhang, Xue Lei Ma, i Hua Shan Shi. 2022. „Small molecule inhibitors targeting the cancers”. *MedComm* 3(4).



125. Liu, Jixiang, Mahesh Bhargat, Cailan Zhang, Zhenjun Diwu, Brian Hoyland, i Dieter H. Klaubert. 1999. „Fluorescent molecular probes V: A sensitive caspase-3 substrate for fluorometric assays”. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 9(22). doi: 10.1016/s0960-894x(99)00566-1.
126. Liu, Ruijuan, i Xuewei Liu. 2022. „Virtual Screening and Biological Activity Evaluation of New Potent Inhibitors Targeting Hexokinase-II”. *Molecules* 27(21). doi: 10.3390/molecules27217555.
127. Lopez-Lazaro, Miguel. 2008. „The Warburg Effect: Why and How Do Cancer Cells Activate Glycolysis in the Presence of Oxygen?” *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 8(3). doi: 10.2174/187152008783961932.
128. Lu, Chao, i Craig B. Thompson. 2012. „Metabolic regulation of epigenetics”. *Cell Metabolism* 16(1).
129. Lu, Sean, i Yugang Wang. 2018. „Nonmetabolic functions of metabolic enzymes in cancer development”. *Cancer Communications* 38(1).
130. Lu, Zhimin, i Tony Hunter. 2018. „Metabolic Kinases Moonlighting as Protein Kinases”. *Trends in Biochemical Sciences* 43(4).
131. Ma, Xiaoxiao, Leelyn Chong, Ran Tian, Riyi Shi, Tony Y. Hu, Zheng Ouyang, i Yu Xia. 2016. „Identification and quantitation of lipid C=C location isomers: A shotgun lipidomics approach enabled by photochemical reaction”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(10). doi: 10.1073/pnas.1523356113.
132. Mahmood, Tahrin, i Ping Chang Yang. 2012. „Western blot: Technique, theory, and trouble shooting”. *North American Journal of Medical Sciences* 4(9). doi: 10.4103/1947-2714.100998.
133. Marbaniang, Casterland, i Lakhan Kma. 2018. „Dysregulation of glucose metabolism by oncogenes and tumor suppressors in cancer cells”. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 19(9).
134. Marcucci, Fabrizio, i Cristiano Rumio. 2021. „Glycolysis-induced drug resistance in tumors—A response to danger signals?” *Neoplasia (United States)* 23(2).

135. Marini, Cecilia, Barbara Salani, Michela Massollo, Adriana Amaro, Alessia Isabella Esposito, Anna Maria Orengo, Selene Capitanio, Laura Emionite, Mattia Riondato, Gianluca Bottoni, Cinzia Massara, Simona Boccardo, Marina Fabbi, Cristina Campi, Silvia Ravera, Giovanna Angelini, Silvia Morbelli, Michele Cilli, Renzo Cordera, Mauro Truini, Davide Maggi, Ulrich Pfeffer, i Gianmario Sambuceti. 2013. „Direct inhibition of hexokinase activity by metformin at least partially impairs glucose metabolism and tumor growth in experimental breast cancer”. *Cell Cycle* 12(22). doi: 10.4161/cc.26461.
136. Martínez-Reyes, Inmaculada, i Navdeep S. Chandel. 2020. „Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease”. *Nature Communications* 11(1).
137. Martínez-Reyes, Inmaculada, i Navdeep S. Chandel. 2021. „Cancer metabolism: looking forward”. *Nature Reviews Cancer* 21(10).
138. Massart, C., C. Le Tellier, J. Gibassier, G. Leclech, i M. Nicol. 1993. „Modulation by dimethyl sulphoxide of the toxicity induced by cis-diamminedichloroplatinum in cultured thyrocytes”. *Toxicology in Vitro* 7(1). doi: 10.1016/0887-2333(93)90116-M.
139. Mathupala, S. P., Y. H. Ko, i P. L. Pedersen. 2006. „Hexokinase II: Cancer’s double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria”. *Oncogene* 25(34).
140. Mathupala, Saroj P., Young H. Ko, i Peter L. Pedersen. 2010. „The pivotal roles of mitochondria in cancer: Warburg and beyond and encouraging prospects for effective therapies”. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1797(6–7).
141. Matschinsky, Franz M., i David F. Wilson. 2019. „The central role of glucokinase in glucose homeostasis: A perspective 50 years after demonstrating the presence of the enzyme in islets of Langerhans”. *Frontiers in Physiology* 10(MAR). doi: 10.3389/fphys.2019.00148.
142. McComb, R. B., L. W. Bond, R. W. Burnett, R. C. Keech, i G. N. Bowers. 1976. „Determination of the molar absorptivity of NADH”. *Clinical Chemistry* 22(2). doi: 10.1093/clinchem/22.2.141.

143. McGovern, Susan L., Brian T. Helfand, Brian Feng, i Brian K. Shoichet. 2003. „A specific mechanism of nonspecific inhibition”. *Journal of Medicinal Chemistry* 46(20):4265–72. doi: 10.1021/jm030266r.
144. Medes, Grace, Alice Thomas, i Sidney Weinhouse. 1953. „Metabolism of Neoplastic Tissue. IV. A Study of Lipid Synthesis in Neoplastic Tissue Slices in Vitro”. *Cancer Research* 13(1).
145. Menendez, Javier A., i Ruth Lupu. 2007. „Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis”. *Nature Reviews Cancer* 7(10).
146. Meng, Xiangyu, Zhuoxuan Lu, Qingyu Lv, Yongqiang Jiang, Liming Zhang, i Zhifei Wang. 2022. „Tumor metabolism destruction via metformin-based glycolysis inhibition and glucose oxidase-mediated glucose deprivation for enhanced cancer therapy”. *Acta Biomaterialia* 145. doi: 10.1016/j.actbio.2022.04.022.
147. Meng, Xuan-Yu, Hong-Xing Zhang, Mihaly Mezei, i Meng Cui. 2012. „Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery”. *Current Computer Aided-Drug Design* 7(2). doi: 10.2174/157340911795677602.
148. Migita, Toshiro, Tadahito Narita, Kimie Nomura, Erika Miyagi, Fumika Inazuka, Masaaki Matsuura, Masaru Ushijima, Tetsuo Mashima, Hiroyuki Seimiya, Yukitoshi Satoh, Sakae Okumura, Ken Nakagawa, i Yuichi Ishikawa. 2008. „ATP citrate lyase: Activation and therapeutic implications in non-small cell lung cancer”. *Cancer Research* 68(20). doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1235.
149. Mookerjee, Shona A., Akos A. Gerencser, David G. Nicholls, i Martin D. Brand. 2018. „Erratum: Quantifying intracellular rates of glycolytic and oxidative ATP production and consumption using extracellular flux measurements (Journal of Biological Chemistry (2018) 293 (12649-12652) DOI: 10.1074/jbc.M116.774471)”. *Journal of Biological Chemistry* 293(32).
150. Moreno-Sánchez, Rafael, Sara Rodríguez-Enríquez, Alvaro Marín-Hernández, i Emma Saavedra. 2007. „Energy metabolism in tumor cells”. *FEBS Journal* 274(6).

151. Morris, Stephen J., Thomas B. Wiegmann, Larry W. Welling, i Bibie M. Chronwall. 1994. „Rapid Simultaneous Estimation of Intracellular Calcium and pH”. w *Methods in Cell Biology*. T. 40.
152. Mullen, Andrew R., i Ralph J. DeBerardinis. 2012. „Genetically-defined metabolic reprogramming in cancer”. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 23(11).
153. Mullen, Andrew R., William W. Wheaton, Eunsook S. Jin, Pei Hsuan Chen, Lucas B. Sullivan, Tzuling Cheng, Youfeng Yang, W. Marston Linehan, Navdeep S. Chandel, i Ralph J. Deberardinis. 2012. „Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria”. *Nature* 481(7381). doi: 10.1038/nature10642.
154. Muller, G., A. Korndorfer, U. Kornak, i W. J. Malaisse. 1994. „Porin Proteins in Mitochondria from Rat Pancreatic Islet Cells and White Adipocytes: Identification and Regulation of Hexokinase Binding by the Sulfonylurea Glimpiride”. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 308(1):8–23. doi: <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1002>.
155. Musaogullari, Aysenur, Alysia Mandato, i Yuh Cherng Chai. 2020. „Role of Glutathione Depletion and Reactive Oxygen Species Generation on Caspase-3 Activation: A Study With the Kinase Inhibitor Staurosporine”. *Frontiers in Physiology* 11. doi: 10.3389/fphys.2020.00998.
156. Mycielska, Maria E., Ameet Patel, Nahit Rizaner, Maciej P. Mazurek, Hector Keun, Anup Patel, Vadivel Ganapathy, i Mustafa B. A. Djamgoz. 2009. „Citrate transport and metabolism in mammalian cells: Prostate epithelial cells and prostate cancer”. *BioEssays* 31(1).
157. Neary, Catherine L., i John G. Pastorino. 2010. „Nucleocytoplasmic shuttling of hexokinase II in a cancer cell”. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 394(4). doi: 10.1016/j.bbrc.2010.03.129.
158. Nguyen, Christopher, i Siyaram Pandey. 2019. „Exploiting mitochondrial vulnerabilities to trigger apoptosis selectively in cancer cells”. *Cancers* 11(7).
159. Nishi, Shigeo, Susumu Seino, i Graeme I. Bell. 1988. „Human hexokinase: Sequences of amino- and carboxyl-terminal halves are homologous”. *Biochemical*

- and Biophysical Research Communications* 157(3). doi: 10.1016/S0006-291X(88)80964-1.
160. Nolfi-Donagan, Deirdre, Andrea Braganza, i Sruti Shiva. 2020. „Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement”. *Redox Biology* 37.
  161. Nowell, Peter C. 1976. „The clonal evolution of tumor cell populations”. *Science* 194(4260). doi: 10.1126/science.959840.
  162. Obara-Michlewska, Marta, i Monika Szeliga. 2020. „Targeting glutamine addiction in Gliomas”. *Cancers* 12(2).
  163. Owen, Shawn C., Allison K. Doak, Pascal Wassam, Molly S. Shoichet, i Brian K. Shoichet. 2012. „Colloidal aggregation affects the efficacy of anticancer drugs in cell culture”. *ACS Chemical Biology* 7(8). doi: 10.1021/cb300189b.
  164. Palmer, Clovis S. 2022. „Innate metabolic responses against viral infections”. *Nature Metabolism* 4(10).
  165. Pan, Chaoyun, Bo Li, i M. Celeste Simon. 2021. „Moonlighting functions of metabolic enzymes and metabolites in cancer”. *Molecular Cell* 81(18).
  166. Park, Joshua K., Nathan J. Coffey, Aaron Limoges, i Anne Le. 2018. „The heterogeneity of lipid metabolism in cancer”. w *Advances in Experimental Medicine and Biology*. T. 1063.
  167. Pastorino, John G, Nataly Shulga, i Jan B. Hoek. 2002. „Mitochondrial Binding of Hexokinase II Inhibits Bax-induced Cytochrome c Release and Apoptosis\*”. *Journal of Biological Chemistry* 277(9):7610–18. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M109950200>.
  168. Patra, Krushna C., i Nissim Hay. 2014. „The pentose phosphate pathway and cancer”. *Trends in Biochemical Sciences* 39(8).
  169. Patra, Krushna C., Qi Wang, Prashanth T. Bhaskar, Luke Miller, Zebin Wang, Will Wheaton, Navdeep Chandel, Markku Laakso, William J. Muller, Eric L. Allen, Abhishek K. Jha, Gromoslaw A. Smolen, Michelle F. Clasquin, R. Brooks Robey, i Nissim Hay. 2013. „Hexokinase 2 is required for tumor initiation and maintenance and its systemic deletion is therapeutic in mouse models of cancer”. *Cancer Cell* 24(2). doi: 10.1016/j.ccr.2013.06.014.

170. Pedersen, Peter L. 2007. „Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the «Warburg Effect», i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen”. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 39(3).
171. Pedersen, Peter L., Saroj Mathupala, Annette Rempel, J. F. Geschwind, i Young Hee Ko. 2002. „Mitochondrial bound type II hexokinase: A key player in the growth and survival of many cancers and an ideal prospect for therapeutic intervention”. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1555(1–3). doi: 10.1016/S0005-2728(02)00248-7.
172. Pelicano, H., D. S. Martin, R. H. Xu, i P. Huang. 2006. „Glycolysis inhibition for anticancer treatment”. *Oncogene* 25(34).
173. Perillo, Bruno, Marzia Di Donato, Antonio Pezone, Erika Di Zazzo, Pia Giovannelli, Giovanni Galasso, Gabriella Castoria, i Antimo Migliaccio. 2020. „ROS in cancer therapy: the bright side of the moon”. *Experimental and Molecular Medicine* 52(2):192–203.
174. Perrin-Cocon, Laure, Pierre Olivier Vidalain, Clémence Jacquemin, Anne Aublin-Gex, Keedrian Olmstead, Baptiste Panthu, Gilles Jeans Philippe Rautureau, Patrice André, Piotr Nyczka, Marc Thorsten Hütt, Nivea Amoedo, Rodrigue Rossignol, Fabian Volker Filipp, Vincent Lotteau, i Olivier Diaz. 2021. „A hexokinase isoenzyme switch in human liver cancer cells promotes lipogenesis and enhances innate immunity”. *Communications Biology* 4(1). doi: 10.1038/s42003-021-01749-3.
175. Petrick, Jessica L., Andrea A. Florio, Ariana Znaor, David Ruggieri, Mathieu Laversanne, Christian S. Alvarez, Jacques Ferlay, Patricia C. Valery, Freddie Bray, i Katherine A. McGlynn. 2020. „International trends in hepatocellular carcinoma incidence, 1978–2012”. *International Journal of Cancer* 147(2). doi: 10.1002/ijc.32723.
176. Pinton, Paolo, Anna Romagnoli, Rosario Rizzuto, i Carlotta Giorgi. 2008. „Ca<sup>2+</sup> Signaling, Mitochondria and Cell Death”. *Current Molecular Medicine* 8(2). doi: 10.2174/156652408783769571.

177. Porporato, Paolo E., Suveera Dhup, Rajesh K. Dadhich, Tamara Copetti, i Pierre Sonveaux. 2011. „Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: A comprehensive review”. *Frontiers in Pharmacology* AUG. doi: 10.3389/fphar.2011.00049.
178. Raez, Luis E., Kyriakos Papadopoulos, Alejandro D. Ricart, E. Gabriella Chiorean, Robert S. Dipaola, Mark N. Stein, Caio M. Rocha Lima, James J. Schlesselman, Khaled Tolba, Virginia K. Langmuir, Stewart Kroll, Donald T. Jung, Metin Kurtoglu, Joseph Rosenblatt, i Theodore J. Lampidis. 2013. „A phase i dose-escalation trial of 2-deoxy-d-glucose alone or combined with docetaxel in patients with advanced solid tumors”. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 71(2). doi: 10.1007/s00280-012-2045-1.
179. Rai, Yogesh, Priyanshu Yadav, Neeraj Kumari, Namita Kalra, i Anant Narayan Bhatt. 2019. „Hexokinase II inhibition by 3-bromopyruvate sensitizes myeloid leukemic cells K-562 to anti-leukemic drug, daunorubicin”. *Bioscience Reports* 39(9). doi: 10.1042/bsr20190880.
180. Rattigan, Yanique I., Brijesh B. Patel, Ellen Ackerstaff, George Sukenick, Jason A. Koutcher, John W. Glod, i Debabrata Banerjee. 2012. „Lactate is a mediator of metabolic cooperation between stromal carcinoma associated fibroblasts and glycolytic tumor cells in the tumor microenvironment”. *Experimental Cell Research* 318(4). doi: 10.1016/j.yexcr.2011.11.014.
181. Redza-Dutordoir, Maureen, i Diana A. Averill-Bates. 2021. „Interactions between reactive oxygen species and autophagy: Special issue: Death mechanisms in cellular homeostasis”. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1868(8). doi: 10.1016/j.bbamcr.2021.119041.
182. Reitzer, L. J., B. M. Wice, i D. Kennell. 1979. „Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells”. *Journal of Biological Chemistry* 254(8). doi: 10.1016/s0021-9258(17)30124-2.
183. Repas, Jernej, Mateja Zupin, Maja Vodlan, Peter Veranič, Boris Gole, Uroš Potočnik, i Mojca Pavlin. 2022. „Dual Effect of Combined Metformin and 2-Deoxy-D-Glucose Treatment on Mitochondrial Biogenesis and PD-L1 Expression

- in Triple-Negative Breast Cancer Cells”. *Cancers* 14(5). doi: 10.3390/cancers14051343.
184. Rimessi, Alessandro, Carlotta Giorgi, Paolo Pinton, i Rosario Rizzuto. 2008. „The versatility of mitochondrial calcium signals: From stimulation of cell metabolism to induction of cell death”. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1777(7–8).
185. Roberts, David J., Valerie P. Tan-Sah, Eric Y. Ding, Jeffery M. Smith, i Shigeki Miyamoto. 2014. „Hexokinase-II Positively Regulates Glucose Starvation-Induced Autophagy through TORC1 Inhibition”. *Molecular Cell* 53(4). doi: 10.1016/j.molcel.2013.12.019.
186. Roche, Thomas E., i Richard L. Cate. 1976. „Evidence for lipoic acid mediated NADH and acetyl-CoA stimulation of liver and kidney pyruvate dehydrogenase kinase”. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 72(4). doi: 10.1016/S0006-291X(76)80166-0.
187. Rodríguez-Saavedra, Carolina, Luis Enrique Morgado-Martínez, Andrés Burgos-Palacios, Beatriz King-Díaz, Montserrat López-Coria, i Sobeida Sánchez-Nieto. 2021. „Moonlighting Proteins: The Case of the Hexokinases”. *Frontiers in Molecular Biosciences* 8.
188. Rysman, Evelien, Koen Brusselmans, Katryn Scheys, Leen Timmermans, Rita Derua, Sebastian Munck, Paul P. Van Veldhoven, David Waltregny, Veerle W. Daniëls, Jelle Machiels, Frank Vanderhoydonc, Karine Smans, Etienne Waelkens, Guido Verhoeven, i Johannes V. Swinnen. 2010. „De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation”. *Cancer Research* 70(20). doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3871.
189. Saed, Ghassan M., Nicole M. Fletcher, Zhong L. Jiang, Husam M. Abu-Soud, i Michael P. Diamond. 2011. „Dichloroacetate induces apoptosis of epithelial ovarian cancer cells through a mechanism involving modulation of oxidative stress”. *Reproductive Sciences* 18(12). doi: 10.1177/1933719111411731.



190. Salani, Barbara, Cecilia Marini, Alberto Del Rio, Silvia Ravera, Michela Massollo, Anna Maria Orengo, Adriana Amaro, Mario Passalacqua, Sara Maffioli, Ulrich Pfeffer, Renzo Cordera, Davide Maggi, i Gianmario Sambuceti. 2013. „Metformin impairs glucose consumption and survival in Calu-1 cells by Direct Inhibition of Hexokinase-II”. *Scientific Reports* 3. doi: 10.1038/srep02070.
191. Salani, Barbara, Alberto Del Rio, Cecilia Marini, Gianmario Sambuceti, Renzo Cordera, i Davide Maggi. 2014. „Metformin, cancer and glucose metabolism”. *Endocrine-Related Cancer* 21(6):R461–71.
192. Samant, Hrishikesh, Hosein Shokouh Amiri, i Gazi B. Zibari. 2021. „Addressing the worldwide hepatocellular carcinoma: Epidemiology, prevention and management”. *Journal of Gastrointestinal Oncology* 12:361–73.
193. El Sayed, Salah Mohamed, Walaa Gamal Mohamed, Minnat Allah Hassan Seddik, Al Shimaa Ahmed Ahmed, Asmaa Gamal Mahmoud, Wael Hassan Amer, Manal Mohamed Helmy Nabo, Ahmed Roshdi Hamed, Nagwa Sayed Ahmed, i Ali Abdel Rahman Abd-Allah. 2014. „Safety and outcome of treatment of metastatic melanoma using 3-bromopyruvate: A concise literature review and case study”. *Chinese Journal of Cancer* 33(7). doi: 10.5732/cjc.013.10111.
194. Schicht, Gerda, Lena Seidemann, Rene Haensel, Daniel Seehofer, i Georg Damm. 2022. „Critical Investigation of the Usability of Hepatoma Cell Lines HepG2 and Huh7 as Models for the Metabolic Representation of Resectable Hepatocellular Carcinoma”. *Cancers* 14(17). doi: 10.3390/cancers14174227.
195. Schiliro, Chelsea, i Bonnie L. Firestein. 2021. „Mechanisms of metabolic reprogramming in cancer cells supporting enhanced growth and proliferation”. *Cells* 10(5).
196. Schiliro, Chelsea, i Bonnie L. Firestein. 2022. „Correction:Mechanisms of Metabolic Reprogramming in Cancer Cells Supporting Enhanced Growth and Proliferation(Cells, (2021), 10, (1056), 10.3390/cells10051056)”. *Cells* 11(22).
197. Schwab, David A., i John E. Wilson. 1991. „Complete amino acid sequence of the type III isozyme of rat hexokinase, deduced from the cloned cDNA”. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 285(2). doi: 10.1016/0003-9861(91)90373-Q.

198. Scior, Thomas, Andreas Bender, Gary Tresadern, Jose L. Medina-Franco, Karina Martínez-Mayorga, Thierry Langer, Karina Cuanalo-Contreras, i Dimitris K. Agrafiotis. 2012. „Recognizing pitfalls in virtual screening: A critical review”. *Journal of Chemical Information and Modeling* 52(4).
199. Scrutton, Michael C., i Merton F. Utter. 1965. „Pyruvate Carboxylase”. *Journal of Biological Chemistry* 240(1):1–9. doi: 10.1016/s0021-9258(18)97605-2.
200. Seyfried, Thomas N. 2015. „Cancer as a mitochondrial metabolic disease”. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 3(JUL). doi: 10.3389/fcell.2015.00043.
201. Shan, Wenying, Yan Zhou, i Kin Yip Tam. 2022. „The development of small-molecule inhibitors targeting hexokinase 2”. *Drug Discovery Today* 27(9).
202. Shen, Yuqing, Paolo Vignali, i Ruoning Wang. 2017. „Rapid Profiling Cell Cycle by Flow Cytometry Using Concurrent Staining of DNA and Mitotic Markers”. *BIO-PROTOCOL* 7(16). doi: 10.21769/bioprotoc.2517.
203. Shin, Cheol Min, Nayoung Kim, Kyungdo Han, Bongseong Kim, Jin Hyung Jung, Tae Jung Oh, i Dong Ho Lee. 2020. „Anti-diabetic medications and the risk for colorectal cancer: A population-based nested case-control study”. *Cancer Epidemiology* 64. doi: 10.1016/j.canep.2019.101658.
204. Shiratori, Reika, Kenta Furuichi, Masashi Yamaguchi, Natsumi Miyazaki, Haruna Aoki, Hiroji Chibana, Kousei Ito, i Shigeki Aoki. 2019. „Glycolytic suppression dramatically changes the intracellular metabolic profile of multiple cancer cell lines in a mitochondrial metabolism-dependent manner”. *Scientific Reports* 9(1). doi: 10.1038/s41598-019-55296-3.
205. Shutt, Damon C., M. Sue O’Dorisio, Nukhet Aykin-Burns, i Douglas R. Spitz. 2010. „2-Deoxy-D-glucose induces oxidative stress and cell killing in human neuroblastoma cells”. *Cancer Biology and Therapy* 9(11). doi: 10.4161/cbt.9.11.11632.
206. Siegel, Rebecca L., Kimberly D. Miller, i Ahmedin Jemal. 2019. „Cancer statistics, 2019”. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 69(1). doi: 10.3322/caac.21551.

207. Singh, Ankita, i Ellora Sen. 2017. „Reciprocal role of SIRT6 and Hexokinase 2 in the regulation of autophagy driven monocyte differentiation”. *Experimental Cell Research* 360(2). doi: 10.1016/j.yexcr.2017.09.028.
208. Smeele, Kirsten M. A., Richard Southworth, Rongxue Wu, Chaoqin Xie, Rianne Nederlof, Alice Warley, Jessica K. Nelson, Pepijn Van Horsen, Jeroen P. Van Den Wijngaard, Sami Heikkinen, Markku Laakso, Anneke Koeman, Maria Siebes, Otto Eerbeek, Fadi G. Akar, Hossein Ardehali, Markus W. Hollmann, i Coert J. Zuurbier. 2011. „Disruption of hexokinase II-mitochondrial binding blocks ischemic preconditioning and causes rapid cardiac necrosis”. *Circulation Research* 108(10). doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.244962.
209. Spinelli, Jessica B., i Marcia C. Haigis. 2018. „The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism”. *Nature Cell Biology* 20(7).
210. Stark, George R., i William R. Taylor. 2004. „Analyzing the G2/M checkpoint.” *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 280.
211. Stine, Zachary E., Zachary T. Schug, Joseph M. Salvino, i Chi V. Dang. 2022. „Targeting cancer metabolism in the era of precision oncology”. *Nature Reviews Drug Discovery* 21(2).
212. Sun, Linchong, Huafeng Zhang, i Ping Gao. 2022. „Metabolic reprogramming and epigenetic modifications on the path to cancer”. *Protein and Cell* 13(12).
213. Suresh, Diwakar, Akshatha N. Srinivas, i Divya P. Kumar. 2020. „Etiology of Hepatocellular Carcinoma: Special Focus on Fatty Liver Disease”. *Frontiers in Oncology* 10.
214. Sylvester, Paul W. 2011. „Optimization of the Tetrazolium Dye (MTT) Colorimetric Assay for Cellular Growth and Viability”. w *Methods in Molecular Biology*. T. 716.
215. Szymczak-Pajor, Izabela, Krzysztof Fleszar, Jacek Kasznicki, Patrycja Gralewska, i Agnieszka Śliwińska. 2021. „A potential role of calpains in sulfonylureas (SUs) –mediated death of human pancreatic cancer cells (1.2B4)”. *Toxicology in Vitro* 73. doi: 10.1016/j.tiv.2021.105128.

216. Tan, Valerie P., i Shigeki Miyamoto. 2015. „HKII/hexokinase-II integrates glycolysis and autophagy to confer cellular protection”. *Autophagy* 11(6). doi: 10.1080/15548627.2015.1042195.
217. Tan, Valerie P., i Shigeki Miyamoto. 2016. „Nutrient-sensing mTORC1: Integration of metabolic and autophagic signals”. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 95.
218. Teslaa, Tara, i Michael A. Teitell. 2014. „Techniques to monitor glycolysis”. w *Methods in Enzymology*. T. 542.
219. Thiesen, Aducio L. 2021. „Hepatocellular Carcinoma in Adults”. w *Liver Cancer*.
220. Thornberry, Nancy A., Thomas A. Rano, Erin P. Peterson, Dita M. Rasper, Tracy Timkey, Margarita Garcia-Calvo, Vicky M. Houtzager, Penny A. Nordstrom, Sophie Roy, John P. Vaillancourt, Kevin T. Chapman, i Donald W. Nicholson. 1997. „A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B: Functional relationships established for key mediators of apoptosis”. *Journal of Biological Chemistry* 272(29). doi: 10.1074/jbc.272.29.17907.
221. Togayachi, Akira, Yuko Kozono, Atsushi Kuno, Takashi Ohkura, Takashi Sato, Jun Hirabayashi, Yuzuru Ikehara, i Hisashi Narimatsu. 2010. „ $\beta$ 3GnT2 (B3GNT2), a Major Polylysosamine Synthase: Analysis of B3gnt2-Deficient Mice”. w *Methods in Enzymology*. T. 479.
222. Tohme, Samer, David A. Geller, Jon S. Cardinal, Hui Wei Chen, Vignesh Packiam, Srinevas Reddy, Jennifer Steel, James W. Marsh, i Allan Tsung. 2013. „Radiofrequency ablation compared to resection in early-stage hepatocellular carcinoma”. *HPB* 15(3). doi: 10.1111/j.1477-2574.2012.00541.x.
223. Turyn, J., B. Schlichtholz, A. Dettlaff-Pokora, M. Presler, E. Goyke, M. Matuszewski, Z. Kmieć, K. Krajka, i J. Swierczynski. 2003. „Increased Activity of Glycerol 3-phosphate Dehydrogenase and Other Lipogenic Enzymes in Human Bladder Cancer”. *Hormone and Metabolic Research* 35(10). doi: 10.1055/s-2003-43500.

224. Vanhove, Karolien, Elie Derveaux, Geert Jan Graulus, Liesbet Mesotten, Michiel Thomeer, Jean Paul Noben, Wanda Guedens, i Peter Adriaensens. 2019. „Glutamine addiction and therapeutic strategies in lung cancer”. *International Journal of Molecular Sciences* 20(2).
225. Vazquez, Alexei, Jiangxia Liu, Yi Zhou, i Zoltán N. Oltvai. 2010. „Catabolic efficiency of aerobic glycolysis: The Warburg effect revisited”. *BMC Systems Biology* 4. doi: 10.1186/1752-0509-4-58.
226. Vázquez, Javier, Manel López, Enric Gibert, Enric Herrero, i F. Javier Luque. 2020. „Merging ligand-based and structure-based methods in drug discovery: an overview of combined virtual screening approaches”. *Molecules* 25(20).
227. Wang, Gangyang, Tao Zhang, Wei Sun, Hongsheng Wang, Fei Yin, Zhuoying Wang, Dongqing Zuo, Mengxiong Sun, Zifei Zhou, Binhui Lin, Jing Xu, Yingqi Hua, Haoqing Li, i Zhengdong Cai. 2017. „Arsenic sulfide induces apoptosis and autophagy through the activation of ROS/JNK and suppression of Akt/mTOR signaling pathways in osteosarcoma”. *Free Radical Biology and Medicine* 106. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.015.
228. Wang, Guang L., i Gregg L. Semenza. 1995. „Purification and characterization of hypoxia-inducible factor”. *Journal of Biological Chemistry* 270(3). doi: 10.1074/jbc.270.3.1230.
229. Wang, Li, Jing Jing Li, Li Yu Guo, Peipei Li, Zhiqiang Zhao, Haisheng Zhou, i Li Jun Di. 2018. „Molecular link between glucose and glutamine consumption in cancer cells mediated by ctbp and sirt4”. *Oncogenesis* 7(3). doi: 10.1038/s41389-018-0036-8.
230. Wang, Yi, Xin De Zheng, Gui Qi Zhu, Na Li, Chang Wu Zhou, Chun Yang, i Meng Su Zeng. 2022. „Crosstalk Between Metabolism and Immune Activity Reveals Four Subtypes With Therapeutic Implications in Clear Cell Renal Cell Carcinoma”. *Frontiers in Immunology* 13. doi: 10.3389/fimmu.2022.861328.
231. Warburg, Otto. 1956. *SCIENCE Injuring of Respiration On the Origin of Cancer Cells*. T. 123.

232. Warburg, Otto Heinrich. 2010. „The classic: The chemical constitution of respiration ferment.” *Clinical orthopaedics and related research* 468(11).
233. Weber, Georg F. 2016. „Time and circumstances: Cancer cell metabolism at various stages of disease progression”. *Frontiers in Oncology* 6(DEC).
234. Wei, Qinyao, Yun Qian, Jun Yu, i Chi Chun Wong. 2020. „Metabolic rewiring in the promotion of cancer metastasis: mechanisms and therapeutic implications”. *Oncogene* 39(39).
235. Wilhelm, Scott, Christopher Carter, Mark Lynch, Timothy Lowinger, Jacques Dumas, Roger A. Smith, Brian Schwartz, Ronit Simantov, i Susan Kelley. 2006. „Discovery and development of sorafenib: A multikinase inhibitor for treating cancer”. *Nature Reviews Drug Discovery* 5(10).
236. Wilson, John E. 2003. „Isozymes of mammalian hexokinase: Structure, subcellular localization and metabolic function”. *Journal of Experimental Biology* 206(12).
237. Wolf, Amparo, Sameer Agnihotri, Johann Micallef, Joydeep Mukherjee, Nesrin Sabha, Rob Cairns, Cynthia Hawkins, i Abhijit Guha. 2011. „Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme”. *Journal of Experimental Medicine* 208(2). doi: 10.1084/jem.20101470.
238. Wolf, Andrea J., Christopher N. Reyes, Wenbin Liang, Courtney Becker, Kenichi Shimada, Matthew L. Wheeler, Hee Cheol Cho, Narcis I. Popescu, K. Mark Coggeshall, Moshe Arditi, i David M. Underhill. 2016. „Hexokinase Is an Innate Immune Receptor for the Detection of Bacterial Peptidoglycan”. *Cell* 166(3). doi: 10.1016/j.cell.2016.05.076.
239. Woo, Yu Mi, Yubin Shin, Eun Ji Lee, Sunyoung Lee, Seung Hun Jeong, Hyun Kyung Kong, Eun Young Park, Hyoung Kyu Kim, Jin Han, Minsun Chang, i Jong Hoon Park. 2015. „Inhibition of aerobic glycolysis represses Akt/mTOR/HIF-1 $\alpha$  axis and restores tamoxifen sensitivity in antiestrogen-resistant breast cancer cells”. *PLoS ONE* 10(7). doi: 10.1371/journal.pone.0132285.

240. Wu, Eric M., Linda L. Wong, Brenda Y. Hernandez, Jun-Fang Ji, Wei Jia, Sandi A. Kwee, i Sumodh Kalathil. 2018. „Gender differences in hepatocellular cancer: disparities in nonalcoholic fatty liver disease/steatohepatitis and liver transplantation”. *Hepatoma Research* 4(10). doi: 10.20517/2394-5079.2018.87.
241. Wu, Min, Andy Neilson, Amy L. Swift, Rebecca Moran, James Tamagnine, Diane Parslow, Suzanne Armistead, Kristie Lemire, Jim Orrell, Jay Teich, Steve Chomicz, i David A. Ferrick. 2007. „Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells”. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 292(1). doi: 10.1152/ajpcell.00247.2006.
242. Xu, Mei Hua, i Gui Ying Zhang. 2005. „Effect of indomethacin on cell cycle proteins in colon cancer cell lines”. *World Journal of Gastroenterology* 11(11). doi: 10.3748/wjg.v11.i11.1693.
243. Yahagi, Naoya, Hitoshi Shimano, Kiyoshi Hasegawa, Kenichi Ohashi, Takashi Matsuzaka, Yuho Najima, Motohiro Sekiya, Sachiko Tomita, Hiroaki Okazaki, Yoshiaki Tamura, Yoko Iizuka, Ken Ohashi, Ryoza Nagai, Shun Ishibashi, Takashi Kadowaki, Masatoshi Makuuchi, Shin Ohnishi, Jun Ichi Osuga, i Nobuhiro Yamada. 2005. „Co-ordinate activation of lipogenic enzymes in hepatocellular carcinoma”. *European Journal of Cancer* 41(9). doi: 10.1016/j.ejca.2004.12.037.
244. Yancy, Haile F., Jacqueline A. Mason, Sharla Peters, Charles E. Thompson, George K. Littleton, Marti Jett, i Agnes A. Day. 2007. „Metastatic progression and gene expression between breast cancer cell lines from African American and Caucasian women”. *Journal of Carcinogenesis* 6. doi: 10.1186/1477-3163-6-8.
245. Yang, Chendong, Lei Jiang, Huafeng Zhang, Larissa A. Shimoda, Ralph J. Deberardinis, i Gregg L. Semenza. 2014. „Analysis of hypoxia-induced metabolic reprogramming”. w *Methods in Enzymology*. T. 542.
246. Yang, Ju Dong, Pierre Hainaut, Gregory J. Gores, Amina Amadou, Amelie Plymoth, i Lewis R. Roberts. 2019. „A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management”. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 16(10).

247. Yang, Lifeng, Sriram Veneti, i Deepak Nagrath. 2017. „Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism”. *Annual Review of Biomedical Engineering* 19. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071516-044546.
248. Ye, Cai Guo, William Ka Kei Wu, John Hok Keung Yeung, Hai Tao Li, Zhi Jie Li, Clover Ching Man Wong, Shun Xiang Ren, Lin Zhang, Kwok Pui Fung, i Chi Hin Cho. 2011. „Indomethacin and SC236 enhance the cytotoxicity of doxorubicin in human hepatocellular carcinoma cells via inhibiting P-glycoprotein and MRP1 expression”. *Cancer Letters* 304(2). doi: 10.1016/j.canlet.2011.01.025.
249. Yoon, Sarah, Min Young Lee, Sahng Wook Park, Jong Seok Moon, Yoo Kyung Koh, Yong Ho Ahn, Byeong Woo Park, i Kyung Sup Kim. 2007. „Up-regulation of acetyl-CoA carboxylase  $\alpha$  and fatty acid synthase by human epidermal growth factor receptor 2 at the translational level in breast cancer cells”. *Journal of Biological Chemistry* 282(36). doi: 10.1074/jbc.M702854200.
250. Yun, Chul Won, i Sang Hun Lee. 2018. „The roles of autophagy in cancer”. *International Journal of Molecular Sciences* 19(11).
251. Zatorska, Agnieszka, Janusz Maszewski, i Zofia Jóżywiak. b.d. *Changes in GSH-antioxidant system induced by daunorubicin in human normal and diabetic fibroblasts.*
252. Zhan, Ze Tao, Lu Liu, Ming Zhen Cheng, Yi Gao, i Wei Jie Zhou. 2022. „The Effects of 6 Common Antidiabetic Drugs on Anti-PD1 Immune Checkpoint Inhibitor in Tumor Treatment”. *Journal of Immunology Research* 2022. doi: 10.1155/2022/2651790.
253. Zhang, Guang Sen, Chuan Qing Tu, Gui Ying Zhang, Guang Biao Zhou, i Wen Li Zheng. 2000. „Indomethacin induces apoptosis and inhibits proliferation in chronic myeloid leukemia cells”. *Leukemia Research* 24(5). doi: 10.1016/S0145-2126(99)00198-8.
254. Zhang Guang-sen, Zhou Guang-biao, Dai Chong-wen. b.d. *Upregulation and activation of caspase-3 or caspase-8 and elevation of intracellular free calcium mediated apoptosis of indomethacin-induced K562 cells.*



255. Zhang, Ji, Natalya N. Pavlova, i Craig B. Thompson. 2017. „Cancer cell metabolism: the essential role of the nonessential amino acid, glutamine”. *The EMBO Journal* 36(10):1302–15. doi: 10.15252/embj.201696151.
256. Zhang, Qi, Jing Pan, Paula E. North, Shoua Yang, Ronald A. Lubet, Yian Wang, i Ming You. 2012. „Aerosolized 3-bromopyruvate inhibits lung tumorigenesis without causing liver toxicity”. *Cancer Prevention Research* 5(5). doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0338.
257. Zhang, Xiao Yan, Meng Zhang, Qing Cong, Ming Xing Zhang, Meng Yu Zhang, Ying Ying Lu, i Cong Jian Xu. 2018. „Hexokinase 2 confers resistance to cisplatin in ovarian cancer cells by enhancing cisplatin-induced autophagy”. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 95. doi: 10.1016/j.biocel.2017.12.010.
258. Zhang, Yi, Qiong Li, Zhao Huang, Bowen Li, Edouard C. Nice, Canhua Huang, Liuya Wei, i Bingwen Zou. 2022. „Targeting Glucose Metabolism Enzymes in Cancer Treatment: Current and Emerging Strategies”. *Cancers* 14(19).
259. Zhang, Yi, i Jin Ming Yang. 2013. „Altered energy metabolism in cancer: A unique opportunity for therapeutic intervention”. *Cancer Biology and Therapy* 14(2).
260. Zhang, Youjun, Arun Sampathkumar, Sandra Mae Lin Kerber, Corné Swart, Carsten Hille, Kumar Seerangan, Alexander Graf, Lee Sweetlove, i Alisdair R. Fernie. 2020. „A moonlighting role for enzymes of glycolysis in the co-localization of mitochondria and chloroplasts”. *Nature Communications* 11(1). doi: 10.1038/s41467-020-18234-w.
261. Zhao, Ru Zhou, Shuai Jiang, Lin Zhang, i Zhi Bin Yu. 2019. „Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review)”. *International Journal of Molecular Medicine* 44(1).
262. Zhao, Songji, Yuji Kuge, ; Takafumi Mochizuki, Toshiyuki Takahashi, Kunihiro Nakada, Masayuki Sato, Toshiki Takei, i Nagara Tamaki. b.d. *Biologic Correlates of Intratumoral Heterogeneity in 18 F-FDG Distribution with*

*Regional Expression of Glucose Transporters and Hexokinase-II in Experimental Tumor.*

263. Zheng, Jie. 2012. „Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (review)”. *Oncology Letters* 4(6).
264. Zheng, Mengzhu, Canrong Wu, Kaiyin Yang, Yueying Yang, Yang Liu, Suyu Gao, Qiqi Wang, Chen Li, Lixia Chen, i Hua Li. 2021. „Novel selective hexokinase 2 inhibitor Benitrobenrazide blocks cancer cells growth by targeting glycolysis”. *Pharmacological Research* 164. doi: 10.1016/j.phrs.2020.105367.
265. Zhou, Yan, Yizhen Guo, i Kin Yip Tam. 2022. „Targeting glucose metabolism to develop anticancer treatments and therapeutic patents”. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 32(4).
266. Zhou, Youyou, Zunnan Huang, Juan Su, Jie Li, Shuang Zhao, Lisha Wu, Jiang Ling Zhang, Yijing He, Guigui Zhang, Juan Tao, Jianda Zhou, Xiang Chen, i Cong Peng. 2020. „Benserazide is a novel inhibitor targeting PKM2 for melanoma treatment”. *International Journal of Cancer* 147(1). doi: 10.1002/ijc.32756.
267. Zu, Xin Lin, i Michael Guppy. 2004. „Cancer metabolism: Facts, fantasy, and fiction”. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313(3).
268. Zucman-Rossi, Jessica, Augusto Villanueva, Jean Charles Nault, i Josep M. Llovet. 2015. „Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma”. *Gastroenterology* 149(5). doi: 10.1053/j.gastro.2015.05.061.