

Raki jelita grubego i odbytu są trzecim z kolei rozpowszechnionym nowotworem na świecie, a w Polsce każdego roku notowanych jest 11,5 tysiąca zachorowań. Pomimo znacznego postępu we wczesnym wykrywaniu i leczeniu śmiertelność pozostaje ciągle wysoka i wynosi 62%. Leczenie i utrzymanie chorych na raki okrężnicy oraz odbytu jest dużym obciążeniem dla systemu opieki zdrowotnej. Ponieważ obecnie dopuszczone terapie zawodzą w przypadku znaczącej liczby chorych ciągle poszukuje się nowych efektywnych kombinacji leków.

Modyfikacje epigenetyczne DNA np. zwiększenie jego metylacji obecne w komórkach nowotworowych prowadzi często do zatrzymania ekspresji nowotworowych genów supresorowych. Czynniki zahamowanie metylacji atrakcyjnym celem terapeutycznym samym w sobie lub służącym uwrażliwieniu komórek nowotworowych na inne chemioterapeutyki. Analogi cytydyny 5-aza-2'-deoksytydina i 5-azacytydina w latach 2006 i 2004 zostały dopuszczone przez Amerykańską Agencję ds. Leków i Żywności jako chemioterapeutyki do leczenia syndromów mieloblastycznych. Ich mechanizm działania przewiduje wbudowanie się związku do DNA (a w przypadku 5-azacytydyny również do RNA). Wiele badań przedklinicznych wykazywało wysoką skuteczność tych leków przeciwko wielu typom nowotworów, niestety badania kliniczne zwykle wykazywały już ograniczoną skuteczność analogów cytydyny zwłaszcza w terapii guzów litych. Natomiast wielokrotnie obserwowano, że analogi cytydyny mogą zwiększać skuteczność chemioterapeutyków wielu klas np. cisplatyny w raku prostaty czy neuroblastomie, erlotinibu i gefitinibu w ostrych syndromach mieloblastycznych i raku okrężnicy, czy w końcu etopozyny i doksorubicyny w neuroblastomach. Jednak wyniki tych badań jak i proponowane mechanizmy często pozostają sprzeczne.

W naszych badaniach wykazaliśmy, że niskie stężenia 5-aza-cytydyny długotrwale uwrażliwiają na działanie całej klasy chemioterapeutyków jakimi są inhibitory topizomeraz. Efekt ten był obserwowany w szerokim spektrum komórek nowotworowych pochodzących z raków jelita grubego, niezależnie od ich profilu genetycznego, również w komórkach początkowo opornych na działanie inhibitorów topizomeraz. Wyniki te zachęcają do podjęcia odpowiednich badań na modelu zwierzęcym ludzkiego raka okrężnicy *in vivo*.

Dlatego **podstawowym celem proponowanego projektu jest określenie skuteczności synergicznego traktowania azanukleozydów i inhibitorów topizomeraz w zwierzęcym modelu ludzkiego raka okrężnicy**. Zastosowanie schematu, gdzie podawanie dwóch chemioterapeutykami odbywa się w dużym odstępie czasowym, a także możliwość znaczącego zmniejszenia efektywnego stężenia inhibitorów topizomeraz może pozwolić na znaczącą redukcję niepożądanych reakcji związanych z chemioterapią. W badaniach dotyczących mechanizmu działania ustaliliśmy, że zwiększenie skuteczności inhibitorów topizomeraz po traktowaniu 5-azanukleozydami wymaga co najmniej 2-dniowej przerwy pomiędzy traktowaniami i dotyczy tylko 5-aza-cytydyny, których oddziaływanie polega na interkalacji w nić DNA. Oba te fakty sugerują, że wbudowanie 5-azanukleozydów do DNA jest kluczowym elementem uwrażliwienia na działanie inhibitorów topizomeraz.

Następnym celem tego projektu jest poznanie natury działania i długoterminowych efektów 5-aza-dC i inhibitorów topizomeraz na komórki nowotworowe *in vitro* i *in vivo*.

W samym sercu proponowanego przez nas mechanizmu działania znajduje się współdziałanie stabilizowanych przez leki kompleksów DNA-enzym. Korzystając z wyjątkowego instrumentarium na jakie składa się pułapka optyczna, wysokiej rozdzielczości mikroskop sił atomowych, a także dostęp do rezonansu magnetycznego 2D (COSY and NOESY NMR) pytania dotyczące bezpośredniego wpływu tych chemioterapeutyków na kompleksy transkrypcyjne i replikacyjne możemy zadać wprost.

Trzecim celem tego projektu są badania bezpośredniego mechanizmu cytotoksyczności związanego z oddziaływaniem 5-aza-dC i inhibitorów topizomeraz z DNA prowadzone na poziomie pojedynczych cząsteczek.

Nasze wyniki sugerują, że efekt kombinacji tych dwóch klas chemioterapeutyków wynika z ogólnego mechanizmu, który może zostać wykorzystany w praktyce klinicznej w leczeniu raka okrężnicy i prawdopodobnie innych nowotworów.

Wierzmy, że rezultaty przedstawionego projektu:

- 1) Dadzą odpowiedź na pytanie co do przydatności sekwencyjnej terapii 5-aza-dC w terapii nowotworów. Użycie 5-aza-dC pozwala na znaczące zmniejszenie dawek terapeutycznych inhibitorów topizomerazy, a tym samym ich skutków ubocznych. Może to mieć wpływ na koszty utrzymania leczenia.
- 2) Pokażą mechanizm bezpośredniego wpływu 5-aza-dC i inhibitorów topizomerazy na DNA. Uważamy, że niezależnie od wyniku pierwszej części badań zastosowana interdyscyplinarna metodologia znacząco uzupełni wiedzę na temat molekularnych aspektów działania stosowanych w terapii chemioterapeutyków, co pozwoli na ich bardziej racjonalne użycie w przyszłości.