

lek. Anna Brodziak

Rola przekąźnictwa β_2 -adrenergicznego w patogenezie raka brodawkowego nerki

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w
dyscyplinie nauki medyczne

Promotor:

prof. dr hab. n. med. Agnieszka Cudnoch-Jędrzejewska

prof. dr hab. n. med. Anna Małgorzata Czarnecka

Katedra i Zakład Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej

Warszawski Uniwersytet Medyczny



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2025 r.

Słowa kluczowe:

rak nerki, pRCC, receptor β -adrenergiczny, ADRB

Keywords:

renal cell cancer, pRCC, β -adrenergic, ADRB

Składam serdeczne podziękowania Promotorkom pracy – Pani Profesor Agnieszce Cudnoch-Jędrzewskiej oraz Pani Profesor Annie Czarneckiej – za nieocenioną opiekę naukową, cierpliwość i wsparcie w trakcie wieloletniej współpracy.

Dziękuję Pani Doktor Joannie Trzcńskiej-Danielewicz i Pani Doktor hab. Agnieszce Girstun za współpracę naukową, dzielenie się wiedzą i doświadczeniem, które miały kluczowe znaczenie przy realizacji projektu.

Dziękuję Pawłowi Sobczukowi za ciągłe angażowanie mnie w działalność naukową, dydaktyczną i społeczną na przestrzeni ostatniej dekady.

Krzysiovi – za wszystko. Za nieustające wsparcie statystyczne, edytorskie, naukowe a przede wszystkim życiowe.

Źródła finansowania badań:

Doświadczenia przeprowadzone w pracy zostały częściowo sfinansowane w ramach Projektu Młodego Badacza Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego numer 1MA/1/M/MB/N/20 oraz ze środków statutowych Katedry i Zakładu Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Spis treści

Spis tabel i rycin.....	8
Spis tabel	8
Spis rycin	8
Wykaz stosowanych skrótów	10
Streszczenie w języku polskim	15
Streszczenie w języku angielskim	17
1 Wprowadzenie	19
1.1 Rak nerkowokomórkowy	19
1.1.1 Epidemiologia i czynniki ryzyka	19
1.1.2 Klasyfikacja histologiczna	20
1.1.2.1 Charakterystyka molekularna raka brodawkowego nerki.....	21
1.1.2.2 Leczenie raka brodawkowego nerki	22
1.1.2.3 Rokowanie u pacjentów z rozpoznaniem raka brodawkowego nerki	25
1.2 Receptory β -adrenergiczne	26
1.2.1 Leki wpływające na receptory β -adrenergiczne	27
1.2.2 Podtyp 2 receptora β -adrenergicznego	29
1.2.2.1 Budowa i funkcja receptora β_2 -adrenergicznego	29
1.2.2.2 Rola receptorów β_2 -adrenergicznych w patofizjologii nowotworów złośliwych	31
1.2.2.2.1 Wpływ na proliferację komórek nowotworowych	32
1.2.2.2.2 Wpływ na angiogenezę nowotworową	34
1.2.2.2.3 Wpływ na odpowiedź immunologiczną.....	35
1.2.2.2.4 Wpływ na macierzyste komórki nowotworowe	36
1.2.3 Substancje wpływające na przeżywalność β -adrenergiczne a nowotwory	37
1.2.3.1 Badania przedkliniczne	37

1.2.3.2	Badania epidemiologiczne	43
1.2.3.3	Badania kliniczne	44
1.2.4	Nadciśnienie tętnicze a rak nerki	46
1.2.5	Rola receptorów β_2 -adrenergicznych w raku nerkowokomórkowym	46
2	Założenia i cele pracy	48
2.1	Założenia	48
2.2	Cele	48
3	Materiał i metody	50
3.1	Analiza bioinformatyczna The Cancer Genome Atlas	50
3.2	Hodowle komórkowe	50
3.2.1	Linia komórkowa Caki-1	50
3.2.2	Linia komórkowa 786-O	51
3.2.3	Linia komórkowa Caki-2	51
3.2.4	Linia komórkowa ACHN	51
3.2.5	Hodowla komórkowa	51
3.3	Ocena żywotności komórek – test z AlamarBlue	52
3.4	Izolacja RNA	53
3.5	Ilościowa Reakcja Łańcuchowa Polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR)	53
3.6	Analiza statystyczna	54
4	Wyniki badań	55
4.1	Wyniki analizy bioinformatycznej The Cancer Genome Atlas	55
4.2	Wyniki analizy qRT-PCR ekspresji genu ADRB2 w liniach komórkowych raka nerkowokomórkowego	61
4.3	Wpływ β_2 -agonisty i antagonisty na żywotność komórek raka nerkowokomórkowego	61

4.4	Wpływ β_2 -agonisty i antagonisty na ekspresję genów związanych z fenotypem macierzystych komórek nowotworowych raka brodawkowego nerki.....	63
4.5	Wpływ β_2 -agonisty i antagonisty na ekspresję genów związanych z angiogenezą nowotworowych raka brodawkowego nerki	66
5	Dyskusja.....	69
5.1	Znaczenie ekspresji ADRB2 u pacjentów z rakiem nerkowokomórkowym	69
5.2	Ekspresja genu ADRB2 w liniach komórkowych odzwierciedla ekspresję u pacjentów z rozpoznaniem raka nerkowokomórkowego.....	70
5.3	Wpływ β_2 -agonisty i antagonisty na żywotność komórek raka nerkowokomórkowego	71
5.4	Wpływ β_2 -agonisty i antagonisty na ekspresję genów związanych z fenotypem macierzystych komórek nowotworowych raka brodawkowego nerki.....	72
5.5	Wpływ β_2 -agonisty i antagonisty na ekspresję genów związanych z angiogenezą nowotworowych raka brodawkowego nerki	74
6	Wnioski	76
7	Podsumowanie	77
8	Ograniczenia pracy	78
9	Piśmiennictwo	79
10	Opinia Komisji Bioetycznej.....	96

Spis tabel i rycin

Spis tabel

Tabela 1. Zestawienie wyników leczenia raka brodawkowatego nerki w najważniejszych badaniach klinicznych.....	24
Tabela 2. Wybrane substancje wpływające selektywnie na podtypy receptorów β -adrenergicznych.	28
Tabela 3. Zestawienie wyników wybranych badań przedklinicznych oceniających rolę przekąźnictwa β -adrenergicznego w raku piersi, jelita grubego, żołądka i jajnika.	39
Tabela 4. Zestawienie randomizowanych badań kontrolowanych z wykorzystaniem leków wpływających na przekąźnictwo β -adrenergiczne.	45
Tabela 5. Startery genów badanych w analizie PCR.	54
Tabela 6. Charakterystyka pacjentów z rozpoznaniem brodawkowatego raka nerki (pRCC) na podstawie danych z The Cancer Genome Atlas (TCGA).	57

Spis rycin

Rycina 1. Cykl aktywacji i dezaktywacji receptora β_2 -adrenergicznego.	29
Rycina 2. Ścieżka przekąźnictwa z receptorów β_2 -adrenergicznych.	30
Rycina 3. Wpływ aktywacji receptorów β_2 -adrenergicznych (β_2 -AR) na nowotwór i jego mikrośrodowisko.....	37
Rycina 4. Poziom ekspresji genu <i>ADRB2</i> w różnych nowotworach wg danych z The Cancer Genome Atlas.	55
Rycina 5. Poziom ekspresji genu <i>ADRB2</i> w 2 najczęstszych podtypach histologicznych raka nerki.	56
Rycina 6. a) Poziom ekspresji genu <i>ADRB2</i> u pacjentów z rakiem brodawkowatym nerki (pRCC) w zależności od obecności przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych w momencie diagnozy. b) Odsetek pacjentów z przerzutami w regionalnych węzłach chłonnych w zależności od poziomu ekspresji genu <i>ADRB2</i>	57
Rycina 7. a) Poziom ekspresji genu <i>ADRB2</i> u pacjentów z rakiem brodawkowatym nerki (pRCC) w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego wg 8 edycji klasyfikacji	

AJCC. b) Odsetek pacjentów z pRCC w danym stopniu zaawansowania klinicznego wg 8 edycji klasyfikacji AJCC w zależności od poziomu ekspresji genu <i>ADRB2</i>	58
Rycina 8. Czas przeżycia wolny od progresji (PFS) u pacjentów z rakiem brodawkowatym nerki (pRCC) z wyższym poziomem ekspresji genu <i>ADRB2</i> (<i>ADRB2</i> : EXP ≥ 0) i niższym (<i>ADRB2</i> : EXP < 0).	60
Rycina 9. Czas przeżycia całkowitego (OS) u pacjentów z rakiem brodawkowatym nerki (pRCC) z wyższym poziomem ekspresji genu <i>ADRB2</i> (<i>ADRB2</i> : EXP ≥ 0) i niższym (<i>ADRB2</i> : EXP < 0).....	60
Rycina 10. Wpływ β_2 -AR antagonisty (ICI-118,551) w stężeniach 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M na żywotność komórek linii pRCC: a) Caki-2 i b) ACHN.	61
Rycina 11. Wpływ β_2 -AR agonisty (salbutamol) w stężeniach 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M na żywotność komórek linii pRCC: a) Caki-2 i b) ACHN.	62
Rycina 12. Wpływ β_2 -AR antagonisty (ICI-118,551) i antagonisty (salbutamolu) w stężeniach 10 μ M, 100 μ M na ekspresję genu <i>POU5F1</i> w linii komórkowej ACHN.	63
Rycina 13. Wpływ β_2 -AR antagonisty (ICI-118,551) i antagonisty (salbutamolu) w stężeniach 10 μ M, 100 μ M na ekspresję genu <i>POU5F1</i> w linii komórkowej Caki-2.....	63
Rycina 14. Wpływ β_2 -AR antagonisty (ICI-118,551) i antagonisty (salbutamolu) w stężeniach 10 μ M, 100 μ M na ekspresję genu <i>NES</i> w linii komórkowej ACHN. Błąd! Nie zdefiniowano zakładek.	
Rycina 15. Wpływ β_2 -AR antagonisty (ICI-118,551) i antagonisty (salbutamolu) w stężeniach 10 μ M, 100 μ M na ekspresję genu <i>NES</i> w linii komórkowej Caki-2.	65
Rycina 16. Wpływ β_2 -AR antagonisty (ICI-118,551) i antagonisty (salbutamolu) w stężeniach 10 μ M, 100 μ M na ekspresję genu <i>VEGFA</i> w linii komórkowej ACHN.	66
Rycina 17. Wpływ β_2 -AR antagonisty (ICI-118,551) i antagonisty (salbutamolu) w stężeniach 10 μ M, 100 μ M na ekspresję genu <i>VEGFA</i> w linii komórkowej Caki-2.....	66
Rycina 18. Wpływ β_2 -AR antagonisty (ICI-118,551) i antagonisty (salbutamolu) w stężeniach 10 μ M, 100 μ M na ekspresję genu <i>FLT-1</i> w linii komórkowej ACHN.....	68
Rycina 19. Wpływ β_2 -AR antagonisty (ICI-118,551) i antagonisty (salbutamolu) w stężeniach 10 μ M, 100 μ M na ekspresję genu <i>FLT-1</i> w linii komórkowej Caki-2.	68

Wykaz stosowanych skrótów

ADRB2	– (ang. <i>adrenoceptor beta 2</i>) adrenoreceptor beta 2
ALDH	– (ang. <i>aldehyde dehydrogenase</i>) dehydrogenaza aldehydowa
AP	– (ang. <i>activator protein-1</i>) białko aktywujące 1
ATF	– (ang. <i>activating transcription factor</i>) aktywujący czynnik transkrypcyjny
ALK	– (ang. <i>anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase</i>)
BARK	– (ang. <i>β-adrenergic receptor kinase</i>) β -adrenergiczna kinaza receptorowa
BAP1	– (ang. <i>BRCA1 Associated Deubiquitinase 1</i>)
β ARs	– (ang. <i>β-adrenergic receptors</i>) receptory β -adrenergiczne
CA	– cyklaza adenylanowa
cAMP	– (ang. <i>3',5'-cyclic adenosine monophosphate</i>) cykliczny adenozy- 3',5'-monofosforan
ccRCC	– (ang. <i>clear cell RCC</i>) jasnokomórkowy rak nerki
CDKN2A	– (ang. <i>cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>)
chRCC	– (ang. <i>chromophobe RCC</i>) chromofobowy rak nerki
COX2	– cyklooksygenaza 2
CREB	– (ang. <i>cAMP response element binding protein</i>), białko wiążące się z elementem odpowiedzi na cAMP
CSCs	– (ang. <i>cancer stem cells</i>) nowotworowe komórki macierzyste
CSS	– (ang. <i>cancer-specific survival</i>) czas przeżycia zależny od nowotworu

CTLA-4	– (ang. <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>) antygen-4 cytotoksycznych limfocytów T
CUL3	– (ang. <i>cullin 3</i>)
EGFR	– (ang. <i>epidermal growth factor</i>) naskórkowy czynnik wzrostu nowotworów
EMT	– (ang. <i>epithelial-mesenchymal transition</i>) przejście epitelialno-mezenchymalne
EPAC	– (ang. <i>exchange protein directly activated by cAMP</i>) czynnik wymiany nukleotydów guaninowych aktywowany przez cAMP
ESMO	– (ang. <i>European Society for Medical Oncology</i>) Europejskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej
FBXW7	– (ang. <i>F-box and WD repeat domain containing 7</i>)
FH	– (ang. <i>fumarate hydratase</i>)
FLCN	– (ang. <i>folliculin</i>) folikulina
FLT1	– (ang. <i>Fms related receptor tyrosine kinase 1</i> , inaczej <i>VEGFR1</i>)
GPCR	– (ang. <i>G protein-coupled receptor</i>) receptor sprzężony z białkiem G
HIF-1	– (ang. <i>hypoxia-inducible factor 1</i>) czynnik indukowany hipoksją 1
IARC	– (ang. <i>International Agency for Research on Cancer</i>) Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem
IFN	– interferon
Keap1	– (ang. <i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>)
MMP-9	– (ang. <i>matrix metalloproteinase 9</i>) metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej 9

mTOR	– (ang. <i>mechanistic target of rapamycin kinase</i>)
NCCN	– (ang. <i>National Comprehensive Cancer Network</i>) Narodowa Sieć Nowotworów
NCI	– (ang. <i>National Cancer Institute</i>) Narodowy Instytut Raka
NF2	– (ang. <i>neurofibromin 2</i>) neurofibromina 2
NFE2L2	– (ang. <i>nuclear factor, erythroid 2-like 2</i>)
ICIs	– (ang. <i>immune checkpoint inhibitors</i>) inhibitory punktów kontrolnych
OCT-4	– (ang. <i>octamer-binding transcription factor 4</i>) czynnik transkrypcyjny wiążący oktamer 4
ORR	– (ang. <i>objective response rate</i>) odsetek obiektywnych odpowiedzi
OS	– (ang. <i>overall survival</i>) czas przeżycia całkowitego
PD-1	– (ang. <i>programmed death receptor 1</i>) receptor programowanej śmierci
PDGF	– (ang. <i>platelet-derived growth factor</i>) czynnik wzrostu pochodzący z płytek krwi
PFS	– (ang. <i>progression-free survival</i>) czas przeżycia wolny od progresji
PI3K	– (ang. <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>) kinaza 3-fosfatydylinozytolu
PIK3CA	– (ang. <i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>)
PIP2	– (ang. <i>phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>) 4,5-difosforan fosfatydylinozytolu
PIP3	– (ang. <i>phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate</i>) 3,4,5-trifosforan fosfatydylinozytolu
PlGF	(ang. <i>placenta-derived growth factor</i>) łożyskowy czynnik wzrostu

<i>PBRM1</i>	– (ang. <i>polybromo 1</i>)
<i>POU5F1</i>	– (ang. <i>POU class 5 homeobox 1</i>)
pRCC	– (ang. <i>papillary renal cell cancer</i>) brodawowaty rak nerki
pro-HB-EGF	– (ang. <i>pro-heparin-binding epidermal growth factor</i>) prekursor czynnika wzrostu naskórka wiążącego heparynę
PTEN	– (ang. <i>phosphatase and tensin homolog</i>)
qRT-PCR	– (ang. <i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>) ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym
RB1	– (ang. <i>RB transcriptional corepressor 1</i>)
RCC	– (ang. <i>renal cell carcinoma</i>) rak nerkowokomórkowy
SD	– (ang. <i>standard deviation</i>) odchylenie standardowe
SETD2	– (ang. <i>SET domain containing 2 histone lysine methyltransferase</i>)
SMARCB1	– (ang. <i>SWI/SNF related BAF chromatin remodeling complex subunit B1</i>)
SOX-2	– (ang. <i>sex-determining region Y-box 2</i>) czynnik transkrypcyjny regionu determinującego płeć na chromosomie Y
STAT3	– (ang. <i>signal transducer and activator of transcription 3</i>) przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji 3
TCEB1	– (ang. <i>transcription elongation factor b</i>)
TFE3	– (ang. <i>transcription factor binding to IGHM enhancer 3</i>)
TGF- β	– (ang. <i>transforming growth factor β</i>) transformujący czynnik wzrostu β
TP53	– (ang. <i>tumor protein P53</i>)
RCT	– (ang. <i>randomized controlled trial</i>) badanie kontrolne z randomizacją

TKIs	– (ang. <i>tyrosine kinase inhibitors</i>) inhibitory kinaz tyrozynowych
VEGF	– (ang. <i>vascular endothelial growth factor</i>) naczyniopochodny czynnik wzrostu
VEGFR	– (ang. <i>vascular endothelial growth factor</i>) receptor naczyniopochodnego czynnika wzrostu
VHL	– (ang. <i>von Hippel-Lindau tumor suppressor</i>)
WHO	– (ang. <i>World Health Organization</i>) Światowa Organizacja Zdrowia

Streszczenie w języku polskim

Wstęp: Rak brodawkowaty nerki (pRCC) to drugi najczęstszy po raku jasnokomórkowym (ccRCC) podtyp raka nerki (RCC). Cechuje się on odmienną charakterystyką histologiczną i molekularną, niż najczęściej występujący ccRCC. Mimo postępów w leczeniu ccRCC rokowanie w pRCC, zwłaszcza w zaawansowanych stadiach choroby, pozostaje niesatysfakcjonujące. Coraz więcej danych sugeruje udział układu współczulnego i przekąźnictwa β -adrenergicznego w procesach prowadzących do powstania i rozwoju nowotworów. Postuluje się, że istotną rolę w patofizjologii nowotworów odgrywa podtyp 2 receptora β -adrenergicznego (β_2 -AR). W wielu nowotworach udowodniono, że przekąźnictwo przez β_2 -AR może wpływać na regulację proliferacji, angiogenezy, migracji i inwazji komórek nowotworowych, a także uczestniczyć w procesach związanych z fenotypem macierzystych komórek nowotworowych (CSCs) i wpływać na układ odpornościowy. Rola przekąźnictwa β -adrenergicznego w RCC, a szczególnie w pRCC, pozostaje niejasna i mało poznana. Z uwagi na szerokie zastosowanie leków wpływających na β -AR w terapii chorób układu sercowo-naczyniowego, zrozumienie ich potencjalnego wpływu na RCC ma istotne znaczenie kliniczne.

Cele pracy: Pierwszym celem pracy była ocena poziomu ekspresji genu kodującego β_2 -AR (*ADRB2*) pośród najczęstszych podtypów RCC i zbadanie wpływu ekspresji tego genu na parametry kliniczno-patomorfologiczne oraz rokowanie pacjentów z pRCC (Część I). Za drugi cel obrano analizę wpływu agonisty i antagonisty β_2 -AR na żywotność komórek nowotworowych i ekspresję genów związanych z fenotypem CSCs i angiogenezą (Część II).

Materiał i metody: Analiza ekspresji genu *ADRB2* została przeprowadzona na danych transkryptomicznych i klinicznych pacjentów z pRCC, dostępnych w bazie The Cancer Genome Atlas (TCGA). Część doświadczalna obejmowała hodowle linii komórkowych RCC: wywodzących się z pRCC (Caki-2 i ACHN) i ccRCC (Caki-1, 786-O). Przy pomocy qRT-PCR oceniono różnice w poziomie ekspresji genu *ADRB2* między komórkami pRCC i ccRCC. Komórki wywodzące się z pRCC poddawano działaniu salbutamolu (selektywny agonista β_2 -AR) oraz ICI-118,551 (selektywny antagonisty β_2 -AR) w różnych stężeniach i przeprowadzono ocenę ich żywotności. Następnie w komórkach tych metodą qRT-PCR oceniano poziom ekspresji genów związanych z fenotypem CSCs (*POU5F1* i *NES*) oraz

angiogenezą (*VEGFA* i *FLT1*) w komórkach poddanych działaniu β_2 -agonisty i β_2 -antagonisty.

Wyniki: Analiza danych TCGA wykazała, że niższy poziom ekspresji *ADRB2* u pacjentów z pRCC korelował z częstszym występowaniem przerzutów do węzłów chłonnych, wyższym stopniem zaawansowania klinicznego w momencie rozpoznania oraz krótszym czasem przeżycia całkowitego (OS) i wolnego od progresji (PFS). W badaniach *in vitro* zastosowanie antagonisty β_2 -AR (ICI-118,551) w stężeniu 100 μM skutkowało istotnie statystycznym zmniejszeniem żywotności komórek obu linii komórkowych pRCC: Caki-2 i ACHN. ICI-118,551 podany w stężeniach 0,1 μM , 1 μM , 10 μM powodował również zmniejszoną żywotność komórek linii ACHN. W komórkach poddanych działaniu ICI-118,551 zaobserwowano złożony wpływ na ekspresję cytokin CSCs: wzrost ekspresji *POU5F1* w obu liniach komórkowych i spadek ekspresji *NES* (istotność statystyczną wykazano w linii Caki-2). Podanie ICI-118,551 wywierało również wpływ na poziom ekspresji genów związanych z angiogenezą: spadek ekspresji *VEGF-A* w linii wywodzącej się z przerzutu pRCC oraz kompensacyjny wzrost ekspresji *VEGFR1* w obu liniach komórkowych (Caki-2 i ACHN). Podanie agonisty β_2 -AR salbutamolu nie wpływało na żywotność komórek pRCC oraz ekspresję genów związanych z CSCs i angiogenezą.

Wnioski: Wysoka ekspresja *ADRB2* jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym w pRCC, związanym z większym prawdopodobieństwem zajęcia węzłów chłonnych, wystąpienia przerzutów odległych oraz gorszym rokowaniem w zakresie PFS i OS. Blokada β_2 -ARs, poprzez ekspozycję komórek na selektywnego antagonistę (ICI-118,551), prowadzi do zmniejszenia żywotności komórek pRCC, zmniejszonej ekspresji cytokin angiogenezy oraz może potencjalnie prowadzić do selekcji komórek o fenotypie CSCs.

Podsumowanie: Uzyskane w pracy doktorskiej wyniki sugerują, że β_2 -AR może odgrywać rolę w patogenezie pRCC. Uwzględniając powszechne stosowanie leków z grupy tzw. β -blokerów oraz częstsze zachorowania na RCC u pacjentów z rozpoznaniem nadciśnienia tętniczego, u których leki z tej grupy są wykorzystywane, dokładniejsze badania w tym zakresie mogą przełożyć się na postępowanie kliniczne u pacjentów z RCC. W związku z zachęcającymi wynikami przeprowadzonych badań, zagadnienie przebiegu β -adrenergicznego u chorych z RCC wymaga dalszych badań przedklinicznych, jak i klinicznych.

Streszczenie w języku angielskim

Introduction: Papillary renal cell carcinoma (pRCC) is the second most common subtype of renal cell carcinoma (RCC), after clear cell RCC (ccRCC). It presents distinct histological and molecular characteristics compared to the more prevalent ccRCC. Despite therapeutic advances in ccRCC, the prognosis for pRCC, particularly in advanced stages, remains unsatisfactory. Growing evidence suggests that the sympathetic nervous system and β -adrenergic signaling are involved in tumor development and progression. The β_2 -adrenergic receptor (β_2 -AR) subtype is thought to play a key role in cancer pathophysiology. In various tumors, β_2 -AR signaling has been shown to regulate proliferation, angiogenesis, migration, and invasion of cancer cells, as well as to influence cancer stem cell (CSC) phenotypes and modulate the immune system. However, the role of β -adrenergic signaling in RCC, especially in pRCC, remains unclear. Given the widespread use of β -AR-targeting drugs in cardiovascular diseases, understanding their potential impact on RCC holds significant clinical relevance.

Aims: The first aim of this study was to assess *ADRB2* gene expression across the main RCC subtypes and investigate its relationship with clinicopathological features and prognosis in pRCC patients (Part I). The second aim was to evaluate the effects of β_2 -AR agonists and antagonists on cancer cell viability and the expression of genes associated with the CSC phenotype and angiogenesis (Part II).

Materials and Methods: *ADRB2* gene expression was analyzed using transcriptomic and clinical data of pRCC patients from The Cancer Genome Atlas (TCGA). The experimental part involved RCC cell lines derived from pRCC (Caki-2 and ACHN) and ccRCC (Caki-1, 786-O). qRT-PCR was used to compare *ADRB2* expression between pRCC and ccRCC cell lines. pRCC-derived cells were treated with salbutamol (a selective β_2 -AR agonist) and ICI-118,551 (a selective β_2 -AR antagonist) at varying concentrations, followed by viability assessment. Gene expression of CSC markers (*POU5F1* and *NES*) and angiogenesis-related genes (*VEGF-A* and *FLT1*) was also evaluated using qRT-PCR in cell lines treated with ICI-118,551 and salbutamol.

Results: TCGA data analysis revealed that lower *ADRB2* expression levels in pRCC patients were associated with more frequent lymph node metastases, higher clinical stage at diagnosis, and shorter overall (OS) and progression-free survival (PFS). In vitro, treatment with the β_2 -AR antagonist ICI-118,551 at 100 μ M significantly reduced cell

viability in both pRCC lines (Caki-2 and ACHN). Lower concentrations (0.1–10 μ M) also decreased ACHN cell viability. ICI-118,551 altered CSC gene expression, increasing *POU5F1* and decreasing *NES* (significantly in Caki-2). It also led to reduced *VEGF-A* expression (in the metastatic pRCC line) and compensatory upregulation of *VEGFR1* (*FLT1*) in both cell lines. Salbutamol did not affect cell viability or gene expression related to CSCs and angiogenesis.

Conclusions: High *ADRB2* expression is an unfavorable prognostic factor in pRCC, associated with lymph node involvement, distant metastases, and worse OS and PFS. β_2 -AR blockade via the selective antagonist ICI-118,551 reduces pRCC cell viability, downregulates angiogenesis-related genes, and may induce selection of CSC-like cells.

Summary: This doctoral study demonstrates that β_2 -AR plays a role in pRCC pathogenesis. Considering the widespread use of β -blockers and the higher incidence of RCC in hypertensive patients treated with such drugs, further preclinical and clinical research into β -adrenergic signaling in RCC may have clinical implications.

1 Wprowadzenie

1.1 Rak nerkowokomórkowy

1.1.1 Epidemiologia i czynniki ryzyka

Rak nerkowokomórkowy (ang. *renal cell carcinoma*, RCC) obejmuje heterogenną grupę nowotworów, których wspólną cechą jest pochodzenie z komórek nabłonka kanalików nerkowych. Stanowi on około 3-5% wszystkich nowotworów występujących u człowieka, będąc szóstym najczęściej występującym nowotworem u mężczyzn i dziesiątym u kobiet(1). Według szacunków Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem (ang. *International Agency for Research on Cancer*, IARC) w 2022 r. na świecie zanotowano około 434 419 nowych przypadków raka nerki (2,2% wszystkich rozpoznanych nowotworów złośliwych) oraz 155 702 zgonów (1,6% wszystkich zgonów z powodu nowotworów złośliwych)(2). Obserwuje się stały wzrost zachorowalności na RCC, szczególnie w krajach rozwiniętych. Standaryzowany na wiek współczynnik zachorowań wynosi w Europie Środkowej i Wschodniej 9,7/100 tys. i jest ponad dwukrotnie wyższy niż na świecie (4,6/100 tys.)(3). Obszar Europy Środkowo-Wschodniej jest regionem o najwyższym współczynniku śmiertelności z powodu RCC (3,4/100 tys.), przekraczającym niemal dwukrotnie wartość dla całego świata (1,8/100 tys.)(3). Według ostatniego raportu Krajowego Rejestru Nowotworów z 2022 roku nowotwory złośliwe nerek stanowiły 3,7% wszystkich nowotworów u mężczyzn i 2,3% u kobiet (odpowiednio 3 298 i 2 141 zachorowań), odpowiadając za 2,6% zgonów u mężczyzn i 2% u kobiet (odpowiednio 1350 i 891 zgonów)(4).

Większość przypadków RCC występuje sporadycznie. Czynniki ryzyka najsilniej związanymi z występowaniem RCC są palenie tytoniu, otyłość i nadciśnienie tętnicze(3). Zachorowalność na RCC wzrasta również istotnie u pacjentów z towarzyszącą przewlekłą chorobą nerek, nabytą torbielowatością nerek i cukrzycą(3). Czynniki genetyczne odpowiedzialne są za około 3-5% zachorowań. Zidentyfikowano 11 zespołów genetycznych związanych z dziedzicznym występowaniem RCC, z których najlepiej poznany jest zespół von Hippel-Lindau wywołany mutacją w genie *VHL* (ang. *von Hippel-Lindau tumor suppressor*) predysponujący do zachorowania na jasnokomórkowego RCC (ang. *clear cell RCC*, ccRCC), oraz zespół Birt-Hogg-Dubé, związany z mutacjami w genie *FLCN* (ang. *folliculin*), zwiększający ryzyko raka chromofobowego nerki (chRCC)(5,6). Zespołami genetycznymi predysponującymi do zachorowania na raka

brodawkowego nerki (ang. *papillary RCC*, pRCC) są: zespół dziedzicznego raka brodawkowego nerki spowodowany mutacją w onkogenie *MET*(7) oraz dziedziczna leiomiomatoza z rakiem komórkowym nerki spowodowana mutacją w genie *FH*(8).

1.1.2 Klasyfikacja histologiczna

Wszystkie podtypy histologiczne RCC wywodzą się z komórek nabłonka kanalików nerkowych. Najnowsza, piąta wersja klasyfikacji nowotworów układu moczowo-płciowego Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO) z 2022 roku wyróżnia ponad 30 podtypów histologicznych RCC(9). Najczęstszym typem histologicznym raka nerki jest ccRCC, który stanowi około 70–75% rozpoznań RCC(10). Rak brodawkowy jest drugim najczęściej stwierdzanym podtypem RCC, stanowiącym 10-16% przypadków(10). Rzadsze typy RCC to rak chromofobowy czy onkocytny. Wraz ze wzrastającym wykorzystaniem sekwencjonowania następnej generacji, WHO wprowadziła również klasyfikację RCC opartą na zaburzeniach molekularnych, obejmującą 11 podtypów RCC(11). Do nowotworów zdefiniowanych występowaniem określonego zaburzenia molekularnego zaliczane są m.in.: RCC związany z translokacją czynników transkrypcyjnych z rodziny mikroftalmii, rdzeniasty RCC z deficytem *SMARCB1* (ang. *SWI/SNF related BAF chromatin remodeling complex subunit B1*), RCC z rearanżacją w genie *ALK* (ang. *anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase*) czy RCC z mutacją *TCEB1* (ang. *transcription elongation factor B SIII polypeptide 1*). Nowotwory zdefiniowane na podstawie zaburzeń molekularnych wykazują jednak bardzo dużą heterogenność pod względem morfologii, co sprawia, że klasyfikacja ta nie może być wyłączną metodą różnicowania podtypów RCC.

Raki jasnokomórkowe nerki zazwyczaj występują jako guzy pojedyncze i jednostronne, otoczone włóknistą pseudotorebką, na przekroju policykliczne, barwy żółtej z obecnymi często torbielami i ogniskami krwotocznymi(9). Mikroskopowo guzy ccRCC złożone są z komórek o jasnej cytoplazmie, wynikającej z akumulacji glikogenu i lipidów. Utkanie guzów ccRCC zazwyczaj jest lite, pęcherzykowe lub zrazikowe(9). Komórki nowotworu poprzecinane są obfitą siecią naczyń krwionośnych. W badaniach immunohistochemicznych charakterystyczna dla ccRCC jest ekspresja wimentyny, cytokeratyn niskocząsteczkowych (CK8, CK18, CK19, CK AE1/AE3), białka CD10, EMA, MUC1, MUC3 oraz brak ekspresji markerów dystalnej części nefronu (CK7, CD117, AMACR)(12). Najbardziej charakterystycznym zaburzeniem genetycznym występującym w około 80% przypadków ccRCC jest inaktywacja genu *VHL*.

Rak brodawkowaty podobnie jak ccRCC wywodzi się z komórek kanalika proksymalnego nefronu, jednak wyróżnia się od niego odrębnym profilem molekularnym i cytogenetycznym oraz odmiennym rokowaniem. Najczęściej występuje u osób poddawanych przewlekłej dializoterapii oraz z nabytą torbielowatością nerek. W porównaniu do innych podtypów histologicznych częściej rozpoznawany jest obustronnie lub wieloogniskowo. Makroskopowo jest guzem odgraniczonym od pozostałej części miąższu nerki torebką, o barwie białej lub beżowej, z ogniskami krwotocznymi, martwiczymi i torbielami na przekroju. Powierzchnia guza jest krucha i ziarnista, z uwagi na liczne brodawki. Mikroskopowo składa się z jasnych, kwaso- lub zasadochłonnych komórek osadzonych w delikatnym zrębie włóknisto-naczyniowym. Podścielisko brodawek zawiera nacieki makrofagów i kryształ cholesterolu. W klasyfikacji histologicznej pRCC wyróżnia się 2 podtypy: pRCC typu 1 i 2. Typ 1 reprezentuje około 2/3 przypadków pRCC, cechuje się niższym stopniem złośliwości histologicznej (G1-G2 wg Fuhrmana), częściej występuje wieloogniskowo i w rodzinnym zespole raka brodawkowatego. pRCC typu 2 charakteryzuje się wyższą złośliwością (G3-G4 wg Fuhrmana) i występuje we wrodzonej leiomiomatozie. Immunohistochemicznie charakterystyczna dla pRCC jest ekspresja cytokeratyn CK7 (pRCC typu 1) i CK20 (pRCC typu 2), AMACR, EMA, RCC, CD10 i brak ekspresji wimentyn(13).

1.1.2.1 Charakterystyka molekularna raka brodawkowatego nerki

Na podstawie analiz molekularnych wykazano udział wielu zaburzeń genowych w patogenezie pRCC. Germinalne i somatyczne mutacje w protoonkogenie *c-MET* są typowe dla pRCC typu 1(14). Gen *c-MET* koduje przezbłonową kinazę tyrozynową uczestniczącą w regulacji proliferacji, dojrzewania komórkowego oraz procesu angiogenezy. Nadmierna aktywacja MET prowadzi do karcynogenezy, migracji i inwazji komórek nowotworowych. Mutacje lub hipermetylacja promotora genu *CDKN2A* (ang. *cyclin dependent kinase inhibitor 2A*) są silnie związane z agresywnym przebiegiem pRCC(15). Zaburzenia w genach *SETD2* (ang. *SET domain containing 2, histone lysine methyltransferase*), *BAP1* (ang. *BRCA1 associated deubiquitinase 1*), *PBRM1* (ang. *polybromo 1*), *FH* (ang. *fumarate hydratase*), *NF2* (ang. *neurofibromin 2*), *TFE3* (ang. *transcription factor binding to IGHM enhancer 3*) i *NFE2L2* (ang. *NFE2 like BZIP transcription factor 2*) są typowe dla typu 2 pRCC(14,16) Obecne w pRCC mutacje genów *mTOR* (ang. *mechanistic target of rapamycin kinase*), *PIK3CA* (ang. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*), *PTEN* (ang. *phosphatase and tensin homolog*), *FBXW7* (ang. *F-*

box and WD repeat domain containing 7), *RBI* (ang. *RB transcriptional corepressor 1*), i *TP53* (ang. *tumor protein P53*) powodują zaburzenia przekazywania sygnałów w szlakach takich jak Hippo, mTOR czy p53(17). Szlaki te związane są z regulacją podziałów komórkowych, proliferacją, apoptozą – procesach uczestniczących w karcynogenezie. Mutacje w obrębie genów *NFE2L2*, *CUL3* (ang. *cullin 3*) i *KEAP1* (ang. *Kelch like ECH associated protein 1*) w pRCC prowadzą do konstytutywnej aktywacji Nrf2 – czynnika transkrypcyjnego odpowiedzialnego za proliferację komórek w warunkach stresu oksydacyjnego(17,18).

1.1.2.2 Leczenie raka brodawkowatego nerki

W przypadku choroby ograniczonej do nerki leczeniem z wyboru jest częściowa nefrektomia lub nefrektomia radykalna(19). Na podstawie wyników badania KEYNOTE-564 u pacjentów pośredniego i wysokiego ryzyka nawrotu choroby rozważyć można adjuwantową immunoterapię pembrolizumabem(20). U wybranych pacjentów w starszym wieku, z chorobami współistniejącymi i guzem mniejszym niż 4 cm można rozważyć aktywny nadzór choroby, polegający na monitorowaniu choroby przy wykorzystaniu badań obrazowych(19).

W ostatnich latach w leczeniu choroby w stadium uogólnienia dokonał się ogromny postęp. Dzięki odkryciu ścieżek sygnałowych uczestniczących w patofizjologii RCC, opracowano terapie ukierunkowane na konkretne cele molekularne takie jak receptor naczyniopochodnego czynnika wzrostu (ang. *vascular endothelial growth factor receptor*, VEGFR) czy kinazę mTOR. Do leków z tej grupy zaliczane są tak zwane inhibitory kinaz tyrozynowych (ang. *tyrosine kinase inhibitors*, TKIs) takie jak sunitinib, sorafenib, pazopanib, aksytynib czy ewerolimus. Kolejnym przełomem w leczeniu RCC okazały się leki z grupy inhibitorów punktów kontrolnych (ang. *immune checkpoint inhibitors*, ICIs) takie jak przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko cząsteczkom receptora programowanej śmierci 1 (ang. *programmed death receptor 1*, PD-1), jego ligandowi PD-L1, antygenowi-4 cytotoksycznych limfocytów T (ang. *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*, CTLA-4) wywołujące efekt przeciwnowotworowy poprzez aktywację odpowiedzi immunologicznej przeciwko komórkom nowotworowym.

Niestety większość badań klinicznych oceniających bezpieczeństwo i skuteczność wyżej wymienionych terapii była przeprowadzona na pacjentach z rozpoznaniem ccRCC, a nie pRCC. Do nielicznych badań klinicznych przeprowadzonych wśród pacjentów z rakiem

niejasnokomórkowm włączano często pacjentów nie tylko z rakiem brodawkowatym, ale też z innymi rzadszymi podtypami histologicznymi RCC. Aktualne zalecenia dotyczące leczenia pacjentów z rozpoznaniem pRCC opierają się głównie na małych badaniach, często retrospektywnych oraz analizach podgrup. Przez długi czas większość danych odnośnie leczenia pRCC dotyczyła sunitinibu, sorafenibu oraz ewerolimusu, których skuteczność terapeutyczna była niższa niż w przypadku ccRCC(21). Biorąc pod uwagę istotną rolę aktywacji protoonkogenu *c-MET* w onkogenezie pRCC, obiecującym kierunkiem badań okazało się wykorzystanie inhibitora kinazy MET, kabozantynibu. W badaniu II fazy wykazano przewagę kabozantynibu nad sunitinibem w zakresie wydłużenia czasu przeżycia wolnego od progresji (ang. *progression-free survival*, PFS) u chorych z pRCC(22). Pembrolizumab – przeciwciało monoklonalne anti-PD-1 – wykazał obiecującą aktywność w leczeniu pierwszej linii u pacjentów z niejasnokomórkowym rakiem nerki w badaniu II fazy(23), przekładającą się na 28,8% obiektywnych odpowiedzi (ang. *objective response rate*, ORR). Kolejny lek z grupy przeciwciał skierowanych przeciwko cząsteczce PD-1 – niwolumab, wykazał umiarkowaną skuteczność w badaniu fazy IIIb/IV w kohorcie pacjentów z niejasnokomórkowym rakiem nerki (w tym pRCC) w leczeniu I lub kolejnej linii(24), wykazując 13,6% ORR. Zastosowanie dwóch leków z grupy ICIs – niwolumabu i przeciwciała kierowanego przeciwko cząsteczce CTLA-4, ipilimumabu – w grupie pacjentów z badania fazy IIIb/IV CheckMate 920 z rakiem brodawkowatym nerki, przełożyło się na zadowalające efekty kliniczne(24).

Połączenia leków z dwóch grup: ICIs i TKIs takie jak kabozantynibu z niwolumabem, pembrolizumabu z lenwatynibem przyniosły niepotykane jak dotąd w leczeniu pRCC wyniki w zakresie ORR(25,26) oraz PFS i OS. W przypadku kabozantynibu z niwolumabem PFS wynosił aż 12,5 miesiąca a OS 28 miesięcy, co stanowi ponad dwukrotnie lepszy wynik niż w przeprowadzonych dotychczas badaniach (Tabela 1.).

Zgodnie z aktualnymi zaleceniami Europejskiego Towarzystwa Onkologii Klinicznej (ang. *European Society for Medical Oncology*, ESMO) z 2024 roku preferowanym leczeniem zaawansowanego pRCC I linii jest kabozantynib(27). Innymi lekami, które można rozważyć jako opcje terapeutyczne w I linii zgodnie z zaleceniami ESMO są: sunitinib i pembrolizumab lub połączenia kabozantynibu z niwolumabem czy pembrolizumabu z lenwatynibem. Leczenie II i dalszych linii zgodnie z wytycznymi ESMO powinno być oparte o leki z grup, które nie były dotychczas wykorzystywane. Brak jest jednak danych naukowych wskazujących konkretne sekwencje leczenia. Wytyczne *National*

Comprehensive Cancer Network (NCCN) jako preferowaną opcję leczenia I linii wymieniają kabozantynib. Inne rekomendowane przez NCCN terapie I linii to niwolumab, pembrolizumab, połączenie kabozantynibu z niwolumabem, pembrolizumabu z lenwatynibem. Zalecenia Polskiego Towarzystwa Onkologii Klinicznej wskazują kabozantynib lub połączenie kabozantynibu z niwolumabem jako preferowane leczenie I linii(19).

Tabela 1. Zestawienie wyników leczenia raka brodawkowatego nerki w najważniejszych badaniach klinicznych.

Nazwa badania	Faza	Linia	Badany lek	Pacjenci z pRCC, n (%)	ORR, %	PFS, miesiące (95% CI)	OS, miesiące (95% CI)
AXIPAP NCT02489695(28)	II	1	aksytynib	44 (100)	28,6 *	6,6 (5,5-9,2) *	18,9 (12,8-NO) *
ASPEN NCT01108445(29)	II	1	ewerolimus	3 (65)	9	5,5 (4,4-5,6)	NO
SUPAP NCT00541008(30)	II	1	sunitynib	61 (100) Typ 1 pRCC 15 (25) Typ 2 pRCC 46 (75)	BD	Typ 1 pRCC: 6,6 (2,8-14,8) Typ 2 pRCC: 5,5 (3,8-7,1) *	Typ 1 pRCC: 17,8 (5,7-26,1) Typ 2 pRCC: 12,4 (8,2-14,3) *
NCT02915783(31)	II	1	ewerolimus + lenwatynib	20 (64)	26	9,2 (3,5-NO)	5,6 (9.2-NO)
NCT00726323(32)	II	1-2	foretinib	74 (100)	13,5*	9,3 (6,9-12,9) *	NO
NCT02761057(22)	II	1-2	kabozantynib, kryzotynib, sawolitynib, sunitynib	147 (100)	23, 0, 3, 4*	9; 2,8; 3; 5,6*	20; 19,9; 11,7; 16,4 *
SAVOIR NCT03091192	III	1-4	sawolitynib	60 (100)	27*	7,0 (2.8-NO) *	BD*

KEYNOTE-427 NCT02853344(23)	II	1	pembrolizumab	118 (71,5)	28,8*	5,5 (3,9-6,9) *	31,5 (25,5-NO) *
CheckMate 374 NCT02596035(24)	IIIb/ IV	1-4	niwolumab	24 (54,5)	13,6	2,2 (1,8-5,4)	16,3 (9,2-NO)
CheckMate 920 NCT02982954(33)	IIIb/ IV	1	niwolumab + ipilimumab	18 (34,6)	19,6	3,7 (2,7-4,6)	21,2 (16,6-NO)
NCT03635892(26)	II	1-2	kabozantynib + niwolumab	32 (80)	48	12,5 (6,3-5,9)	28 (16,3-NO)
KEYNOTE-B61 NCT04704219(25)	II	1	pembrolizumab + lenwatynib	93 (59)	54*	BD	BD

* – znany ORR/PFS/OS dla pacjentów z pRCC, w innym przypadku dane dla chorych z niejasnokomórkowym rakiem nerki. BD – brak danych, NO – nie osiągnięte, PFS – czas wolny od progresji, OS – czas przeżycia całkowitego, pRCC – rak brodawkowaty nerki.

1.1.2.3 Rokowanie u pacjentów z rozpoznaniem raka brodawkowatego nerki

W stadium ograniczonym do nerki pRCC charakteryzuje się lepszym rokowaniem pacjentów w porównaniu do ccRCC. Niestety u około 20-30% pacjentów z rozpoznaniem pRCC już przy postawieniu diagnozy stwierdza się przerzuty odległe, a u pozostałej części chorych pomimo choroby wyjściowo ograniczonej wyłącznie do nerki, przerzuty odległe występują w przebiegu choroby u 20-40%(34). Pomimo lepszego rokowania pRCC względem ccRCC w stadium ograniczonym, w chorobie przerzutowej wyniki leczenia są gorsze u pacjentów z pRCC(21). W analizie danych ponad 112 tysięcy pacjentów z rozpoznaniem RCC podtyp brodawkowaty wiązał się z gorszym rokowaniem w porównaniu do ccRCC w zakresie czasu przeżycia zależnego od nowotworu (ang. *cancer-specific survival*, CSS) (HR = 1,28; 95% CI: 1,19–1,39; p < 0,001) i przeżycia całkowitego (ang. *overall survival*, OS) (HR = 1,30; 95% CI: 1,21–1,40; p < 0,001)(35). Nawet przy użyciu kombinacji nowoczesnych terapii opartych na połączeniu leków ukierunkowanych molekularnie z immunoterapią, wyniki leczenia pRCC pozostają niezadowalające: odsetek pacjentów z 12-miesięcznym OS w badaniach *real-world* wynosi 58% u pacjentów z pRCC, a u pacjentów z ccRCC 75%(36).

1.2 Receptory β -adrenergiczne

W ostatnim czasie w badaniach przedklinicznych oraz klinicznych wykazano istotny wpływ przewlekłego stresu na procesy związane z karcynogenezą oraz patofizjologią nowotworów(37). Metaanaliza 165 badań potwierdziła wpływ czynników psychospołecznych związanych ze stresem na zwiększoną częstość występowania nowotworów, nawet w wyjściowo zdrowych populacjach(38). Ekspozycja na stres powoduje aktywację dwóch kluczowych układów w organizmie człowieka: osi podwzgórze-przysadka-nadnercza oraz układu współczulnego, a co za tym idzie uwolnienie kortyzolu i katecholamin. Na podstawie dotychczasowych obserwacji, wydaje się wysoce prawdopodobne, iż hormony uwalniane podczas stresu mogą uczestniczyć w powstawaniu i progresji nowotworów za pośrednictwem receptorów β -adrenergicznych, a w szczególności receptorów β_2 -adrenergicznych(39).

Receptory β -adrenergiczne (ang. *β -adrenergic receptors*, β -ARs) należą do rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G (ang. *G protein-coupled receptors*, GPCRs). Połączenie ligandu z zewnątrzkomórkową częścią receptora powoduje jego interakcję z odpowiednimi białkami G i innymi białkami sygnałowymi, wpływającymi na kluczowe dla komórki procesy komórkowe. W organizmie ludzkim zidentyfikowano 3 podtypy β ARs: β_1 -AR, β_2 -AR and β_3 -AR. Naturalnymi ligandami dla β -ARs są dopamina i adrenalina, które wiążą się z jednakowym powinowactwem do wszystkich podtypów β -ARs. Noradrenalina z kolei wykazuje większe powinowactwo do β_1 -ARs(40).

β_1 -ARs ulegają ekspresji w kardiomiocytach, komórkach aparatu przykłębuszkowego nerki i adipocytach(40). Pobudzenie tych receptorów powoduje zwiększenie częstości wyładowań w węźle zatokowo-przedsionkowym, węźle przedsionkowo-komorowym oraz w mięśniówce komór serca, co powoduje wzrost częstości skurczów i kurczliwości mięśnia sercowego, przekładając się na wzrost objętości wyrzutowej i pojemności minutowej serca(40). W nerce związanie β_1 -ARs w komórkach przykłębuszkowych powoduje uwolnienie reniny, prowadzące do wzrostu objętości krwi poprzez zwiększone uwalnianie angiotensyny II i aldosteronu(40). W adipocytach β_1 -ARs odpowiadają za pobudzenie lipolizy.

Podtyp 2 β -ARs wykazuje największą ekspresję w mięśniach gładkich naczyń krwionośnych, oskrzeli, przewodu pokarmowego i macicy. Pobudzenie tych receptorów przekłada się więc na bronchodylatację, wazodylatację, spowolnienie perystaltyki

przewodu pokarmowego oraz rozkurcz mięśnia gładkiego macicy. Podobnie jak β_1 -ARs, jednak w mniejszym stopniu, receptory typu 2 ulegają też ekspresji w kardiomiocytach i tkance tłuszczowej, gdzie odpowiadają odpowiednio za zwiększenie kurczliwości i częstości skurczów kardiomiocytów oraz lipolizę. β_2 -ARs w mięśniach poprzecznie prążkowanych odpowiadają za ich zwiększoną kurczliwość. Komórki układu odpornościowego takie jak limfocyty i makrofagi również wykazują ekspresję β_2 -ARs, co sprawia, że przekąźnictwo β_2 -adrenergiczne wykazuje złożony wpływ na modulację odpowiedzi immunologicznej.

Receptory β_3 wykazują największą ekspresję w brunatnej tkance tłuszczowej, gdzie uczestniczą w lipolizie. Ulegają również ekspresji w mięśniach szkieletowych, gdzie uczestniczą w termogenezie.

W zdrowej nerce β -ARs, zarówno β_1 -ARs, jak i β_2 -ARs wykazują ekspresję w kanalikule proksymalnym, dystalnym oraz kłębuszkach nerkowych(41). β_2 -ARs pełnią wiele funkcji w fizjologii nerki: regulują przepływ krwi i filtrację kłębuszkową, równowagę elektrolitową, oraz wydzielanie reniny przez komórki przykłębuszkowe(42).

1.2.1 Leki wpływające na receptory β -adrenergiczne

Leki wpływające na sygnalizację przez β -ARs są szeroko stosowane w medycynie. Antagonisty β -ARs zwane potocznie β -blokerami znajdują zastosowanie w leczeniu chorób układu sercowo-naczyniowego takich jak nadciśnienie tętnicze, zaburzenia rytmu czy niewydolność serca.

Pierwsze syntetyczne związki z grupy β -blokerów o działaniu nieselektywnym, pronetalol i dichloroizoprenalina, zostały zsyntetyzowane pod koniec lat 50. XX wieku, jednak nie zostały wprowadzone do użycia w praktyce klinicznej z powodu obserwowanego na badanych zwierzętach działania karcynogennego(43). Leki te zostały w związku z tym wyparte przez odkryty w 1962 roku propranolol, będący nieselektywnym β -blokerem, działającym zarówno na receptory β_1 , jak i β_2 . Kolejne zsyntetyzowane β -blokery, takie jak acebutolol, atenolol, bisoprolol i nebiwolol wykazywały selektywne działanie na receptory β_1 , ograniczając tym samym działania niepożądane nieselektywnych β -antagonistów, takie jak skurcz mięśni gładkich naczyń i oskrzeli (Tabela 2). Obecnie na rynku dostępnych jest ponad 20 różnych leków z grupy β -blokerów. W analizie populacji Stanów Zjednoczonych β -blokery były trzecią najczęściej używaną grupą leków wśród pacjentów w przedziale wiekowym między 60 a 79 rokiem życia, stosowaną u ponad 20% chorych w tej grupie

wiekowej(44). Biorąc pod uwagę rosnącą zapadalność na choroby układu sercowo-naczyniowego, które są obecnie pierwszą przyczyną zgonów w krajach wysokorozwiniętych, można podejrzewać, że liczba pacjentów leczonych lekami z tej grupy w Europie sięga kilkudziesięciu milionów(45).

Leki stymulujące przekąźnictwo β -adrenergiczne wykorzystywane są w różnych wskazaniach w zależności podtypu receptorów, na które wykazują działanie. Nieselektywnym β -mimetykiem o powinowactwie do β -ARs kilkunastokrotnie większym od adrenaliny czy noradrenaliny jest izoprenalina. Była ona wykorzystywana w leczeniu skurczu oskrzeli, bradykardii, blokach przewodnictwa przedsionkowo-komorowego, jednak z uwagi na ryzyko wywołania groźnych dla życia zaburzeń rytmu serca nie jest obecnie dopuszczona do użytku w wielu krajach, w tym w Polsce. Inne nieselektywne β -mimetyki takie jak metoksyfenamina czy orcyprenalina były w przeszłości stosowane m.in. w leczeniu skurczu oskrzeli, jednak z uwagi na istotne działania niepożądane podobne do tych wywoływanych przez izoprenalinę, nie są obecnie stosowane w praktyce klinicznej.

Leki wykazujące działanie β_1 -adrenergiczne, takie jak niezarejestrowana w Polsce denopamina, wykorzystywane są w intensywnej terapii w leczeniu wstrząsu kardiogenego. Dostępna w Polsce dobutamina wykazuje działanie wobec β_1 -ARs i receptorów α_1 w mięśniu sercowym oraz słabsze działanie na obwodowo zlokalizowane β_2 -ARs. Poprzez działanie inotropowe dodatnie oraz słabsze działanie obwodowe wykazuje różny efekt działania na układ sercowo-naczyniowy w zależności od dawki. Z kolei leki β_2 -adrenergiczne takie jak salbutamol czy salmeterol znajdują zastosowanie w leczeniu chorób układu oddechowego takich jak astma i przewlekła obturacyjna choroba płuc.

Tabela 2. Wybrane substancje wpływające na podtypy receptorów β -adrenergicznych.

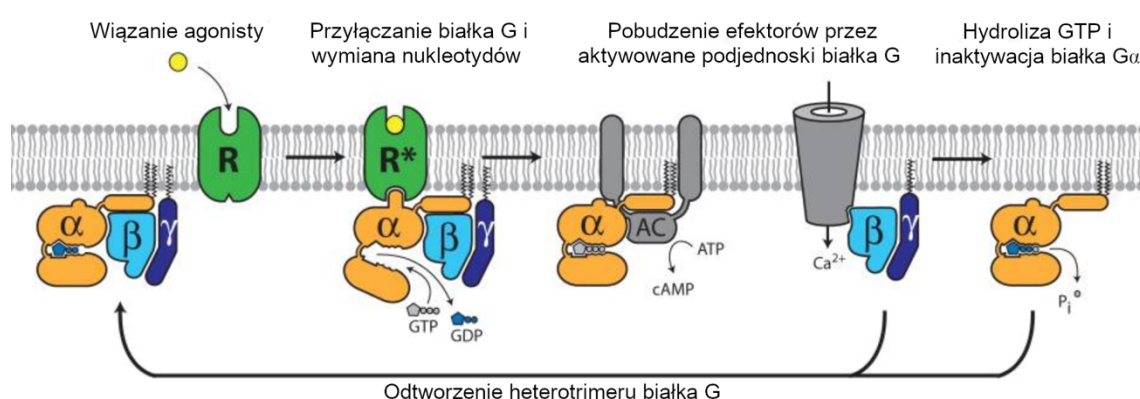
Receptory β_1 -adrenergiczne		Receptory β_2 -adrenergiczne		Receptory β_1 - i β_2 -adrenergiczne	
agonista	antagonista	agonista	antagonista	agonista	antagonista
denopamina	acebutolol	bitolterol	butoksamina	izoprenalina/ izoproterenol	bucyndolol
dobutamina	atenolol	fenoterol	ICI-118,551	metoksyfenamina	karwedilol
(β_1 -ARs > β_2 - ARs)	betaksolol	formoterol		orcyprenalina	karteolol
	bisoprolol	klenbuterol			labetalol

	betaksolol	lewosalbutamol			nadolol
	celiprolol	prokaterol			pindolol
	esmolol	rytodryna			propranolol
	metoprolol	salbutamol			sotalol
	nebiwolol	salmeterol			tymolol
		terbutalina			

1.2.2 Podtyp 2 receptora β -adrenergicznego

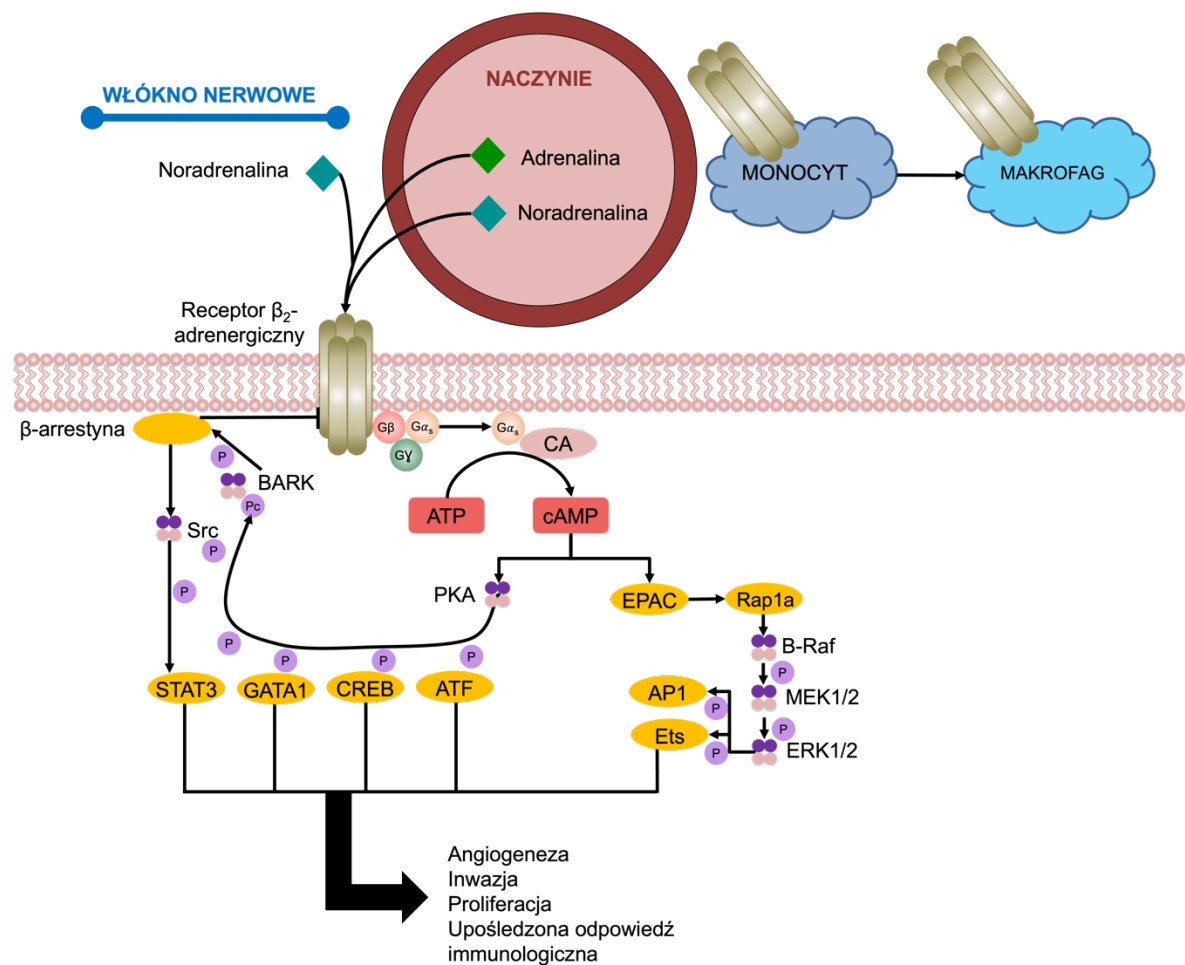
1.2.2.1 Budowa i funkcja receptora β_2 -adrenergicznego

Podtyp 2 β -AR kodowany jest przez gen *ADRB2* (ang. *adrenoceptor beta 2*) zlokalizowany na ramieniu długim chromosomu 5 (5q32)(46). Jako GPCR receptor ten oddziałuje z kanałem wapniowym typu L, który związany jest z białkiem G_s . Białko to ma formę heterotrimeru składającego się z podjednostek α , β i γ (47). Agoniści wiążący się z β_2 -ARs powodują interakcję heterotrimeru $G_s\alpha\beta\gamma$ z GDP, co wywołuje dysocjację białka G_s do $G\alpha$ -GTP i $G\beta\gamma$. Tak powstałe podjednostki $G\alpha$ -GTP i $G\beta\gamma$ modulują czynność wielu ścieżek sygnałowych, kanałów jonowych i enzymów komórkowych. Wewnętrzna aktywność podjednostki $G\alpha$ jako GTP-azy prowadzi następnie do hydrolizy GTP do GDP i ponownego połączenia podjednostek $G\alpha$ -GDP i $G\beta$, co powoduje zahamowanie przekazywania i powrót kompleksu do stanu nieaktywnego (Rycina 1.)



Rycina 1. Cykl aktywacji i dezaktywacji receptora β_2 -adrenergicznego. Na podstawie: Rasmussen SG *et al.*, Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor-Gs protein complex, Nature, 2011. AC – cyklaza adenylnowa; ATP – Adenozyno-5'-trifosforan; Ca^{2+} – jony wapnia; cAMP – cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan; R– receptor.

Aktywowana podjednostka $G\alpha$ białka G_s pobudza cyklazę adenylanową uczestniczącą w syntezie cyklicznego adenozylo-3',5'-monofosforanu (ang. *3',5'-cyclic adenosine monophosphate*, cAMP). Wzrost stężenia cAMP aktywuje kinazę białkową A (ang. *protein kinase A*, PKA), która wykazuje wpływ na procesy komórkowe takie jak regulacja metabolizmu, różnicowania, mobilności, apoptozy i odpowiedzi immunologicznej. PKA aktywuje też β -adrenergiczną kinazę receptorową (ang. *β -adrenergic receptor kinase*, BARK), która stymuluje β -arrestynę, powodując desentytyzację przekąźnictwa β -adrenergicznego, aktywację szlaku sygnałowego kaskady kinaz aktywowanych mitogenami (ang. *mitogen activated protein kinases*, MAPK) oraz kinazy Src, fosforylującej czynniki transkrypcyjne takie jak przekąźnik sygnału i aktywator transkrypcji 3 (ang. *signal transducer and activator of transcription 3*, STAT3). Kolejnym efektem zależnym od cAMP jest białkowy czynnik wymiany nukleotydów guaninowych aktywowany przez cAMP (ang. *exchange protein directly activated by cAMP*, EPAC). EPAC aktywuje GTP-azy z rodziny Ras: Rap1 i Rap2, które z kolei stymulują aktywność kinazy białkowej RAF, fosforylującej i aktywującej MEK (MEK1 i MEK2) oraz kinazy regulowane sygnałem zewnątrzkomórkowym 1/2. (ang. *extracellular signal regulated kinase*, ERK1/2). Kinaza ERK po fosforylacji przemieszcza się do jądra komórkowego, gdzie następnie fosforyluje i aktywuje czynniki transkrypcyjne odpowiedzialne za procesy podziału i wzrostu komórek. Do czynników transkrypcyjnych aktywowanych przez kaskadę sygnałową Ras-Raf-MEK-ERK zaliczają się: białko wiążące się z elementem odpowiedzi na cAMP (ang. *cAMP response element binding protein*, CREB), STAT3, GATA1, aktywujący czynnik transkrypcyjny (ang. *activating transcription factor*, ATF) (Rycina 2.).



Rycina 2. Ścieżka przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego z receptorów β_2 -adrenergicznych. Na podstawie: Cole SW, Sood AK. Molecular pathways: beta-adrenergic signaling in cancer, Clin Cancer Res, 2012 Mar. AP1 – białko aktywujące 1; ATF – aktywujący czynnik transkrypcyjny; ATP – Adenozyno-5'-trifosforan; BARK – β -adrenergiczna kinaza receptorowa, CA – cyklaza adenylanowa, cAMP – cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan; CREB – białko wiążące się z elementem odpowiedzi na cAMP; EPAC – czynnik wymiany nukleotydów guaninowych aktywowany przez cAMP; ERK 1/2 – kinazy regulowane sygnałem zewnątrzkomórkowym 1/2, P – fosforylacja, PKA – fosfokinaza A; STAT3 – przekazywacz sygnału i aktywator transkrypcji 3.

1.2.2.2 Rola receptorów β_2 -adrenergicznych w patofizjologii nowotworów złośliwych

Wysoka ekspresja β -ARs została wykazana w wielu typach nowotworów takich jak czerniak, rak przełyku, trzustki, nerki, płuca(48). Na podstawie dotychczasowych doniesień wydaje się, że podtypem β -ARs ulegającym najczęściej nadekspresji w komórkach nowotworowych jest β_2 -AR(48).

Nowotworami charakteryzującymi się szczególnie wysoką ekspresją β_2 -ARs są: czerniak, rak trzustki, płuca oraz RCC(48). Biorąc pod uwagę stosunek ekspresji β_2 -ARs w nowotworze do poziomu ekspresji β_2 -ARs w tkance zdrowej, z której wywodzi się nowotwór, najwyższy wynik osiągają rak endometrium, rak surowiczy jajnika i rak urotelialny(48).

Wpływ aktywacji receptorów β_2 -adrenergicznych na biologię nowotworu jest niezwykle złożony. Nie dotyczy on jedynie komórek nowotworowych, ale również mikrośrodowiska guza, w tym komórek układu immunologicznego. Wielokierunkowe efekty aktywacji przekąźnictwa β_2 -AR udokumentowane zostały na różnych etapach rozwoju nowotworu: zarówno na poziomie karcynogenezy, czyli powstawania nowych komórek nowotworowych, jak i na etapie przemian już istniejących komórek raka, prowadzących do postępu i rozwoju oporności nowotworu(49) (Rycina 3).

1.2.2.2.1 Wpływ na proliferację komórek nowotworowych

Jak wspomniano wcześniej, stymulacja receptorów β_2 -AR poprzez zwiększenie poziomu cAMP wpływa na pobudzenie szlaków przekąźnictwa wewnątrzkomórkowego regulujących metabolizm i proliferację komórek nowotworowych. cAMP ma zdolność aktywacji PKA, która fosforyluje kolejne białka docelowe. Jednym z głównych celów PKA jest CREB – czynnik transkrypcyjny odpowiedzialny za regulację ekspresji genów związanych z podziałami i przeżyciem komórek. Fosforylowany CREB wpływa na transkrypcję genów kodujących białka zaangażowane w kontrolę cyklu komórkowego (m.in. c-JUN i cyklinę D1) i zahamowanie apoptozy (np. Bcl-2). Aktywacja szlaku cAMP-CREB-PKA przyczynia się do niekontrolowanych podziałów i zmniejszonej apoptozy komórek nowotworowych.

Wywołana pobudzeniem przekąźnictwa β_2 -adrenergicznego aktywacja PKA w sposób bezpośredni i pośredni stymuluje również ścieżkę sygnałową kinazy 3-fosfatydylinozytolu (ang. *phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3K) i kinazy białkowej AKT(50). PI3K powoduje fosforylację 4,5-difosforanu fosfatydylinozytolu (ang. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*, PIP2) do 3,4,5-trifosforanu fosfatydylinozytolu (ang. *phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*, PIP3), który z kolei fosforyluje kinazę białkową AKT. Szlak PI3K/AKT odpowiedzialny jest za regulację cyklu komórkowego, a jego nieprawidłowa aktywacja jest jednym z kluczowych mechanizmów prowadzących do powstawania i rozwoju wielu typów nowotworów, w tym pRCC(51). Aktywna kinaza

AKT fosforyluje białka zaangażowane w zahamowanie apoptozy i pobudzenie proliferacji komórek, takie jak MDM2, mTOR, GSK3 β , JNK czy kaspaza 9. Wykazano również, że nieprawidłowa aktywacja tego szlaku związana jest z opornością pRCC na leczenie TKI(52).

Stymulacja β_2 -ARs jak wspomniano w podrozdziale 1.2.2.1 opisującym działanie tego receptora, powoduje również aktywację szlaku sygnałowego Ras-Raf-MEK-ERK. Jest to kolejna ścieżka zaangażowana w regulację proliferacji, przeżycia i migracji komórek. W wyniku pobudzenia kaskady kinaz tego szlaku dochodzi do przeniesienia sygnału z błony do jądra komórkowego, w którym aktywowane zostają czynniki transkrypcyjne odpowiedzialne za ekspresję białek uczestniczących w proliferacji i różnicowaniu komórek. Nieprawidłową funkcję tej kaskady, wynikającą z mutacji w genie *RAS*, stwierdza się w około 30% nowotworów(53). Nadmierna aktywacja Ras-Raf-MEK-ERK prowadzi do niekontrolowanej proliferacji komórek nowotworowych. W przypadku pRCC wykazano, że nadekspresja białek wchodzących w tego skład szlaku sygnalizacyjnego może wiązać się z gorszym przebiegiem i opornością na leczenie(52).

Wykazano również, że pomiędzy β_2 -AR a receptorem naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) może zachodzić zjawisko tzw. transaktywacji(54). Transaktywacja to mechanizm, w którym dochodzi do wzajemnej aktywacji białek należących do odmiennych układów receptorowych. W tym przypadku pobudzenie receptora sprzężonego z białkiem G, takiego jak β_2 -AR, powoduje aktywację drugiego receptora o aktywności kinazy tyrozynowej, takiego jak EGFR. Wywołana przez β_2 -AR stymulacja β -arrestyny i związanej z nią kinazy Src prowadzi do aktywacji metaloproteinaz, które przyczyniają się do uwolnienia prekursora czynnika wzrostu naskórka wiążącego heparynę (ang. *pro heparin-binding epidermal growth factor*, pro-HB-EGF). Pro-HB-EGF aktywuje następnie EGFR i prowadzi do powstania kompleksu β_2 AR-EGFR, który wyzwala kaskadę sygnałową związaną z EGFR. Wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe, do których pobudzenia dochodzi w wyniku transdukcji sygnału z EGFR, to między innymi szlak PI3K/AKT i Ras-Raf-MEK-ERK. Pobudzenie tych szlaków przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego prowadzi do opisanych wcześniej zjawisk: zwiększonej proliferacji, zahamowania apoptozy i zwiększonej inwazji komórek nowotworowych(55).

1.2.2.2.2 Wpływ na angiogenezę nowotworową

Katecholaminy, a w szczególności noradrenalina, mają istotny i bezpośredni wpływ na proces powstawania i rozbudowywania sieci naczyń krwionośnych, czyli angiogenezę(56). Fizjologiczna regulacja angiogenezy w zdrowych tkankach zachodzi dzięki równowadze pomiędzy aktywnością czynników pro- i antyangiogennych. W przypadku angiogenezy nowotworowej dochodzi do zachwiania równowagi w kierunku czynników proangiogennych, co prowadzi do niekontrolowanej i patologicznej neoangiogenezy. Proces ten odgrywa istotną rolę we wzroście i przerzutowaniu nowotworów. Do czynników stymulujących angiogenezę zaliczane są: naczyniopochodny czynnik wzrostu (ang. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), czynnik wzrostu pochodzący z płytek krwi (ang. *platelet-derived growth factor*, PDGF), łożyskowy czynnik wzrostu (ang. *placenta-derived growth factor*, PlGF), transformujący czynnik wzrostu β (ang. *transforming growth factor* β , TGF- β), interleukiny 6 i 8 (IL-6, IL-8). Spośród wyżej wymienionych uważa się, że VEGF odgrywa kluczową rolę w angiogenezie nowotworowej. VEGF wywołuje swój efekt biologiczny poprzez połączenie z receptorami należącymi do rodziny receptorów kinazy tyrozynowej. Do tej grupy receptorów zaliczany jest VEGFR1 i VEGFR2. Receptor VEGFR3 ulega ekspresji jedynie w komórkach śródbłónka naczyń limfatycznych, w związku z tym jego rola ogranicza się do limfangiogenezy. Główny efekt na proliferację komórek śródbłónka naczyniowego i powstawanie naczyń krwionośnych VEGF wywiera poprzez połączenie z receptorem VEGFR2. Funkcja VEGFR1 jest bardziej złożona. Uważa się, że jest to receptor pełniący funkcję regulatorową względem VEGFR2, działający jako naturalny antagonistą względem VEGFR1. W badaniach wielu nowotworów wykazano też, że noradrenalina i adrenalina poprzez stymulację β_2 -ARs zwiększają ekspresję VEGF, co przyczynia się do powstawania nowych naczyń krwionośnych w mikrośrodku nowotworu(39). Ponadto aktywacja β_2 -ARs zwiększa ekspresję innych czynników proangiogennych takich jak IL-6, IL-8, metaloproteiny macierzy pozakomórkowej 2 i 9 (ang. *matrix metalloproteinase* MMP-2 i MMP-9)(57,58). Powyższe czynniki stymulujące angiogenezę mogą być wytwarzane zarówno przez komórki nowotworu jak i mikrośrodku nowotworu: np. makrofagi czy komórki śródbłónka naczyniowego(59). Wykazano ponadto, że wywołana pobudzeniem przekąźnictwa β_2 -adrenergicznego zwiększona ekspresja MMP-2, MMP-9 i VEGF, może być regulowana przez czynnik indukowany hipoksją 1 (ang. *hypoxia-inducible factor-1*, HIF-1), będący czynnikiem

transkrypcyjnym odgrywającym istotną rolę w patogenezie i oporności na leczenie wielu nowotworów, w tym w szczególności w pRCC(52).

1.2.2.2.3 Wpływ na odpowiedź immunologiczną

Na powierzchni komórek układu immunologicznego takich jak makrofagi, komórki NK, limfocyty B, komórki dendrytyczne, limfocyty T cytotoksyczne i limfocyty T pomocnicze, wykazano obecność β -ARs, w tym głównie podtypu 2 tych receptorów(60). W warunkach fizjologicznych sygnalizacja β_2 -adrenergiczna odpowiada za regulację produkcji i sekrecji cytokin przez wyżej wymienione komórki. Odgrywa ona też istotną rolę w regulacji przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej(61). Pobudzenie przekąźnictwa β_2 -adrenergicznego zmniejsza napływ komórek NK do mikrośrodowiska guza, hamuje ich degranulację i aktywność cytotoksyczną wobec komórek nowotworowych(62,63). Pobudzenie β_2 -ARs zwiększa też infiltrację mikrośrodowiska nowotworu przez makrofagi(64), co przekłada się na zwiększenie ekspresji wydzielanych przez makrofagi czynników związanych z progresją nowotworu takich jak cyklooksigenaza-2 (COX-2), MMP-9, TGF- β (64,65). Zwiększona ekspresja powyższych czynników i napływ makrofagów mogą powodować osłabioną odpowiedź immunologiczną przeciwko komórkom nowotworowym oraz zwiększoną angiogenezę, co wpływa na szybszą progresję nowotworu i powstawanie nowych przerzutów(66). Stymulacja β_2 -ARs przyczynia się również do transformacji makrofagów z fenotypu M1 do M2(67). Subpopulacja M1 to makrofagi pośredniczące m.in. w immunologicznej odpowiedzi przeciwnowotworowej, podczas gdy makrofagi o fenotypie M2 to komórki wywołujące supresyjny wpływ na układ immunologiczny, w tym na odpowiedź skierowaną przeciwko komórkom nowotworu. Pobudzenie przekąźnictwa przez β_2 -ARs, powodujące polaryzację makrofagów w kierunku podtypu M2, wpływa zatem przemianę mikrośrodowiska guza sprzyjające rozwojowi i progresji nowotworów(65,67).

Pobudzenie β_2 -ARs upośledza również produkcję interferonu (IFN) przez komórki dendrytyczne i uwalnianie IFN- γ przez cytotoksyczne limfocyty T(68). Stymulacja sygnalizacji β_2 -adrenergicznej zmniejsza liczbę limfocytów efektorowych CD8+, upośledza ich odpowiedź cytotoksyczną wobec komórek nowotworowych, zwiększając jednocześnie odsetek limfocytów CD4+ o właściwościach immunosupresyjnych (69). W wyniku pobudzenia β_2 -ARs obserwuje się również zwiększoną ekspresję działającej immunosupresyjnie cząsteczki CTLA-4 na powierzchni limfocytów T, co powoduje

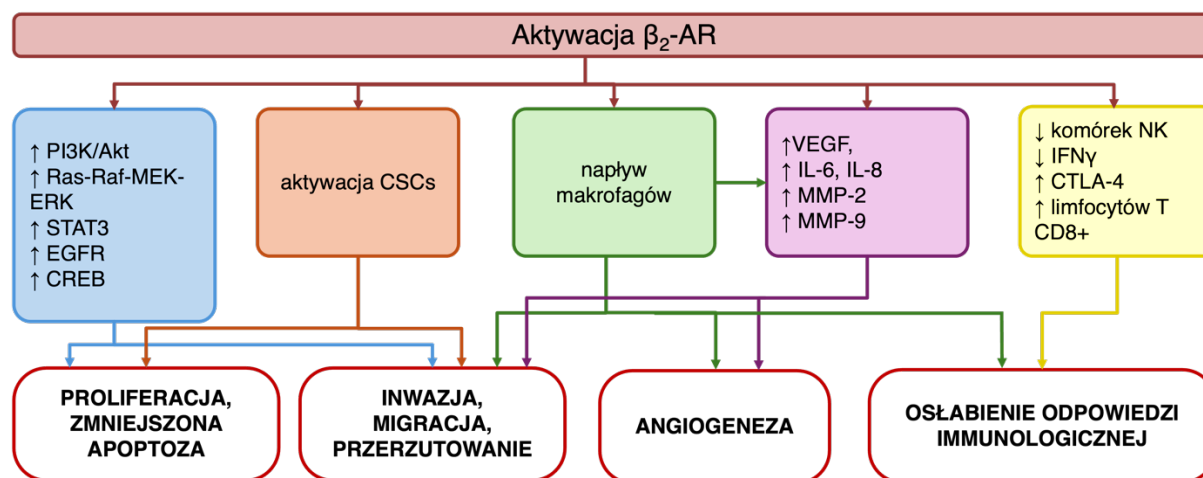
zmniejszoną prezentację antygenów nowotworowych i mniej skuteczną eliminację komórek nowotworowych (70).

1.2.2.2.4 Wpływ na macierzyste komórki nowotworowe

Wykazano również, że pobudzenie β -ARs może stymulować ekspansję nowotworowych komórek macierzystych(71) (ang. *cancer stem cells*, CSCs) – subpopulacji komórek nowotworowych, które posiadają zdolność do intensywnej proliferacji, inwazji środowiska i przerzutowania(72). Uważa się, że są to komórki odpowiedzialne za rozwijanie oporności nowotworu na leczenie, jego przerzutowanie i progresję. Komórki macierzyste RCC wywodzą się z komórek nabłonka proksymalnych kanalików nerkowych. W obrębie CSCs dochodzi do nadmiernej aktywacji wielu szlaków przekazywania takich jak WNT/ β -katenina, Notch, NF- κ B, JAK/STAT, TGF- β , PI3K/AKT(73). Po odkryciu CSCs w latach 90. identyfikacja tych komórek opierała się początkowo biomarkerach zlokalizowanych na powierzchni błony komórkowej(74). Klasyczne markery związane CSCs w RCC to m.in. białka błonowe takie jak prominina-1 (CD133)(75) endogлина (CD105)(75), CD44(75). Jako biomarkery CSCs zidentyfikowano również białka enzymatyczne takie jak anhidraza węglanowa IX (CAIX)(75) i dehydrogenaza aldehydowa (ang. *aldehyde dehydrogenase*, ALDH)(75) oraz białka filamentów pośrednich takie jak nestyna(76). W badaniu guzów RCC u pacjentów po nefrektomii wykazano, że wysoka ekspresja nestyny i ALDH-1 koreluje z wyższym stopniem zaawansowania nowotworu i jego niższym stopniem zróżnicowania(77).

W ostatnim czasie w badaniach z użyciem sekwencjonowania RNA główną uwagę poświęca się jednak markerom molekularnym, identyfikując geny zaangażowane w procesy związane z CSC(73). Wśród nich jako najistotniejsze wymienia się *SOX2* (ang. *SRY-box transcription factor 2*) (78) i *POU5F1* (ang. *POU class 5 homeobox 1*, występujący również pod nazwą *OCT-4*)(79). *SOX-2* i *POU5F1* kodują ekspresję embrionalnych czynników transkrypcyjnych, odpowiednio: czynnika transkrypcyjnego regionu determinującego płeć na chromosomie Y (*SOX-2*) oraz czynnika transkrypcyjnego wiążącego oktamer 4 (ang. *octamer-binding transcription factor 4*, *OCT-4*). Czynniki te są odpowiedzialne za zdolność CSCs do samoodnowienia się, migracji oraz rozwijania oporności na leczenie(73). Wysoka ekspresja *POU5F1* w guzach RCC różnych podtypów histologicznych wiązała się z ich niższym stopniem zróżnicowania i krótszym PFS w przypadku ccRCC(80,81) . W analizie przeprowadzonej wśród chorych z rozpoznaniem

ccRCC na podstawie danych z TCGA wykazano, że wysoka ekspresja *SOX-2* wiązała się z krótszym OS(82).



Rycina 3. Wpływ aktywacji receptorów β_2 -adrenergicznych (β_2 -AR) na nowotwór i jego mikrośrodowisko. COX-2 – cyklooksygenaza 2; CREB – białko wiążące się z elementem odpowiedzi na cAMP; CSCs – macierzyste komórki nowotworowe; CTLA-4 – antygen-4 cytotoksycznych limfocytów T; EGFR – receptor naskórkowego czynnika wzrostu; IFN γ – interferon γ ; IL – interleukina; MMP-2,9 – metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej 2,9; PI3K – kinaza 3-fosfatydyloinozytolu; STAT3 – przekaznik sygnału i aktywator transkrypcji 3; VEGF – naczyniopochodny czynnik wzrostu.

1.2.3 Substancje wpływające na przekaznictwo β -adrenergiczne a nowotwory

1.2.3.1 Badania przedkliniczne

Dane pochodzące z badań przedklinicznych wykazują różną i często rozbieżną nawet w obrębie jednego typu nowotworu rolę substancji wpływających na β -ARs. Najwięcej danych zgromadzono dla raka piersi, jelita grubego, żołądka i jajnika (Tabela 3.).

W raku piersi istnieje grupa badań przedklinicznych, w których wykazano przeciwnowotworowy wpływ β -agonistów: salbutamol wywoływał efekt przeciwnowotworowy poprzez zmniejszenie inwazji i migracji komórek raka piersi(83); inny β_2 -agonista – pirbuterol – hamował proliferację i indukował apoptozę komórek nowotworowych w modelach *in vitro* i modelach zwierzęcych *in vivo*(84). W badaniu na modelu ksenograftów mysich powstałych z linii komórkowych raka piersi wykazano istotny wpływ salbutamolu na zmniejszenie wielkości guzów nowotworowych(85). Z drugiej strony istnieją też doniesienia, w których obserwuje się przeciwny wpływ przekaznictwa β -adrenergicznego na raka piersi. W badaniach na liniach komórkowych

klenbuterol(86) – selektywny β_2 -agonista – stymulował proliferację komórek nowotworowych. Inny agonista β -AR – izoproterenol – powodował zwiększoną inwazję i zmniejszoną deformowalność cytoszkieletu komórek raka piersi(87). Stosowanie nieselektywnego β -antagonisty – propranololu – przekładało się na zmniejszoną inwazję, migrację komórek nowotworowych(88). W modelu mysich ksenograftów powstałych poprzez implantację komórek wywodzących się z przerzutu raka piersi do mózgu, zaobserwowano, że podanie propranololu powoduje zmniejszoną częstość powstawania ognisk przerzutowych w obrębie ośrodkowego układu nerwowego(88). Przyczyny obserwowanych rozbieżności dotyczących roli β -AR w raku piersi pozostają niejasne. Wydaje się, że mogą one wynikać z różnej ekspresji β -ARs pomiędzy poszczególnymi podtypami raka piersi, rodzaju zastosowanego agonisty i antagonisty, braku selektywności badanej substancji wobec konkretnego podtypu β -AR, wybranego modelu doświadczalnego: w przypadku badań *in vitro* nie uwzględnia się roli mikrośrodowiska, podczas gdy w badaniach *in vivo*, na wzrost guza wpływają również otaczające go komórki i substancje docierające do niego siecią naczyń krwionośnych.

W przypadku raka jelita grubego dane pochodzące z badań przedklinicznych są bardziej jednoznaczne. Selektywna blokada β_2 -ARs (w przeciwieństwie do selektywnej blokady β_1 -ARs, która nie wywierała żadnego wpływu) poprzez zastosowanie ICI-118,551 powodowała zmniejszoną żywotność, zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 i apoptozę komórek linii raka jelita grubego, a także hamowała wzrost guzów nowotworowych w modelu ksenograftów mysich(89). W innym badaniu wykazano, że ICI-118,551 hamuje stymulowaną przez adrenalinę proliferację komórek raka jelita grubego(90). Zastosowanie nieselektywnego β -blokera – propranololu – w przeciwieństwie do selektywnego β_1 -antagonisty, powodowało zahamowanie indukowanej przez noradrenalinę migracji komórek raka jelita grubego(91). W modelu mysim raka jelita grubego wykazano, że podanie propranololu powodowało pobudzenie przeciwnowotworowej odpowiedzi układu odpornościowego (92,93).

Wpływ blokady i stymulacji β -ARs w raku żołądka jest podobny do opisywanego w raku jelita grubego. Stosowanie selektywnych β -blokerów takich jak ICI-118,551 czy atenolol przekładało się na zmniejszenie stymulowanej nikotyną proliferacji komórek raka żołądka(94). W innym doświadczeniu na liniach komórkowych tego nowotworu zaobserwowano zmniejszoną proliferację, zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 i apoptozę komórek poddanych działaniu propranololu (95). Stymulacja β_2 -ARs poprzez

zastosowanie salbutamolu powodowała zwiększenie migracji i inwazji komórek nowotworowych, a także wzrost guzów w ksenograftach mysich wytworzonych z komórek raka żołądka(96).

W badaniach przedklinicznych na modelach raka jajnika efekt oddziaływania na przekąźnictwo β -adrenergiczne jest podobny jak w opisanych wyżej nowotworach przewodu pokarmowego. Izoprenalina – nieselektywny β -mimetyk – powodował zwiększoną adhezję(97) i migrację(98) komórek raka jajnika. W modelu mysim raka jajnika zarówno izoprenalina jak i selektywny β_2 -agonista – terbutalina – powodowały zwiększenie liczby i masy guzów nowotworowych oraz wpływały na zwiększoną angiogenezę w obrębie nowotworu. Co istotne selektywny β_1 -agonista – xamoterol – nie wywoływał podobnego efektu. Działania wywołane przez izoprenalinę i terbutalinę mogły jednak zostać zahamowane przez podanie propranololu(99).

Tabela 3. Wyniki wybranych badań przedklinicznych oceniających rolę przekąźnictwa β -adrenergicznego w raku piersi, jelita grubego, żołądka i jajnika.

Cytowanie	Nowotwór	Model	Linia komórkowa	Efekt β -antagonisty	Efekt β -agonisty
(83)	rak piersi	<i>in vitro</i>	IBH-6 MDA-MB-231	-	stymulacja β_2 -AR: zmniejszenie migracji, inwazji, adhezji
		<i>in vivo</i>	MDA-MB-231	-	stymulacja β_2 -AR: zmniejszenie przerzutowania
(84)	rak piersi	<i>in vitro</i>	MDA-MB-231	-	stymulacja β_2 -AR: zahamowanie prolifracji, indukcja apoptozy
		<i>in vivo</i>	MDA-MB-231	-	stymulacja β_2 -AR: zmniejszenie wzrostu guza
(85)	rak piersi	<i>in vitro</i>	MDA-MB-231 IBH-4 IBH-6	blokada β -AR: zmniejszenie wywoływanego	stymulacja β_2 -AR: zahamowanie prolifracji

				salbutamolem zahamowania prolifracji	
		<i>in vivo</i>	MDA-MB-231 IBH-4 IBH-6	blokada β -AR: niejasny efekt, brak efektu	stymulacja β_2 -AR: zmniejszenie wzrostu guza
(86)	rak piersi	<i>in vitro</i>	CG-5	-	stymulacja β_2 -AR: stymulacja prolifracji
(88)	rak piersi	<i>in vitro</i>	MDA-MB-231	blokada β -AR: zahamowanie prolifracji, inwazji	stymulacja β_2 -AR: stymulacja migracji
		<i>in vivo</i>	MDA-MB-231Br	blokada β -AR: zmniejszenie przerzutowania do mózgu	-
(87)	rak piersi	<i>in vivo</i>	MDA-MB-231	blokada β -AR: zniesienie efektu wywołanego β - agonistą	stymulacja β -AR: zwiększenie inwazji, zmniejszenie deformowalności
(100)	rak piersi	<i>in vitro</i>	MDA-MB-468	blokada β_2 -AR: zniesienie efektu wywołanego β_2 - agonistą	stymulacja β_2 -AR: stymulacja migracji
(89)	rak jelita grubego	<i>in vitro</i>	Colo205 HT29	blokada β_2 -AR: zmniejszenie żywołności, zatrzymanie podziałów komórkowych, stymulacja apoptozy	-

		<i>in vivo</i>	HT29	blokada β_2 -AR: zmniejszenie wzrostu guza	-
(90)	rak jelita grubego	<i>in vitro</i>	HT29	blokada β_2 -AR: zmniejszenie stymulowanej adrenaliną prolifracji	stymulacja β -AR: stymulacja prolifracji
(91)	rak jelita grubego	<i>in vitro</i>	SW 480	blokada β_2 -AR: zmniejszenie stymulowanej noradrenaliną migracji	stymulacja β -AR: stymulacja migracji
(93)	rak jelita grubego	<i>in vivo</i>	CT26	blokada β -AR: immunomodulacja, zmniejszenie wzrostu guza w połączeniu z chemioterapią	-
(92)	rak jelita grubego	<i>in vivo</i>	MC38	blokada β -AR: zmniejszenie wzrostu guza, hamowanie angiogenezy, immunomodulacja	-
(94)	rak żołądka	<i>in vitro</i>	AGC	blokada β -AR: zmniejszenie stymulowanej nikotyną proliferacji	stymulacja β -AR: stymulacja prolifracji
(95)	rak żołądka	<i>in vitro</i>	MKN45 NUGC3	blokada β -AR: zmniejszenie żywołności, zatrzymanie podziałów	-

				komórkowych, stymulacja apoptozy	
		<i>in vivo</i>	MKN45	blokada β -AR: zmniejszenie wzrostu guza	-
(96)	rak żołądka	<i>in vitro</i>	MGC803 SGC-7901	blokada β_2 -AR: zmniejszenie migracji i inwazji	stymulacja β_2 -AR: stymulacja migracji i inwazji
		<i>in vivo</i>	MGC803	blokada β_2 -AR: zmniejszenie wzrostu guza, hamowanie EMT	stymulacja β_2 -AR: pobudzenie wzrostu guza, pobudzenie EMT
(101)	rak żołądka	<i>in vivo</i>	SGC-7901	blokada β -AR: wzmocnienie efektu radioterapii w zmniejszeniu wzrostu guza	-
	rak żołądka	<i>in vitro</i>	SGC-7901 BGC-823	blokada β -AR: zmniejszenie prolifracji, zatrzymanie podziałów komórkowych, stymulacja apoptozy	-
(97)	rak jajnika	<i>in vitro</i>	Ovcar3	-	stymulacja β -AR: zwiększona adhezja
(98)	rak jajnika	<i>in vitro</i>	Ovcar3	-	stymulacja β -AR: stymulacja migracji
(99)	rak jajnika	<i>in vitro</i>	SKOV3ip1 HeyA8 A2780	-	stymulacja β -AR: stymulacja prolifracji, angiogenezy,

		<i>in vivo</i>	HeyA8	blokada β -AR: zmniejszenie wzrostu guza wywołanego stosowaniem agonisty	stymulacja β -AR: pobudzenie wzrostu guza, angiogenezy
--	--	----------------	-------	---	---

β -AR: receptor β -adrenergiczny, EMT: przejście epitelialno-mezenchymalne (ang. *epithelial-mesenchymal transition*).

1.2.3.2 *Badania epidemiologiczne*

Z uwagi na wysoką ekspresję β -ARs w komórkach nowotworowych i wykazany w badaniach przedklinicznych związek między aktywacją tych receptorów a biologią nowotworu, przybywa cały czas danych z zakrojonych na szeroką skalę badań epidemiologicznych badających zależność pomiędzy użyciem tych leków a śmiertelnością związaną z nowotworami. Biorąc pod uwagę wykorzystywane w praktyce leki oddziałujące na przekąźnictwo β -adrenergiczne, najwięcej danych zgromadzono dla substancji z grupy selektywnych i nieselektywnych β -antagonistów – tzw. β -blokerów – wykorzystywanych w leczeniu nadciśnienia tętniczego, zaburzeń rytmu i niewydolności serca. Leki z grupy β -mimetyków wykorzystywane są głównie w intensywnej terapii (np. dobutamina) lub w postaciach wziewnych wykazujących głównie miejscowe a nie systemowe działanie (salbutamol, salmeterol, fenoterol formoterol wykorzystywane w leczeniu astmy). W związku z powyższym, większość badań epidemiologicznych i klinicznych skupia się na ocenie leków z grupy β -blokerów a nie β -agonistów. W przeprowadzonych dotychczas analizach wykazano istotnie statystyczny związek pomiędzy stosowaniem leków z grupy β -antagonistów a wydłużeniem OS u pacjentów z rozpoznaniem raka prostaty(102), niedrobnokomórkowego raka płuca(103), czerniaka(104), raka jajnika(105). W metaanalizie 12 badań wykazano wpływ stosowania β -blokerów na wydłużenie OS u pacjentów z różnymi rodzajami nowotworów (HR = 0,79; 95 % CI 0,67–0,93; p = 0,004)(106). Wydaje się jednak, że przeciwnowotworowy wpływ β -antagonistów nie jest zjawiskiem uniwersalnym i może zależeć od typu nowotworu. W badaniach populacyjnych pacjentek z nadciśnieniem tętniczym wykazano zależny od dawki wpływ przyjmowania selektywnych β_1 -antagonistów na zwiększone ryzyko zachorowania na raka piersi(107,108). W niedawno opublikowanej metaanalizie 22 badań u pacjentek z rakiem piersi wykazano wpływ stosowania β -blokerów na zwiększone ryzyko

zachorowania na ten typ nowotworu, ale tylko u pacjentek populacji europejskiej (RR: 1,380, 95% CI: 1,162-1,639; I²= 90.7%) (109). Z drugiej strony u pacjentek z już rozpoznany wczesnym rakiem piersi, w metaanalizie 13 badań udowodniono korzystny wpływ stosowania β -blokerów na czas wolny od nawrotu choroby (HR = 0,73; 95% CI, 0,56-0,96; p = 0,025), nie wykazując jednak wpływu na OS(110).

1.2.3.3 Badania kliniczne

Z uwagi na ograniczenia z jakimi wiążą się badania epidemiologiczne, w szczególności ich głównie retrospektywny charakter, uwzględnienie w analizach epidemiologicznych wielu leków z grupy β -blokerów o różnych mechanizmach działania bez podziału na selektywnych i nieselektywnych antagonistów oraz możliwy wpływ β -blokerów na zmniejszenie śmiertelności z przyczyn sercowo-naczyniowych a nie onkologicznych, powyższe wyniki wymagają potwierdzenia w prospektywnych badaniach klinicznych z randomizacją (ang. *randomized controlled trial*, RCT). Wykaz przeprowadzonych dotychczas RCT został przedstawiony w Tabeli 4. W większości z wymienionych badań stosowano nieselektywnego β -antagonistę – propranolol – a najczęściej badanym nowotworem był rak piersi.

W RCT przeprowadzonym na 60 pacjentkach z rozpoznaniem raka piersi przedoperacyjne podanie propranololu przez 7 dni przed radykalnym zabiegiem operacyjnym, powodowało zwiększoną infiltrację guza przez komórki układu odpornościowego i zmniejszoną ekspresję genów związanych z niekorzystnym rokowniczo fenotypem mezenchymalnym(111). Podobne wyniki uzyskano, podając okołooperacyjnie propranolol z inhibitorem COX-2, etodolakiem. Połączenie tych leków powodowało zahamowanie przejścia epitelialno-mezenchymalnego (ang. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT), zmniejszenie ekspresji czynników transkrypcyjnych związanych z przerzutowaniem i zwiększeniem infiltracji guza przez limfocyty B(112). Okołooperacyjne zastosowanie propranololu u pacjentek poddanych mastektomii zmniejszało wywołaną zabiegiem immunosupresję i powodowało zmniejszenie pooperacyjnego wzrostu liczby limfocytów T regulatorowych⁸⁸. W raku jelita grubego przeprowadzono jedno RCT, w którym oceniano połączenie propranololu z etodolakiem w leczeniu okołooperacyjnym. W grupie eksperymentalnej zaobserwowano zmniejszone EMT, korzystny profil biomarkerowy związany z agresywnym fenotypem nowotworu, co przełożyło się na zmniejszenie ryzyka nawrotu choroby (0% w grupie eksperymentalnej 29,4% w grupie kontrolnej, p=0,054)(113). Pooperacyjne podanie propranololu u pacjentów z czerniakiem w stadium

IB do IIIA spowodowało 80% spadek ryzyka nawrotu choroby (HR = 0,18; 95%CI [0,04–0,89]; p=0,03).

Tabela 4. Wyniki badań klinicznych z randomizacją z wykorzystaniem leków wpływających na przekaznictwo β -adrenergiczne.

Cytowanie	Nowotwór	Leczenie	Rodzaj leczenia	Wyniki	Faza
(111)	rak piersi	propranolol	radikalne, przedoperacyjne	zmniejszenie ekspresji genów fenotypu mezenchymalnego, zwiększenie infiltracji guza przez komórki układu odpornościowego	II
(112)	rak piersi	propranolol + etodolak	radikalne, okołoperacyjne	zmniejszenie EMT, zmniejszenie ekspresji prometastatycznych czynników transkrypcyjnych, zwiększenie infiltracji przez limfocyty B	II
(114)	rak piersi	propranolol + parekoksyb	radikalne, okołoperacyjne	zmniejszenie wywołanego operacją napływu limfocytów T regulatorowych (efekt wyłącznie dla propranololu)	II
(113)	rak jelita grubego	propranolol + etodolak	radikalne, okołoperacyjne	zmniejszenie EMT, zmniejszenie biomarkerów agresywnego fenotypu, zmniejszenie ryzyka nawrotu	II
(115)	czerniak	propranolol	radikalne, pooperacyjne	spadek ryzyka nawrotu choroby	I

EMT: przejście epitelialno-mezenchymalne (ang. epithelial-mesenchymal transition).

1.2.4 Nadciśnienie tętnicze a rak nerki

Jak opisano powyżej, leki z grupy β -blokerów są powszechnie stosowane w leczeniu m.in. nadciśnienia tętniczego. Między rakiem RCC a nadciśnieniem tętniczym istnieją jednak bardziej złożone, wielokierunkowe zależności.

Po pierwsze, nadciśnienie tętnicze jest uznanym czynnikiem ryzyka rozwoju RCC, choć mechanizmy leżące u podstaw tej relacji nie zostały jeszcze w pełni wyjaśnione. Metaanaliza, w której uwzględniono dane z 18 badań obserwacyjnych, wykazała około 54% wyższe ryzyko zachorowania na RCC u osób z rozpoznaniem nadciśnienia tętniczego(116). Zależność ta nasilała się wraz ze wzrostem ciśnienia skurczowego i rozkurczowego, niezależnie od stosowania leków hipotensyjnych oraz innych czynników ryzyka zachorowania na RCC takich jak otyłość, nikotynizm czy rodzinne obciążenie RCC(116)(117).

Nadciśnienie tętnicze może również występować jako zespół paranowotworowy w przebiegu RCC, będąc skutkiem nadmiernej produkcji przez komórki nowotworowe substancji takich jak renina, endoteliny czy katecholaminy(118). Nadciśnienie tętnicze wtórne do RCC może wynikać również z ucisku guza na naczynia nerkowe, co prowadzi do zaburzeń perfuzji nerkowej oraz aktywacji układu renina-angiotensyna-aldosteron(118)(119).

Nadciśnienie u pacjentów z RCC może mieć też charakter jatrogenny. Według niektórych doniesień nefrektomia może przyczyniać się do wzrostu ciśnienia tętniczego, m.in. w wyniku ucisku na miąższ nerki przez krwiak pooperacyjny, materiał hemostatyczny lub tkankę bliznowatą powstałą w łoży po usuniętym guzie(120). Ponadto, leki z grupy TKI, powszechnie stosowane w leczeniu RCC, mogą prowadzić do rozwoju nadciśnienia tętniczego. Mechanizmy leżące u podłoża tego działania niepożądanego leków z grupy TKI obejmują: zahamowanie produkcji tlenu azotu, wzrost poziomu endoteliny-1, spadek gęstości naczyń mikrokrażenia w wyniku zahamowania angiogenezy(121). Co ciekawe, pojawienie się nadciśnienia tętniczego wywołanego leczeniem może być czynnikiem predykcyjnym odpowiedzi na leczenie substancjami z grupy TKI, związanym z wydłużeniem PFS (HR= 0,21; 95% CI 0,076-0,59, p=0,0030)(122).

1.2.5 Rola receptorów β_2 -adrenergicznych w raku nerkowokomórkowym

W odniesieniu do RCC nie ma obecnie przekonujących danych literaturowych jednoznacznie wskazujących na rolę receptorów β_2 -adrenergicznych w patogenezie i

patofizjologii tego nowotworu. Analiza danych z *The Cancer Genome Atlas* (ang. TCGA) wykonana w 2018 roku wykazała, że zmniejszona ekspresja genu *ADRB2*, kodującego białko dla β_2 -AR, była negatywnym czynnikiem prognostycznym w odniesieniu do OS u pacjentów z ccRCC(123). W badaniach na liniach komórkowych ccRCC, związanego z dziedzicznym zespołem von Hippel-Lindau, jak i na linii komórkowej brodawkowego raka nerki 786-O wykazano, że selektywny antagonist β_2 -AR – ICI-118,551 – zmniejszał żywotność komórek i zwiększał ich apoptozę(124). W doświadczeniach na modelach ksenograftów mysich wytworzonych z komórek linii 786-O potwierdzono, że podawanie ICI-118,551 zmniejszało tempo wzrastania nowotworu(124).

W badaniach klinicznych związek między zastosowaniem leków z grupy β -blokerów a RCC jest różny w zależności od etapu choroby i badanego parametru. W odniesieniu do ryzyka zachorowania na RCC, w metaanalizie 31 badań wykazano związek pomiędzy stosowaniem leków z grupy β -blokerów a zwiększonym ryzykiem zachorowania na RCC (RR = 1,29, 95% CI:1,22-1,37)(125). W przypadku pacjentów z postawionym rozpoznaniem RCC w stadium operacyjnym i równoczesnym rozpoznaniem nadciśnienia tętniczego nie wykazano istotnego statystycznie wpływu przyjmowania leków z grupy β -blokerów na ryzyko progresji choroby nowotworowej i zgonu(126). Z drugiej strony, w badaniu retrospektywnym przeprowadzonym u pacjentów z rozpoznaniem rozsianego RCC w trakcie terapii lekami z grupy TKI wykazano, że równoczesne stosowanie leków β -blokerów wiązało się z lepszym rokowaniem: wydłużeniem PFS (20,4 miesiąca vs 11,4 miesiąca, $p=0,042$) i OS (47 miesiąca vs 18 miesiąca, $p=0,042$)(127). Podobną zależność wykazano w badaniu na małej grupie 14 pacjentów z rozpoznaniem rozsianego RCC leczonych inhibitorami punktu kontrolnego i jednoczesnym rozpoznaniem nadciśnienia tętniczego – w grupie pacjentów przyjmujących β -blokery zaobserwowano zwiększony odsetek ORR (40% vs 10%) (128).

Brak jest natomiast jakichkolwiek danych literaturowych na temat roli β_2 -AR w pRCC.

2 Założenia i cele pracy

2.1 Założenia

Jak dowodzą liczne badania z ostatnich lat, stres jest istotnym czynnikiem ryzyka rozwoju i progresji chorób nowotworowych. Wpływ katecholamin działających poprzez receptory β -adrenergiczne został wykazany w przypadku wielu typów nowotworu. Z przeprowadzonego na potrzeby niniejszej pracy przeglądu literatury wynika, że wpływ substancji wpływających na β -ARs może być różny w zależności od typu nowotworu. Ponadto wyniki badań epidemiologicznych sugerują silną korelację pomiędzy szacowanym przeżyciem chorych onkologicznych a stosowaniem antagonistów receptorów β -adrenergicznych. W odniesieniu do RCC nie ma obecnie przekonujących danych literaturowych wskazujących na rolę β -ARs w rozwoju i patogenezie tego nowotworu. Biorąc pod uwagę wysoką ekspresję receptorów β -ARs w RCC, udokumentowany wpływ β -ARs – a w szczególności podtypu β_2 – na karcynogenezę w innych nowotworach oraz brak badań dotyczących roli tych receptorów w patofizjologii RCC, za cel pracy przyjęto zbadanie roli przekaźnictwa β_2 -adrenergicznego w pRCC.

2.2 Cele

Celem niniejszej pracy była ocena roli β_2 -ARs w patofizjologii pRCC.

W ramach pierwszej części pracy wykonano analizę bioinformatyczną TCGA, w której postawiono poniższe cele (Część I):

1. Ocena poziomu ekspresji genu *ADRB2* w dwóch najczęstszych podtypach histologicznych RCC;
2. Korelacja poziomu ekspresji genu *ADRB2* z parametrami kliniczno-patomorfologicznymi pRCC;
3. Korelacja poziomu ekspresji genu *ADRB2* z rokowaniem pacjentów z pRCC.

W ramach drugiej części pracy przeprowadzono badania na liniach komórkowych wyprowadzonych z guza pierwotnego i przerzutu pRCC. Cele tej części doświadczeń obejmowały (Część II):

1. Zbadanie wpływu agonistów i antagonistów β_2 -ARs na żywotność komórek pRCC;
2. Ocenę wpływu agonistów i antagonistów β_2 -ARs na ekspresję w komórkach nowotworowych genów związanych z fenotypem CSCs;

3. Ocenę wpływu agonistów i antagonistów β 2-ARs na ekspresję w komórkach nowotworowych genów związanych z angiogenezą.

3 Materiał i metody

3.1 Analiza bioinformatyczna *The Cancer Genome Atlas*

Analizie statystycznej poddano dane z bazy TCGA (<https://www.cancer.gov/tcga>). TCGA to projekt zainicjowany przez Narodowy Instytut Raka (ang. *National Cancer Institute*, NCI), gromadzący dane genomyczne i kliniczne z ponad 20 tysięcy próbek reprezentujących 33 typy nowotworów. Na podstawie danych zgromadzonych w powyższej bazie dokonano analizy ekspresji genu *ADRB2* pośród różnych nowotworów, a następnie pomiędzy próbkami pacjentów z rozpoznaniem ccRCC i pRCC. Analizę statystyczną przeprowadzono używając testu log rank i Chi kwadrat z wykorzystaniem cBioPortal(129,130). Następnie na podstawie danych zgromadzonych w *The Cancer Genome Atlas Kidney Renal Papillary Cell Carcinoma* dokonano analizy pomiędzy ekspresją genu *ADRB2* a danymi klinicznymi i patologicznymi u pacjentów z rakiem brodawkowatym nerki(17). Poziom ekspresji mRNA został znormalizowany względem ekspresji mRNA w prawidłowej tkance (log RNA Seq V2 RSEM) i przedstawiony w postaci Z-score. Pacjentów podzielono na 2 grupy: chorych z wysoką ekspresją genu *ADRB2* (poziom ekspresji w porównaniu do ekspresji w tkance prawidłowej powyżej średniego poziomu w kohorcie; $ADRB \geq 0$) oraz z niską ekspresją (poziom ekspresji w porównaniu do ekspresji w tkance prawidłowej poniżej średniego poziomu w kohorcie; $ADRB < 0$). Na podstawie powyższego podziału przeprowadzono analizy zależności ekspresji i parametrów klinicznych (stopień zaawansowania klinicznego, obecność przerzutów do węzłów chłonnych) oraz analizy przeżycia wykorzystując estymator Kaplana-Meiera (131).

3.2 Hodowle komórkowe

Do doświadczeń użyto następujących linii komórkowych:

- Caki-1 (ATCC® HTB-46™),
- Caki-2 (ATCC® HTB-47™),
- 786-O (ATCC® HTB-CRL-1932™),
- ACHN (ATCC® CRL-1611™).

3.2.1 Linia komórkowa Caki-1

Linia komórkowa Caki-1 została wyizolowana w 1971 roku z przerzutu RCC do skóry u 49-letniego mężczyzny z RCC przez Jorgena Fogha pracującego wówczas w Memorial

Sloan Kettering Cancer Center(132). Charakteryzuje ją wysoka ekspresja VEGF przy braku mutacji w genie *VHL*. Komórki tej linii tworzą guzy o charakterze jasnokomórkowym w modelach mysich ksenograftów(133).

3.2.2 Linia komórkowa 786-O

786-O to jedna z najwcześniej wyizolowanych i najbardziej rozpowszechnionych linii komórkowych ccRCC. Została ona wyprowadzona z guza pierwotnego ccRCC 58-letniego mężczyzny w 1971 roku(134). Komórki tej linii wykazują mutację w genie *VHL*, a także ścieżkach sygnałowych związanych z VEGF i HIF(135,136).

3.2.3 Linia komórkowa Caki-2

Komórki linii Caki-2 zostały wyprowadzone w 1971 roku z guza pierwotnego RCC 69-letniego mężczyzny przez Jorgena Fogha(132). Początkowo klasyfikowano tę linię jako pochodzącą z ccRCC, jednak współczesne badania morfologii guzów tworzonych przez tę linię w modelach ksenograftów mysich wskazują na ich brodawkowatą morfologię. Ponadto wysoki poziom ekspresji MET i LRRK2 oraz obecne aberracje w obrębie chromosomu 8 potwierdzają, że są to komórki pochodzące z pRCC(133).

3.2.4 Linia komórkowa ACHN

Linia komórkowa ACHN wyizolowana została w 1979 roku z płynu opłucnowego 22-letniego mężczyzny z rozpoznaniem rozlanego RCC(137). We wczesnych badaniach na modelach ksenograftów mysich guzy wytworzone z komórek linii ACHN opisywano jako niskozróżnicowane komórki o jasnej cytoplazmie(138). Biorąc jednak pod uwagę wyniki analiz genomicznych, w których wykryto charakterystyczny dla pRCC polimorfizm w genie *C-MET* i brak mutacji w genie *VHL*, należy zaklasyfikować tę linię jako wywodzącą się z guza pRCC(133,139).

3.2.5 Hodowla komórkowa

Komórki hodowano w butelkach T75 (75 cm² powierzchni) w 10 ml odpowiednich pożywek: McCoy's 5A (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stany Zjednoczone) dla komórek Caki-2, RPMI 1640 (Gibco, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) dla komórek linii Caki-1, ACHN i 786-O. Pożywki były wzbogacone o 10% płodową surowicą bydlęcą (ang. *fetal bovine serum*, FBS, Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stany Zjednoczone) z dodatkiem penicyliny (100 IU/ml) i streptomycyny (100 µg/ml), Komórki

były hodowane w temperaturze 37°C w atmosferze powietrza i 5% stężenia CO₂. Pożywkę wymieniano co 2-3 dni, do czasu osiągnięcia przez komórki 80% konfluencji.

W celu pasażu komórek odcinano pożywkę, komórki przepłukiwano 5 ml PBS bez jonów Ca²⁺ i Mg²⁺ (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stany Zjednoczone), a następnie komórki traktowano 1 ml akutazy (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stany Zjednoczone) celem odklejenia komórek adherentnych od podłoża. Po odklejeniu komórek akutazę neutralizowano co najmniej 2-krotnie większą objętością pożywki hodowlanej. Następnie komórki liczone z wykorzystaniem komory Bürkera oraz zautomatyzowanego licznika komórek (TC20, BioRad, Hercules, Kalifornia, Stany Zjednoczone). Komórki następnie pasażowano do nowych butelek lub wysiewano do odpowiednich eksperymentów. Komórki po minimum jednym pasażu od rozmrożenia wykorzystywano do eksperymentów.

3.3 Ocena żywotności komórek – test z AlamarBlue

Komórki wysiewano na płytki 96-dołkowe w liczbie uzależnionej od tempa podziałów: 6000 komórek na dołek w przypadku linii ACHN, 3000 komórek na dołek dla linii Caki2 i 786-O, 4000 komórek na dołek dla linii Caki1. Po 48h wymieniano pożywkę na świeżą (100 µl) z dodatkiem badanych substancji: salbutamol (MedChemExpress, Monmouth Junction, New Jersey, Stany Zjednoczone) w stężeniach 0,1 – 100 µM, ICI-115,881 (MedChemExpress, Monmouth Junction, New Jersey, Stany Zjednoczone) w stężeniach 0,1 – 100 µM lub rozpuszczalnikiem – wodą w grupie kontrolnej. Komórki hodowano w obecności badanych substancji przez 24 godziny.

Po 24 godzinach hodowli do pożywki komórek dodawano 10 µl odczynnika alamarBlue (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone). Następnie komórki inkubowano dalej przez 2 godziny w 37°C w atmosferze powietrza i 5% stężenia CO₂. Po upływie tego czasu mierzono fluorescencję przy długości fali wzbudzenia 540 nm i emisji fali 595 nm w czytniku płytek Tecan Infinite M Nano⁺. Próbę ślepą stanowiły dołki z pożywką hodowlaną nie zawierającą komórek. Od fluorescencji badanych próbek odejmowano średnią fluorescencję prób ślepej a następnie wyniki uzyskane w komórkach traktowanych badanymi związkami odnoszono do próby kontrolnej. Doświadczenie powtarzano w min. w minimum 3 powtórzeniach biologicznych z niezależnych pasażów komórek. Dla każdego powtórzenia biologicznego wykonywano po min. 3 powtórzenia techniczne.

3.4 Izolacja RNA

Komórki linii komórkowych Caki-1, Caki-2, 786-O i ACHN zebrano jak w pkt 3.2.5 Do tak przygotowanych próbek dodano 1ml Trizolu (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stany Zjednoczone) i inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej. Po dodaniu 100 μ l chloroformu, próbki odwirowano w 4°C przez 15 min z prędkością 12000 x g. Frakcję wodną zawierającą RNA przeniesiono na kolumnienki do ekstrakcji i oczyszczania RNA. Do dalszej izolacji wykonano komercyjny zestaw (Monarch Total RNA Miniprep Kit, New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, Stany Zjednoczone). Dalsze etapy izolacji przeprowadzono zgodnie z protokołem producenta. Stężenie i czystość RNA oceniono za pomocą spektrofotometru (BioRad, Hercules, Kalifornia, Stany Zjednoczone).

3.5 Ilościowa Reakcja Łańcuchowa Polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR)

Wyizolowane RNA wykorzystano do analizy ekspresji wybranych genów metodą qRT-PCR (ang. *quantitative real-time polymerase chain reaction*). Listę wykorzystanych starterów przedstawiono w Tabeli 5. Reakcje amplifikacji przeprowadzono zgodnie z protokołami Life Technologies stosując zestaw TaqMan® RNA-to-CT 1-steep Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone), startery genów badanych i genów referencyjnych (*PPIA*, *RPL13*) oraz wodę wolną od RNazy (RNase-free water; Eppendorf, Hamburg, Niemcy). Całkowita objętość reakcyjna wynosiła 10 μ l.

Reakcję przeprowadzono wg następującej procedury w termocyklerze ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone):

1. Odwrotna transkrypcja w 48°C przez 15 minut
2. Aktywacja enzymu w 95°C przez 10 minut
3. Denaturacja w 40 cyklach w temperaturze 95 °C przez 15 sekund
4. Synteza nowej nici w 40 cyklach w 60 °C przez 1 minutę

Względną ekspresję genu oszacowano na podstawie wartości progu cyklu delta (Δ Ct), jako względna wartość kontroli endogennej, uwzględniając geny referencyjne(140).

Celem oceny różnic w ekspresji genu *ADRB2* pomiędzy różnymi liniami komórkowymi RCC przeprowadzono ilościową ocenę metodą RT-PCR na dwóch liniach komórkowych o fenotypie ccRCC (Caki-1, 786-O) oraz dwóch liniach komórkowych pRCC (Caki-2, ACHN). Dane dostępne w ramach projektu depmap wskazują, że badane linie komórkowe

nie przejawiają wyjściowo zaburzeń w obrębie genu *ADRB2*, które mogłyby wpływać na ostateczne wyniki analizy(141).

Następnie przeprowadzono ocenę qRT-PCR pod kątem ekspresji genów związanych z fenotypem macierzystych komórek nowotworowych (*POU5F1*, *NES*) oraz związanych z angiogenezą (genu *VEGF-A* kodującego białko VEGF-A oraz genu *FLT1* (ang. *Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 1*, inaczej *VEGFR1*) kodującego białko VEGFR1. Powyższą analizę przeprowadzono w komórkach linii Caki-2 i ACHN poddanych działaniu salbutamolu oraz ICI-118,551 w stężeniach 10 μ M i 100 μ M w porównaniu do komórek znajdujących się w próbie kontrolnej, niepoddanych działaniu żadnej z tych substancji.

Tabela 5. Startery genów badanych w analizie qRT-PCR.

Symbol genu	Sonda Taqman Applied Biosystems
<i>PPIA</i>	Hs99999904_m1
<i>RPL13</i>	Hs00744303_s1
<i>ADRB2</i>	Hs00240532_s1
<i>POU5F1</i>	Hs04260367_gH
<i>NES</i>	Hs04187831_g1
<i>FLT-1</i>	Hs01052961_m1
<i>VEGF-A</i>	Rn01511602_m1

3.6 Analiza statystyczna

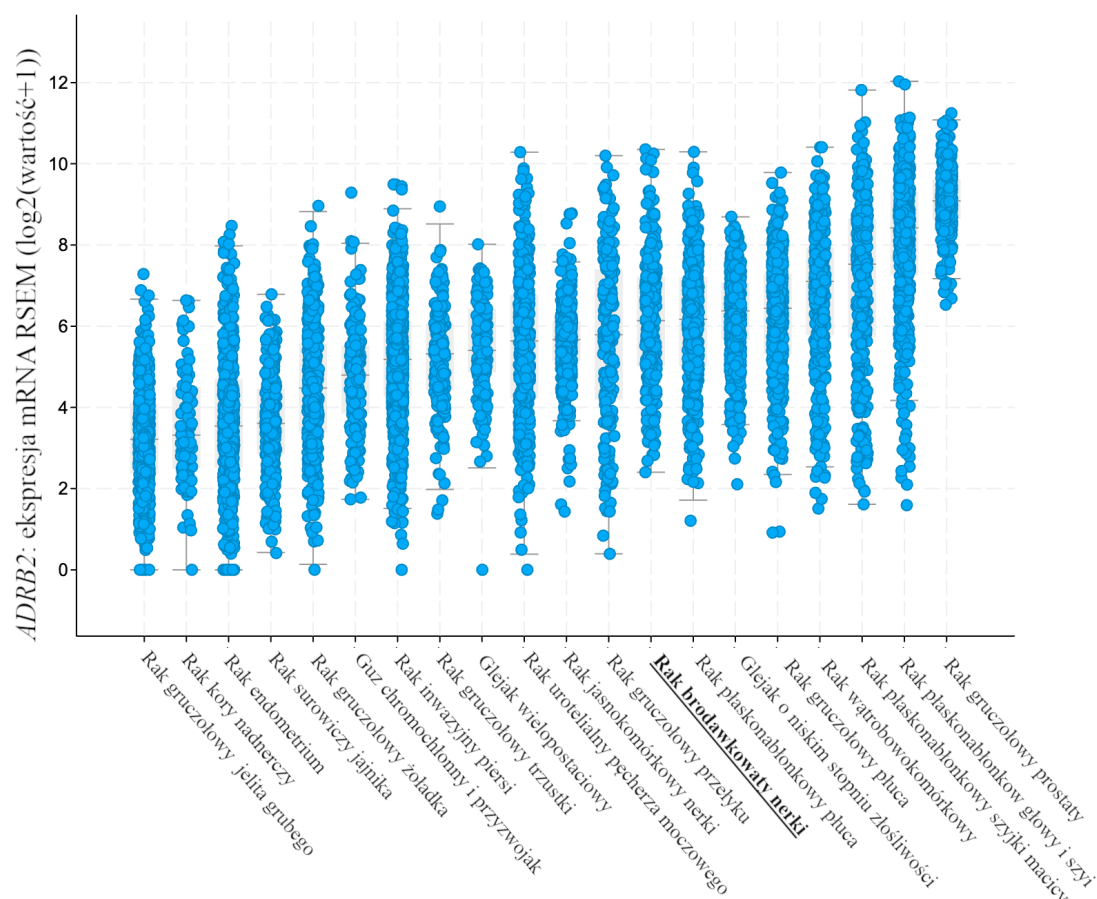
Z uwagi na oczekiwaną heterogenność danych pochodzących z hodowli komórkowych, testy statystyczne wykonywane były za pomocą metod nieparametrycznych. Analiza istotności statystycznej różnic w średniej absorbancji dla oceny żywotności komórek i analiza poziomu ekspresji genów przy pomocy qRT-PCR w liniach komórkowych wykonana była za pomocą nieparametrycznego testu Kruskala-Wallisa(142). W przypadku wykrycia istotnych statystycznie różnic, aby ocenić które pary obserwacji różnią się od siebie użyto testu Dunna z wykorzystaniem korekty Bonferroniego dla wielokrotnych porównań(143). Oznaczenia istotności statystycznej przedstawiono jako: * - 0,05<p<0,01; ** - 0,01<p<0,001; *** - 0,001>p. Obliczenia statystyczne wykonywane były przy użyciu oprogramowania SciPy(144) oraz statsmodels(145).

4 Wyniki badań

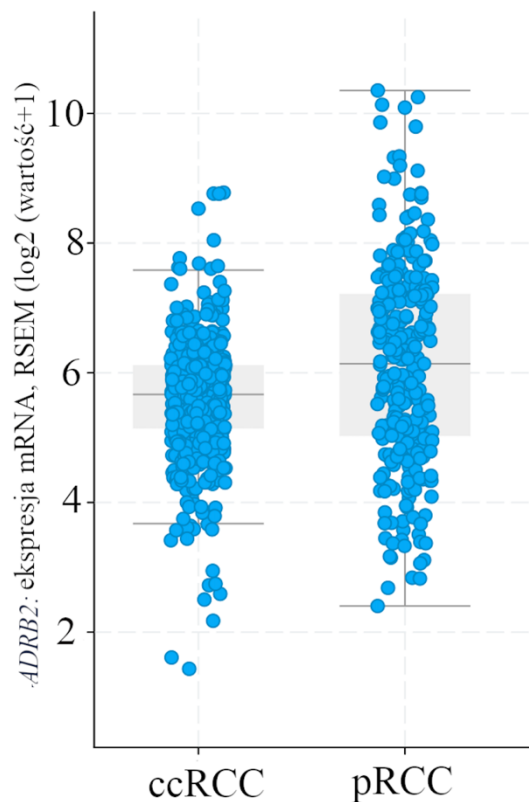
4.1 Wyniki analizy bioinformatycznej The Cancer Genome Atlas

W analizie bioinformatycznej danych zgromadzonych w TCGA wykazano, że pRCC jest ósmym a ccRCC dziesiątym nowotworem pod względem poziomu ekspresji genu *ADRB2* (Rycina 4.).

Następnie przeprowadzono analizę ekspresji genu *ADRB2* w 2 najczęściej występujących podtypach raka nerki: ccRCC i pRCC. Analizie poddano pochodzące z TCGA pochodzące z 512 próbek pacjentów z cRCC i 281 z pRCC. W przeprowadzonej analizie wykazano, że poziom ekspresji genu *ADRB2* jest wyższy w przypadku pRCC w porównaniu z ccRCC (Rycina 5.). Pomimo różnic w medianie poziomu ekspresji *ADRB2* pomiędzy dwoma podtypami raka nerki, nie wykazano istotności statystycznej w zakresie tego parametru.



Rycina 4. Poziom ekspresji genu *ADRB2* w różnych nowotworach wg danych z The Cancer Genome Atlas.

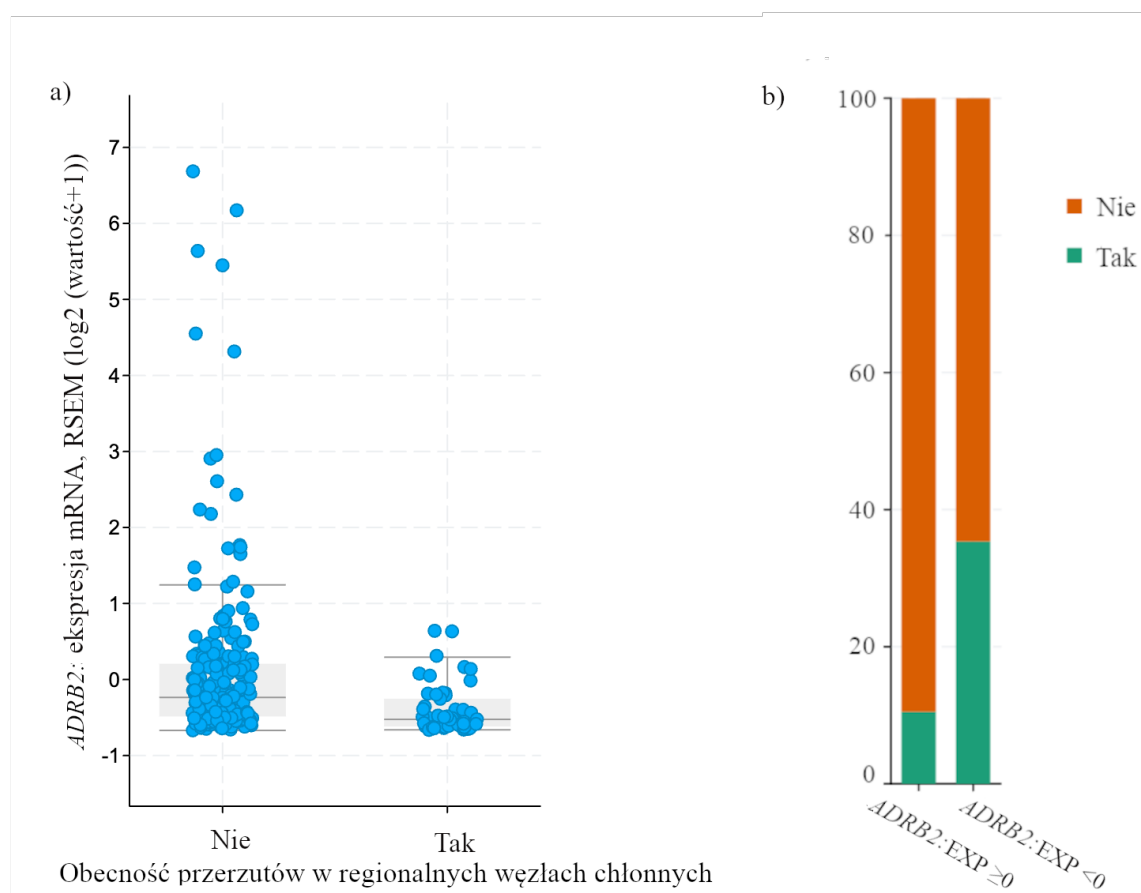


Rycina 5. Poziom ekspresji genu *ADRB2* w 2 najczęstszych podtypach histologicznych raka nerki. ccRCC – rak jasnokomórkowy nerki, pRCC – rak brodawkowaty nerki.

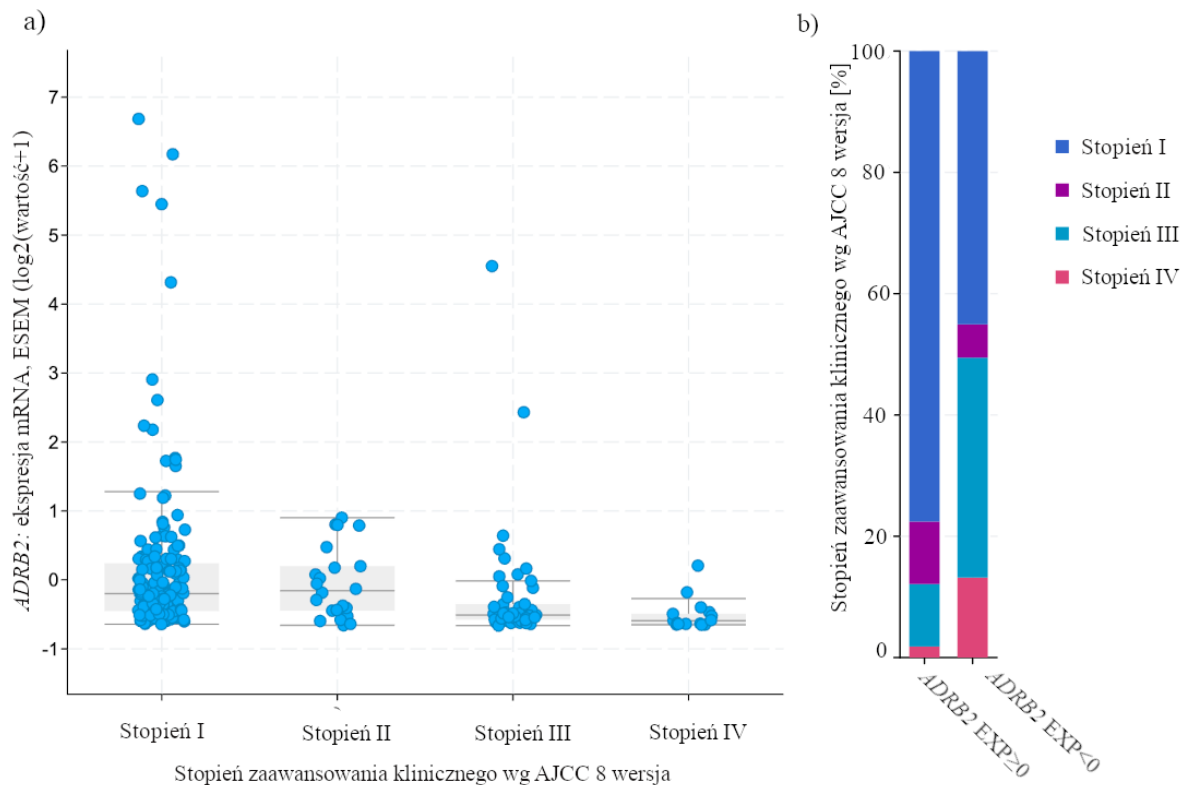
Następnie oceniono poziom ekspresji genu *ADRB2* w zależności od parametrów klinicznych pacjentów z rozpoznaniem pRCC. Charakterystyka pacjentów przedstawiona została w Tabeli 6. Na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej danych klinicznych i patomorfologicznych wykazano, że pacjenci z niższym stopniem zaawansowania klinicznego choroby mieli stwierdzoną wyższą ekspresję genu *ADRB2* w tkance guza (Rycina 6. i 7.). Zajęcie węzłów chłonnych stwierdzono 34,65% pacjentów z niską ekspresją *ADRB2* i u 10,44 % z wysoką ekspresją tego genu (Rycina 6). IV stopień zaawansowania pRCC w momencie diagnozy rozpoznano u 11,88% pacjentów z niską ekspresją *ADRB2* i zaledwie u 1,65% chorych z wysoką ekspresją tego genu (Rycina 7.).

Tabela 6. Charakterystyka pacjentów z rozpoznaniem brodawkowatego raka nerki (pRCC) na podstawie danych z The Cancer Genome Atlas (TCGA). SD – (ang. *standard deviation*, odchylenie standardowe)

Stopień zaawansowania klinicznego (wg 8 edycji klasyfikacji AJCC), n (%) ; n=281	I	169 (59,72%)
	II	23 (7,77%)
	III	50 (17,67%)
	IV	15 (5,30%)
	Brak danych	24 (9,54%)
Płeć, n (%) ; n=281	Mężczyźni	209 (74,56%)
	Kobiety	72 (25,44%)
Wiek (średnia +/- SD)		61,44 +/- 12,05 lat

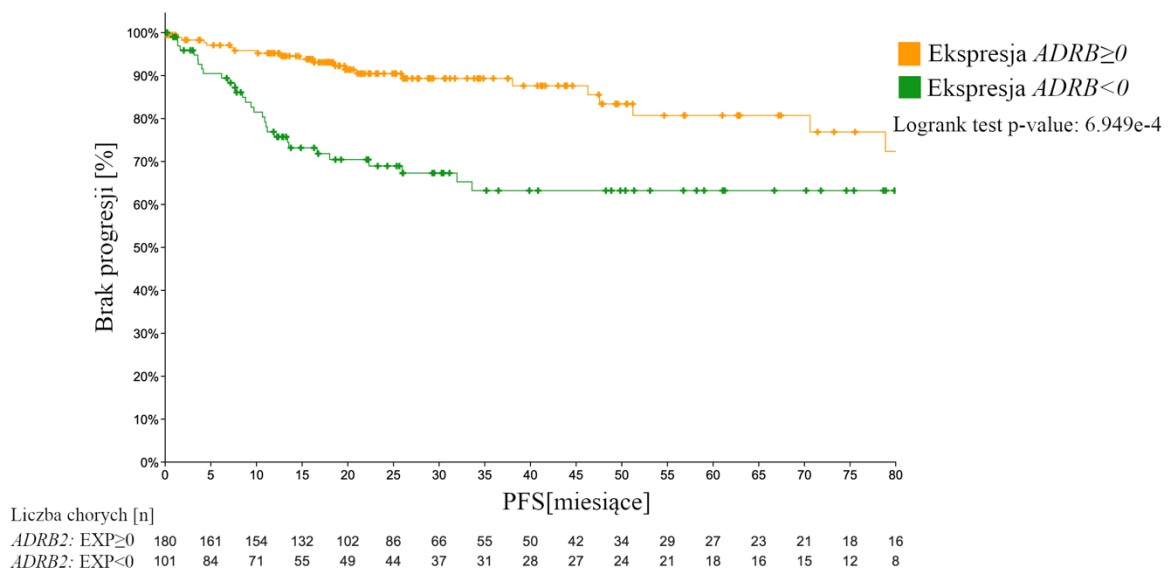


Rycina 6. a) Poziom ekspresji genu *ADRB2* u pacjentów z rakiem brodawkowatym nerki (pRCC) w zależności od obecności przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych w momencie diagnozy. **b)** Odsetek pacjentów z przerzutami w regionalnych węzłach chłonnych w zależności od poziomu ekspresji genu *ADRB2*.

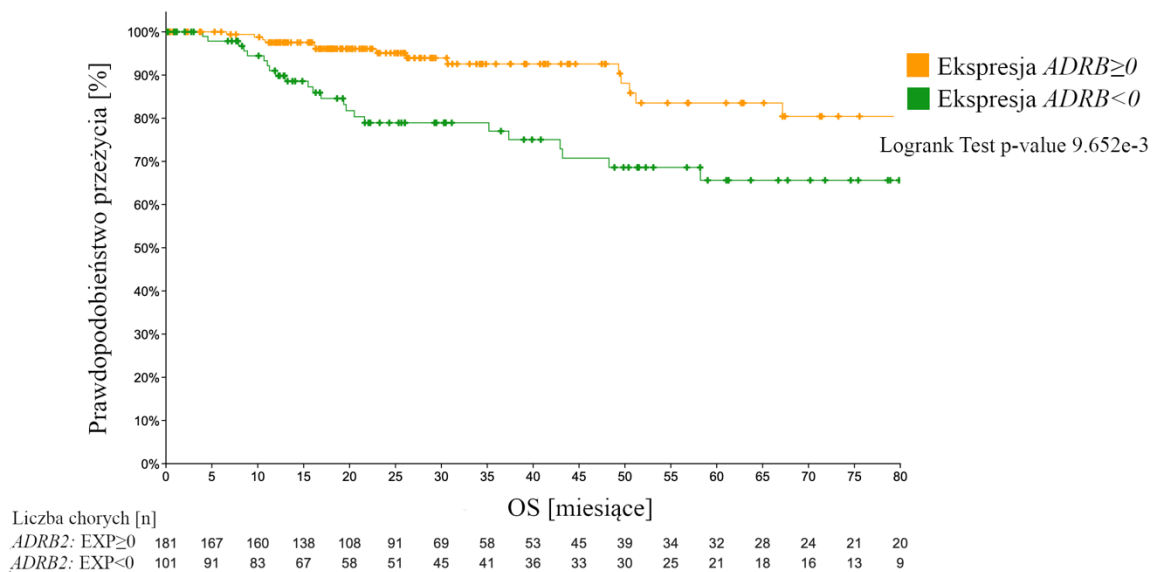


Rycina 7. a) Poziom ekspresji genu *ADRB2* u pacjentów z rakiem brodawkowatym nerki (pRCC) w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego wg 8 edycji klasyfikacji AJCC. **b)** Odsetek pacjentów z pRCC w danym stopniu zaawansowania klinicznego wg 8 edycji klasyfikacji AJCC w zależności od poziomu ekspresji genu *ADRB2*.

Ponadto pacjenci z rozpoznaniem pRCC z wyższym poziomem ekspresji genu *ADRB2* w tkance guza osiągnęli dłuższy PFS (Rycina 8.). 5-letni odsetek PFS wynosił 63,22% w grupie pacjentów z niską ekspresją *ADRB2* i 80,71% w grupie chorych z wysoką ekspresją tego genu (HR=2,452 (95% CI: 1,395-4,310); $p<0,05$). Istotne statystycznie różnice wykazano również w odniesieniu do OS (Rycina 9.). 5-letni odsetek OS wynosił 65,62% w grupie niskiej ekspresji *ADRB2* i 83,52% w grupie wysokiej ekspresji tego genu (HR=2,207; 95% CI: 1,168-4,164; $p<0,05$).



Rycina 8. Czas przeżycia wolny od progresji (PFS) u pacjentów z rakiem brodawkowatym nerki (pRCC) z wyższym poziomem ekspresji genu *ADRB2* ($ADRB2: EXP \geq 0$) i niższym ($ADRB2: EXP < 0$).



Rycina 9. Czas przeżycia całkowitego (OS) u pacjentów z rakiem brodawkowatym nerki (pRCC) z wyższym poziomem ekspresji genu *ADRB2* ($ADRB2: EXP \geq 0$) i niższym ($ADRB2: EXP < 0$)

4.2 Wyniki analizy qRT-PCR ekspresji genu *ADRB2* w liniach komórkowych raka nerkowokomórkowego

Jednoczynnikowa analiza ANOVA wykazała istotne statystycznie wyższą ekspresję genu *ADRB2* w przypadku linii komórkowych wywodzących się z pRCC (Caki-2 i ACHN) względem ccRCC (Caki-1, 786-O) (Tabela 7.). Pomędzy poszczególnymi liniami w obrębie jednego podtypu histologicznego nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w ekspresji genu *ADRB2*.

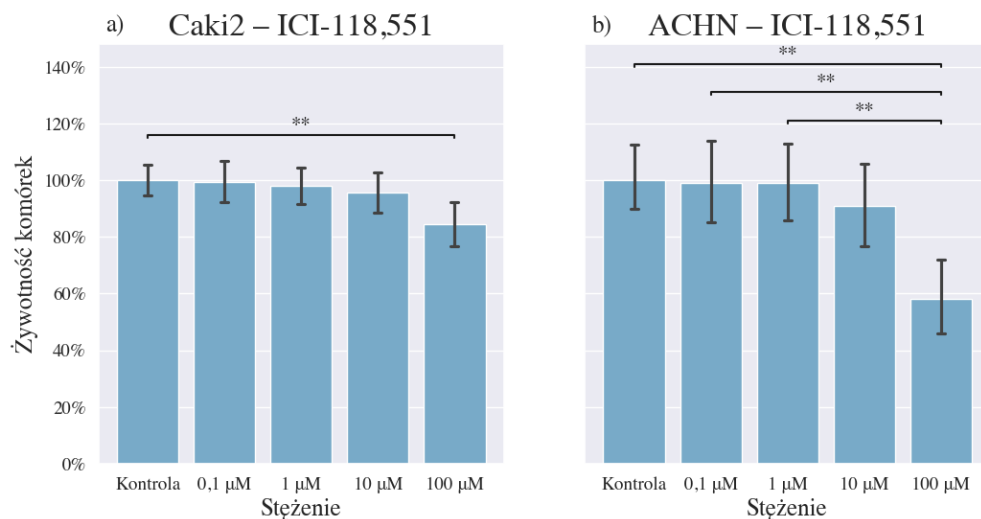
Tabela 7. Ocena ekspresji genu *ADRB2* w liniach komórkowych raka nerkowokomórkowego jasnokomórkowego (ccRCC) i brodawkowatego (pRCC).

Linia komórkowa	Typ histologiczny	ΔCt (średnia $\pm$ SD)*	p-value (t-test)	p-value (One-way ANOVA)
Caki-1	ccRCC	8,31 $\pm$ 0,14	p>0,05	p<0,001
786-O		6,67 $\pm$ 0,42		
Caki-2	pRCC	1,72 $\pm$ 0,10	p>0,05	
ACHN		1,37 $\pm$ 0,14		

* – ekspresja *ADRB2* oceniana względem genu *RPL13* (gen referencyjny). SD – odchylenie standardowe.

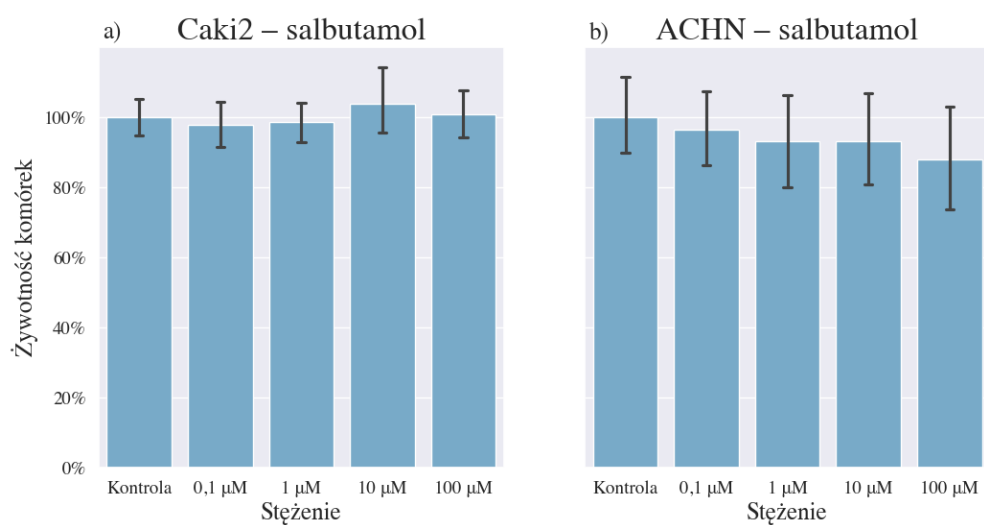
4.3 Wpływ β_2 -agonisty i antagonisty na żywotność komórek raka nerkowokomórkowego

W przeprowadzonej analizie wykazano statystycznie istotny ($p<0,05$), zależny od dawki wpływ ICI-118,551 na zmniejszenie żywotności komórek linii ACHN (Rycina 10.). W komórkach linii Caki-2 ICI-118,551 wykazał istotny statystycznie wpływ na zmniejszenie żywotności jedynie w najwyższym stężeniu. Salbutamol nie wykazał istotnego statystycznie wpływu na żywotność powyższych linii komórkowych (Rycina 11.). Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki i największy wpływ na żywotność komórek substancji podanych w stężeniach 10 μ M i 100 μ M, do kolejnego etapu doświadczeń wybrano te stężenia leków.



Rycina 10. Wpływ β_2 -AR antagonisty (ICI-118,551) w stężeniach $1\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$ na żywotność komórek linii pRCC: **a)** Caki-2 i **b)** ACHN.

* - $0.05 < p < 0.01$; ** - $0.01 < p < 0.001$; *** - $0.001 > p$.

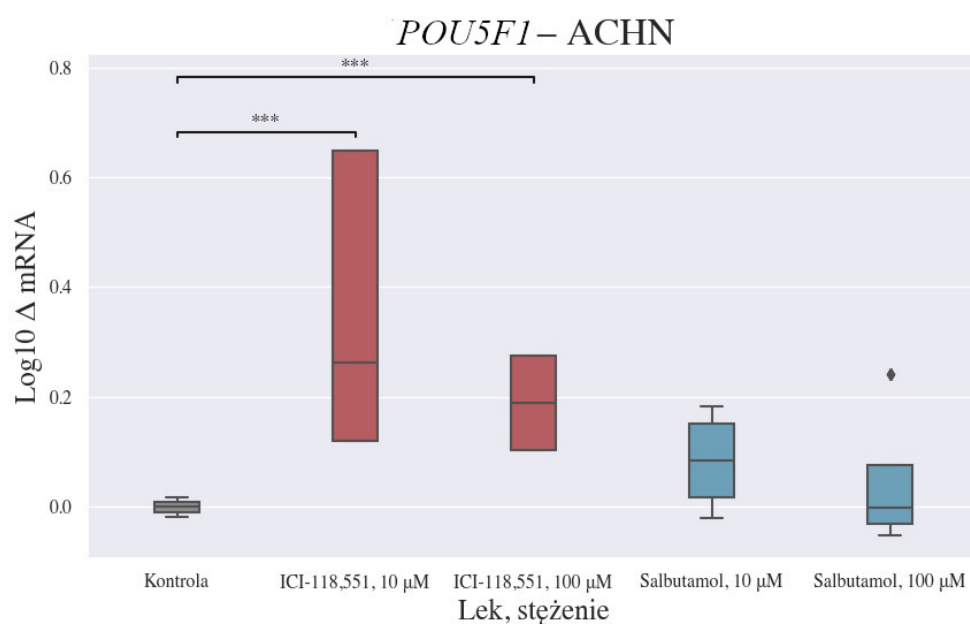


Rycina 11. Wpływ β_2 -AR agonisty (salbutamol) w stężeniach $1\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$ na żywotność komórek linii pRCC: **a)** Caki-2 i **b)** ACHN.

* - $0.05 < p < 0.01$; ** - $0.01 < p < 0.001$; *** - $0.001 > p$.

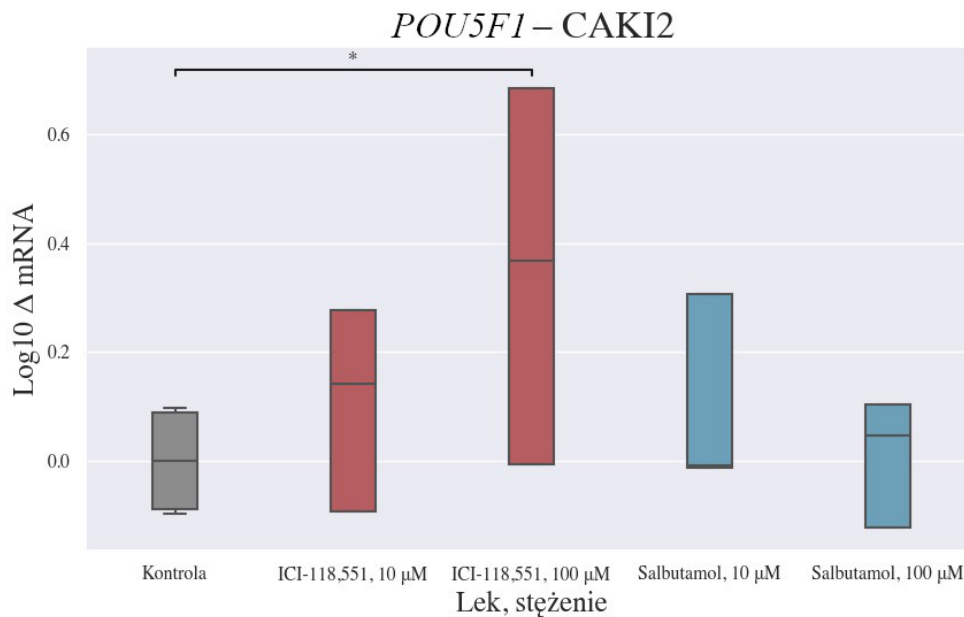
4.4 Wpływ β_2 -agonisty i antagonisty na ekspresję genów związanych z fenotypem macierzystych komórek nowotworowych raka brodawkowatego nerki

W komórkach poddanych działaniu ICI-118,551 zaobserwowano zwiększoną ekspresję genu *POU5F1* (wynik istotnie statystyczny w komórkach linii ACHN dla obu stężeń substancji, w komórkach linii Caki-2 wynik istotny statystycznie dla stężenia 100 μ M) (Rycina 12. i 13.). Salbutamol nie wykazał istotnie statystycznego wpływu na ekspresję genu *POU5F1* w obu badanych liniach komórkowych (Rycina 12. i 13.).



Rycina 12. Wpływ β_2 -AR antagonisty (ICI-118,551) i antagonisty (salbutamolu) w stężeniach 10 μ M, 100 μ M na ekspresję genu *POU5F1* w linii komórkowej ACHN.

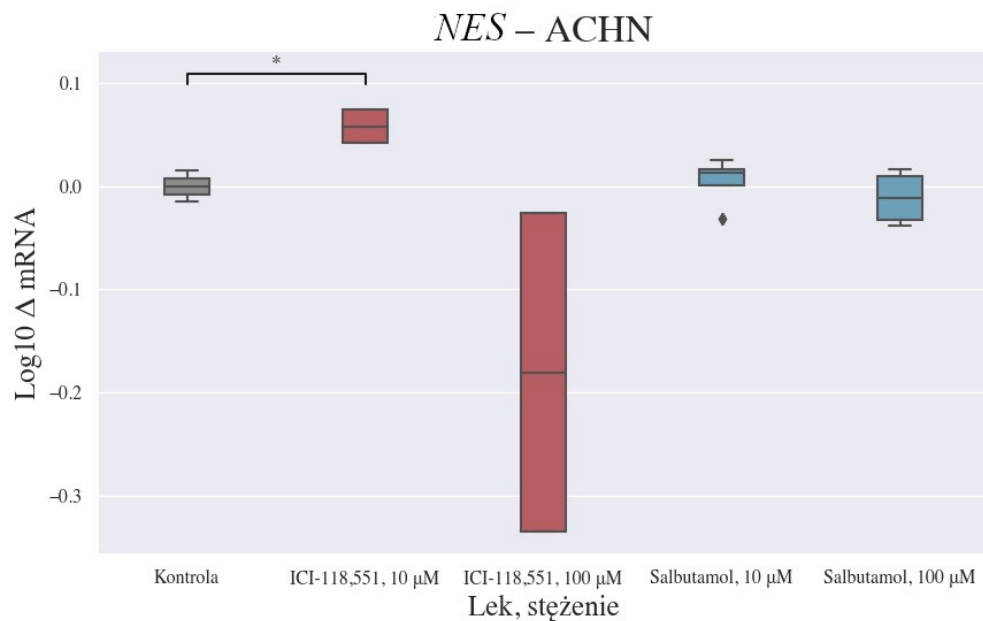
* - 0,05<p<0.01; ** - 0,01<p<0.001; *** - 0,001>p



Rycina 13. Wpływ β_2 -AR antagonisty (ICI-118,551) i antagonisty (salbutamolu) w stężeniach 10 μ M, 100 μ M na ekspresję genu *POU5F1* w linii komórkowej Caki-2.

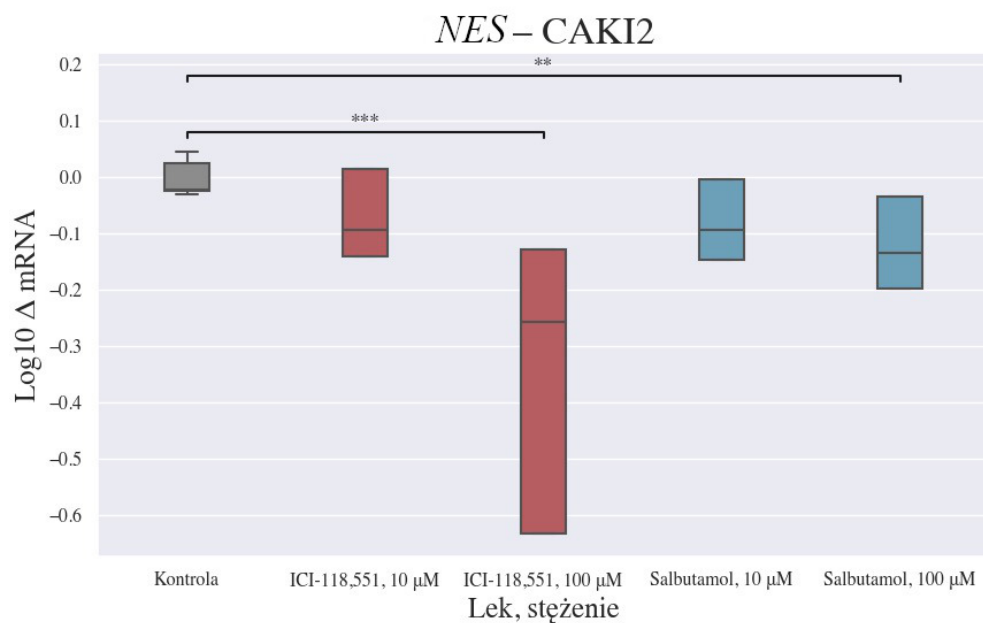
* - 0,05 < p < 0,01; ** - 0,01 < p < 0,001; *** - 0,001 > p

W liniach komórkowych poddanych działaniu ICI-118,551 zaobserwowano zmniejszoną ekspresję genu *NES* w obu liniach komórkowych (istotność statystyczną wykazano w linii Caki-2, w linii ACHN nie osiągnięto poziomu istotności statystycznej). Podobnie jak w przypadku genu *POU5F1*, salbutamol w zdecydowanej większości badanych stężeń nie wykazywał istotnego statystycznie wpływu na ekspresję genu *NES* (Rycina 14. i 15.).



Rycina 14. Wpływ β_2 -AR antagonisty (ICI-118,551) i antagonisty (salbutamolu) w stężeniach 10 μ M, 100 μ M na ekspresję genu *NES* w linii komórkowej ACHN.

* - 0,05<p<0,01; ** - 0,01<p<0,001; *** - 0,001>p.

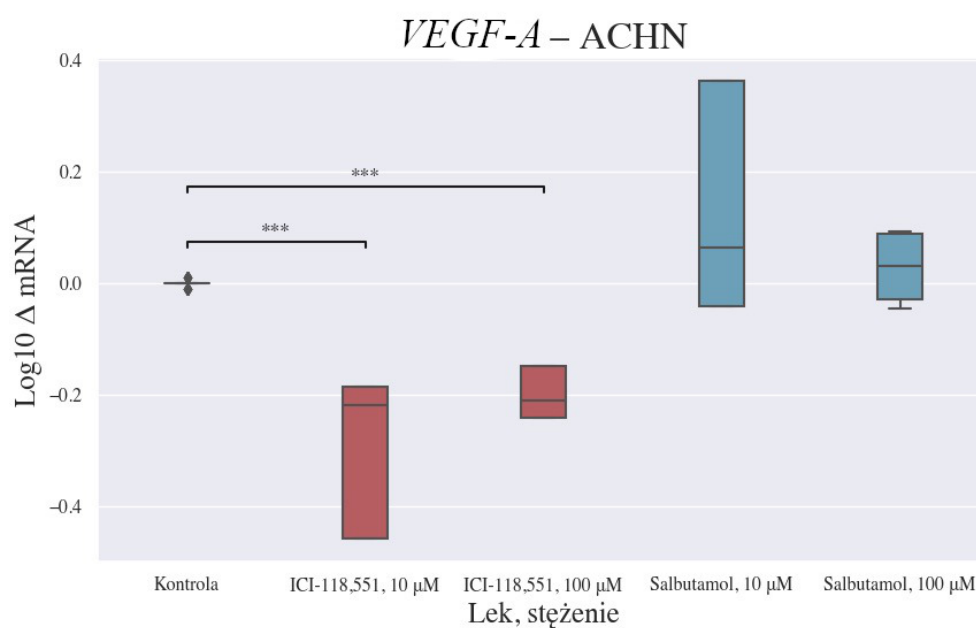


Rycina 15. Wpływ β_2 -AR antagonisty (ICI-118,551) i antagonisty (salbutamolu) w stężeniach 10 μ M, 100 μ M na ekspresję genu *NES* w linii komórkowej Caki-2.

* - 0,05<p<0,01; ** - 0,01<p<0,001; *** - 0,001>p.

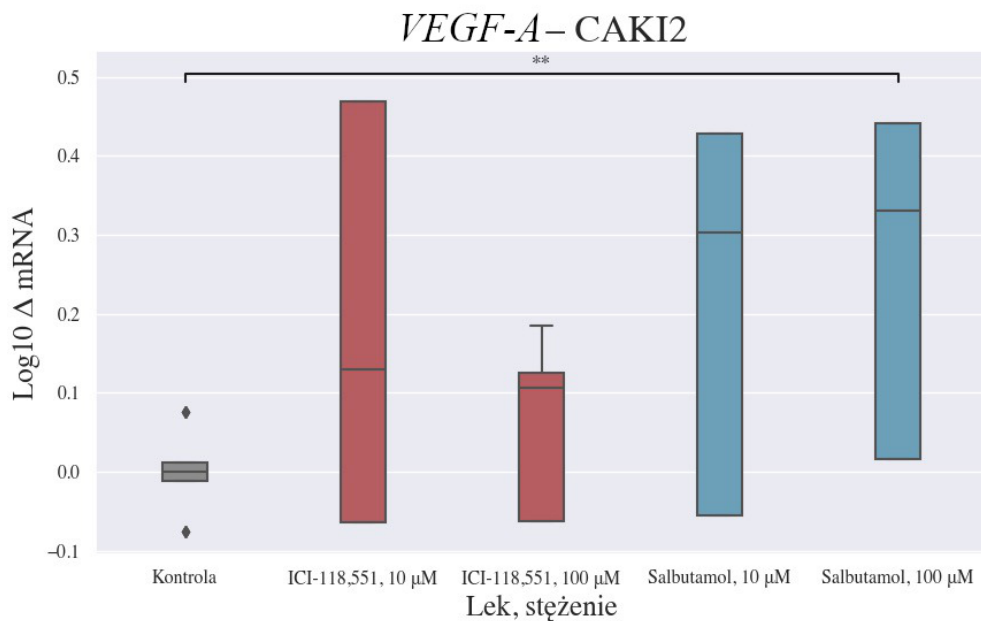
4.5 Wpływ β_2 -agonisty i antagonisty na ekspresję genów związanych z angiogenezą nowotworowych raka brodawkowego nerki

W komórkach linii ACHN wywodzących się z przerzutowego pRCC wykazano hamujący wpływ ICI-118,551 na ekspresję genu *VEGF-A*, podczas gdy w komórkach linii Caki-2 pochodzących z guza pierwotnego pRCC nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian w ekspresji tego genu wywołanych podaniem β_2 -antagonisty. Dla wyższego stężenia salbutamolu zaobserwowano efekt przeciwny: zwiększenie ekspresji genu *VEGF-A* (Rycina 16. i 17.).



Rycina 16. Wpływ β_2 -AR antagonisty (ICI-118,551) i antagonisty (salbutamolu) w stężeniach 10 μ M, 100 μ M na ekspresję genu *VEGF-A* w linii komórkowej ACHN.

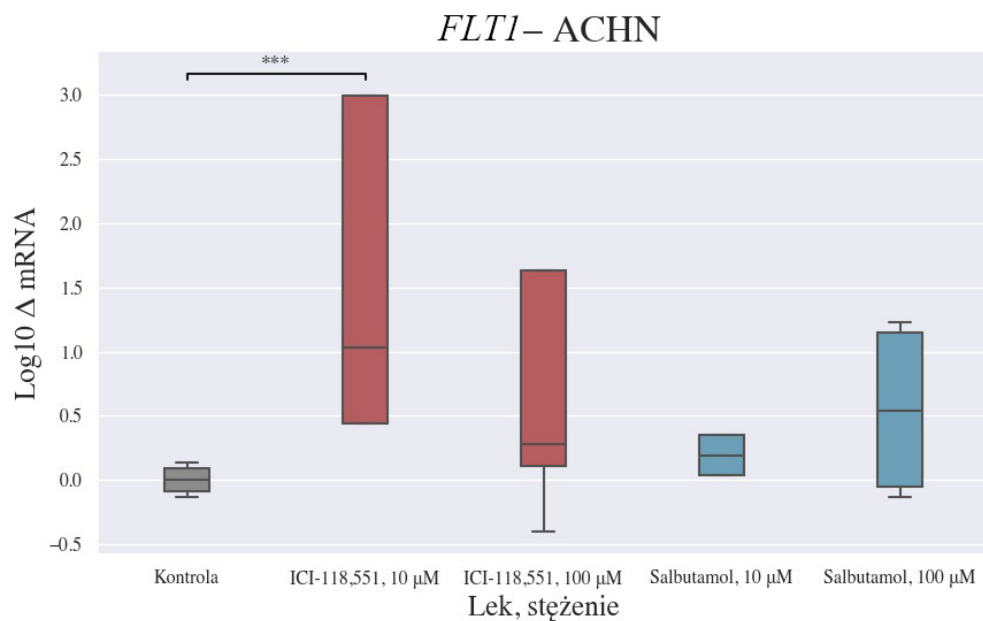
* - 0,05 < p < 0,01; ** - 0,01 < p < 0,001; *** - 0,001 > p.



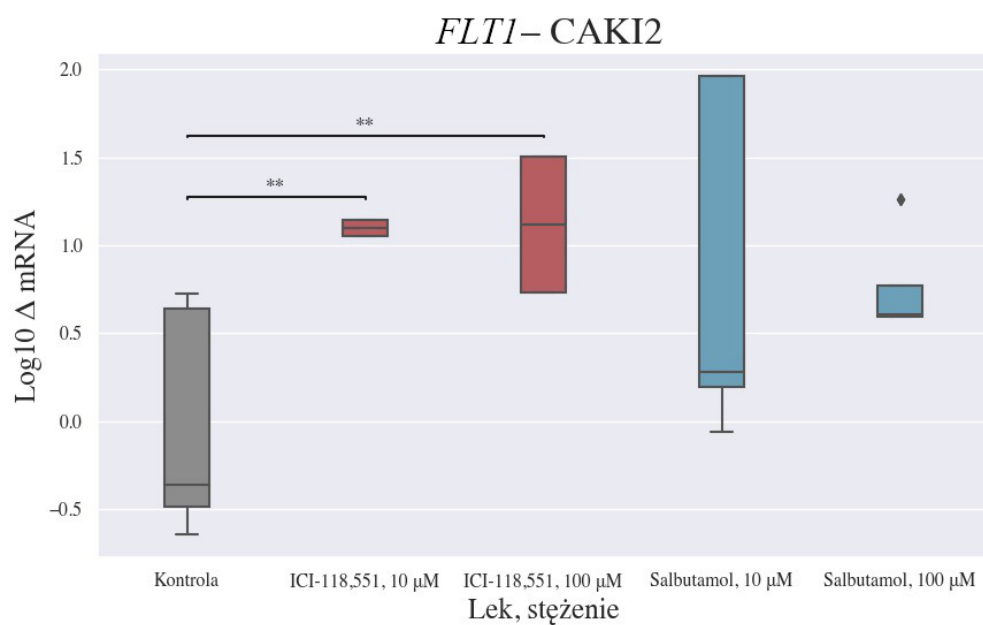
Rycina 17. Wpływ β_2 -AR antagonisty (ICI-118,551) i antagonisty (salbutamolu) w stężeniach 10 μ M, 100 μ M na ekspresję genu *VEGF-A* w linii komórkowej Caki-2.

* - 0,05 < p < 0,01; ** - 0,01 < p < 0,001; *** - 0,001 > p.

W doświadczeniach wykazano istotnie statystyczny wpływ ICI-118,551 podawanego w stężeniu 10 μ M na wzrost ekspresji genu *FLT1* w obu liniach komórkowych (p < 0,05). Stężenie 100 μ M przełożyło się na istotnie zwiększoną ekspresję tego genu w linii Caki-2 (p < 0,05), podczas gdy w komórkach linii ACHN nie wykazano istotności statystycznej. Salbutamol ponownie nie wykazał istotnego statystycznie wpływu na ekspresję genu *FLT-1* (Rycina 18. i 19.)



Rycina 18. Wpływ β_2 -AR antagonisty (ICI-118,551) i antagonisty (salbutamolu) w stężeniach 10 μ M, 100 μ M na ekspresję genu *FLT-1* w linii komórkowej ACHN.
 * - 0,05<p<0.01; ** - 0,01<p<0,001; *** - 0,001>p.



Rycina 19. Wpływ β_2 -AR antagonisty (ICI-118,551) i antagonisty (salbutamolu) w stężeniach 10 μ M, 100 μ M na ekspresję genu *FLT-1* w linii komórkowej Caki-2.
 * - 0,05<p<0.01; ** - 0,01<p<0,001; *** - 0,001>p.

5 Dyskusja

W mojej pracy doktorskiej podjęłam próbę przeanalizowania roli β_2 -ARs w patofizjologii pRCC na kilku płaszczyznach: począwszy od analizy bioinformatycznej bazy danych, poprzez analizę ekspresji genu *ADRB2* w najczęściej wykorzystywanych liniach komórkowych RCC, po badania na liniach komórkowych pRCC, oceniające wpływ oddziaływania β_2 -ARs na żywotność komórek oraz ekspresję genów związanych z procesami kluczowymi dla rozwoju pRCC – angiogenezą i fenotyp CSCs.

5.1 Znaczenie ekspresji *ADRB2* u pacjentów z rakiem nerkowokomórkowym

Przeprowadzona przeze mnie w niniejszej pracy analiza porównawcza ekspresji genu *ADRB2* na podstawie danych z TCGA wykazała, że pRCC jest nowotworem o jednym z najwyższych poziomów ekspresji tego genu. Wśród dwóch najczęstszych podtypów histologicznych RCC, pRCC wykazywał wyższy poziom ekspresji genu *ADRB2*, jednak bez istotnej statystycznie różnicy. Na stan wiedzy z 2024 roku brak jest danych literaturowych na temat różnic w poziomie ekspresji tego genu wśród podtypów RCC, do których można by odnieść uzyskane w powyższej pracy wyniki. Następnie ocenie poddałam dane dotyczące ekspresji genu *ADRB2* pochodzące z próbek 218 pacjentów z pRCC. W przeprowadzonej analizie bioinformatycznej wykazałam, że niski poziom ekspresji genu *ADRB2* w tkance guza pRCC jest negatywnym czynnikiem prognostycznym. Wiąże się on z większym prawdopodobieństwem zajęcia węzłów chłonnych i wystąpienia przerzutów odległych, przekładając się na wyższy stopień zaawansowania klinicznego choroby. U pacjentów z niską ekspresją *ADRB2* 5-letni wskaźnik PFS i OS był niższy odpowiednio około 17,49 i 17,9 punktów procentowych w porównaniu do grupy z wysoką ekspresją tego genu. Przedstawione w mojej pracy doktorskiej wyniki są zbieżne z wnioskami jedynej dotychczas przeprowadzonej w RCC analizy z 2019 roku(123). W pracy tej wykazano, że poziom ekspresji *ADRB2* jest odwrotnie proporcjonalny do długości PFS, OS. Należy jednak zaznaczyć, że do zacytowanej pracy włączono jedynie dane chorych z rozpoznaniem ccRCC, a nie pRCC. Brak danych literaturowych odnośnie pRCC wynika prawdopodobnie z dużo mniejszej zachorowalności na ten podtyp histologiczny RCC.

5.2 Ekspresja genu *ADRB2* w liniach komórkowych odzwierciedla ekspresję u pacjentów z rozpoznaniem raka nerkowokomórkowego

Podczas omawiania wyników badań przeprowadzonych na liniach komórkowych, słowa komentarza wymaga przydzielenie poszczególnych linii komórkowych do podtypów histologicznych RCC. Większość linii komórkowych wykorzystywanych współcześnie do badań nad RCC została wyprowadzona w latach 70. i 80., kiedy to klasyfikacja patomorfologiczna RCC nie uwzględniała nawet najczęstszych podtypów tego nowotworu takich jak ccRCC, pRCC czy chRCC, a wiedza na temat charakterystyki molekularnej RCC była bardzo ograniczona. Linie komórkowe RCC początkowo były wykorzystywane do badań bez uwzględnienia podtypu histologicznego RCC, a następnie utożsamiane zazwyczaj z ccRCC jako najczęstszym podtypem histologicznym tego nowotworu. Dopiero późniejsze badania z użyciem immunohistochemii, sekwencjonowania DNA i modeli ksenograftów umożliwiły przyporządkowanie poszczególnych linii komórkowych do obowiązującej współcześnie klasyfikacji histologicznej. Linia ACHN, wyprowadzona w 1979 roku z nacieku opłucnowego RCC o nieokreślonej wówczas histologii, została zaklasyfikowana na podstawie późniejszych analiz jako linia o fenotypie brodawkowatym, z uwagi na charakterystyczny dla pRCC polimorfizm w genie *c-MET* i brak mutacji w genie *VHL*, wstępujący zazwyczaj w ccRCC(133). Linia Caki-2 wyprowadzona w 1971 roku, była pierwotnie uznawana za pochodzącą z ccRCC, jednak morfologia komórek tej linii zawierająca widoczne mikroskopowo struktury brodawkowate, wysoka ekspresja MET skłaniają współcześnie do uznania tej linii za wywodzącą się z pRCC(146). Linie 786-O i Caki-1 posiadają cechy charakterystyczne dla ccRCC takie jak tworzenie guzów składających się z komórek o jasnej cytoplazmie, wysoka ekspresja VEGF, zaburzenia w ścieżkach sygnałowych związanych z HIF oraz obecna w przypadku komórek 786-O mutacja w genie *VHL* (133). Przyjmując przedstawioną wyżej klasyfikację, do linii o fenotypie ccRCC zaliczono Caki-1 i 786-O, natomiast za linie wywodzące się z pRCC uznano Caki-2 i ACHN. Omówione różnice dotyczące pochodzenia użytych linii komórkowych mogą przekładać się na ich odmienny profil molekularny i odpowiadać za obserwowane w badaniach żywotności i analizach ekspresji genów różnice.

Pierwszym etapem badań przeprowadzonych na liniach komórkowych w ramach mojej pracy doktorskiej była ocena poziomu ekspresji genu *ADRB2* w 4 liniach komórkowych RCC: ACHN, Caki-2, Caki-1 i 786-O. Uwzględniając omówiony wyżej podział linii

komórkowych, wyniki przeprowadzonej przeze mnie analizy były spójne z tymi uzyskanymi w analizie bioinformatycznej TCGA. W obu częściach pracy wykazałam wyższą ekspresję genu *ADRB2* w przypadku komórek linii pRCC (Caki-2, ACHN) niż ccRCC (Caki-1, 786-O). Brak jest natomiast danych w literaturze analizujących różnice w ekspresji *ADRB2* w zależności od podtypu histologicznego RCC.

5.3 Wpływ β_2 -agonisty i antagonisty na żywotność komórek raka nerkowokomórkowego

Następnie badane linie komórkowe o fenotypie pRCC (Caki-2, ACHN) poddano działaniu leków wpływających na przekaźnictwo β_2 -adrenergiczne. Salbutamol działający agonistycznie na β_2 -ARs nie wykazał wpływu na żywotność badanych linii komórkowych. Mimo, że salbutamol nie jest substancją wydzielaną przez oś podwzgórze-przysadka-nadnercza, uważa się, że może być on wykorzystywany do symulacji efektów działania naturalnie uwalnianych katecholamin(96). Można przypuszczać więc, że brak efektu tego leku na żywotność linii komórkowych pRCC może wynikać ze zbliżonego do fizjologicznego pobudzenia tych receptorów, który nie powoduje istotnych zmian w żywotności komórek. Wpływ na zmniejszenie żywotności komórek obu linii wykazano natomiast w przypadku β_2 -antagonisty ICI-118,551. Efekt ten był zależny od dawki i statystycznie istotny. Podobne wyniki uzyskano w opublikowanym w 2022 roku badaniu przeprowadzonym na liniach komórkowych uzyskanych z guzów pacjentów chorych na związanego z zespołem von Hippel Lindau naczyniaka krwionośnego zarodkowego ośrodkowego układu nerwowego, liniach komórkowych guzów pochodzących od pacjentów z RCC z potwierdzoną mutacją w genie *VHL* oraz komórkach o fenotypie ccRCC linii 786-O bez mutacji w genie *VHL*(147). W badaniu *in vivo* w modelu mysich ksenograftów stworzonych z komórek linii 786-O podanie ICI-118,551 powodowało spowolnienie wzrostu guzów nowotworowych o 20% i zmniejszenie ich masy o 24% w porównaniu do grupy kontrolnej(124). Brak jest niestety danych literaturowych na temat wpływu ICI-118,551 na komórki wywodzące się z pRCC.

Wyjaśnić należy też zaobserwowany w przeprowadzonych doświadczeniach wpływ β_2 -antagonisty na zmniejszoną żywotność komórek nowotworowych. Jak wspomniałam we wstępie pracy, substancje z grupy β -blokerów nie działają wyłącznie jako antagoniści dla GPCR, ale mogą też niezależnie wywierać modulujący wpływ na inne szlaki przekaźnictwa wewnątrzkomórkowego i w tym mechanizmie zachowywać się jak częściowi agoniści,

odwrotni agoniści lub czyści antagoniści, co wpływa na złożoność ich działania. Badany β -bloker, ICI-118,551 opisywany jest w literaturze jako wysoce specyficzny β_2 -antagonista/odwrotny agonista(148). Przedstawiony w mojej pracy wpływ ICI-118,551, powodujący zmniejszenie żywotności komórek linii pRCC, sugeruje działanie tego leku jako odwrotnego agonisty, co opisane zostało wcześniej w innych modelach eksperymentalnych dla tego leku(148). Udokumentowany w literaturze wpływ ICI-118,551 na zmniejszenie stężeń wewnątrzkomórkowego cAMP(148), może przekładać się na zmniejszenie proliferacji komórkowej i w tym mechanizmie powodować obserwowany w przeprowadzonych doświadczeniach efekt przeciwnowotworowy.

5.4 Wpływ β_2 -agonisty i antagonisty na ekspresję genów związanych z fenotypem macierzystych komórek nowotworowych raka brodawkowatego nerki

W kolejnym etapie doświadczeń przeanalizowałam wpływ salbutamolu i ICI-118,551 na ekspresję genów związanych z fenotypem macierzystych komórek nowotworowych i angiogenezy. Pierwszy z badanych genów, *POU5F1* (występujący również w literaturze pod nazwą *OCT-4*) koduje czynnik transkrypcyjny zawierający homeodomenę POU, który odgrywa kluczową rolę w zdolności do samoodnawiania i proliferacji niezróżnicowanych embrionalnych komórek macierzystych. Czynnik transkrypcyjny POU5F1 jest też zaangażowany w regulację proliferacji, migracji i inwazji komórek nowotworowych. Jest on odpowiedzialny za utrzymanie macierzystego fenotypu CSCs. Zwiększona ekspresja *POU5F1* wyzwała EMT, w wyniku którego komórki nowotworowe zyskują cechy komórek mezenchymach o zwiększonym potencjale migracyjnym i inwazyjnym. W przypadku wielu nowotworów – w tym raka nerki – zwiększona ekspresja *POU5F1* jest negatywnym czynnikiem prognostycznym, wiążącym się z gorszym rokowaniem, większym wyjściowym zaawansowaniem choroby i krótszym czasem przeżycia całkowitego(130,149). Co istotne, ekspresja *POU5F1* prowadząca do zwiększonej produkcji czynnika transkrypcyjnego POU5F1, nie jest obserwowana jednakowo we wszystkich komórkach RCC. W związku z wewnątrzguzową heterogennością komórek RCC oraz różnorodnością klonów komórek nowotworowych, zwiększoną aktywność POU5F1 obserwuje się jedynie w subpopulacji komórek przejawiających fenotyp CSCs(130). Zjawisko to może tłumaczyć uzyskane wyniki, w których ICI-118,551, wpływając na zmniejszenie żywotności komórek pRCC, jednocześnie zwiększa ekspresję

genu będącego markerem macierzystego fenotypu komórek nowotworowych. Można przypuszczać, że poddanie komórek pRCC działaniu leku wpływającego na zmniejszenie ich żywotności, prowadzi do selekcji subpopulacji komórek opornych na jego działanie dzięki fenotypowi CSCs. Markerem tych komórek jest między innymi *POU5F1*. Należy zaznaczyć też, że ICI-118,551, będący odwrotnym agonistą β_2 -ARs, działając poprzez szlaki przekazywania wewnątrzkomórkowego, wpływa na żywotność m.in. poprzez zmniejszenie stężeń wewnątrzkomórkowego cAMP. Nie przejawia on jednak *stricte* cytostatycznego działania, podobnego jak ten obserwowany w przypadku leków stosowanych w leczeniu przeciwnowotworowym, które oddziałują bezpośrednio na strukturę DNA czy enzymy uczestniczące w podziałach komórkowych. Ten mniej wyrażony i bardziej subtelny wpływ na komórki nowotworowe może również przyczyniać się do przeżycia komórek o fenotypie CSCs, w których dochodzi do zwiększonej ekspresji *POU5F1*.

Kolejny z badanych genów *NES* koduje białko nestynę, będącą w białkiem cytoszkieletu zaliczanym to rodziny białek filamentów pośrednich typu VI, które ulega ekspresji z komórkach macierzystych układu nerwowego(150). Nestyna jest też uznanym markerem CSCs, związanym z agresywnym wzrostem, przerzutowaniem i złym rokowaniem nowotworów(76). W przeciwieństwie do *POU5F1* nestyna ma jednak bardziej wielokierunkowe działanie. Uczestniczy ona także w neoangiogenezie, czyli procesie tworzenia naczyń krwionośnych związanych z guzem(151,152) . Zwiększona ekspresja nestyny została wykryta w naczyniaku krwionośnym zarodkowego ośrodkowego układu nerwowego w przebiegu zespołu von Hippel Lindau(153). W badaniu przeprowadzonym u pacjentów z guzami ccRCC wykazano, że ekspresja nestyny w komórkach śródbłonna naczyń nowotworu koreluje z wyższym stopniem zaawansowania nowotworu(152). Zwiększona ekspresja nestyny w komórkach ccRCC okazała się negatywnym czynnikiem prognostycznym wiążącym się ze wczesnym nawrotem choroby u pacjentów poddanych leczeniu operacyjnemu z guzami ccRCC w stopniu zaawansowania pT1a(154). Powyższe dane wskazują, że nestyna oprócz uznanej roli jako markera CSCs, pełni też inne funkcje w patofizjologii nowotworu, co sprawia, że nie może być traktowana wyłącznie jako wskaźnik fenotypu macierzystego. Plejotropowe działanie nestyny może tłumaczyć uzyskane w mojej pracy wyniki. W przeciwieństwie do zwiększonej ekspresji *POU5F1* w komórkach poddanych działaniu ICI-118,551, ekspresja *NES* była zmniejszona w komórkach obu linii pRCC. Obserwowany przeciwny wpływ β_2 -antagonisty na

ekspresję genów markerowych CSCs prawdopodobnie wynika z istotnej roli *NES* w neoangiogenezie, którego nie przejawia *POU5F1*.

5.5 Wpływ β_2 -agonisty i antagonisty na ekspresję genów związanych z angiogenezą nowotworowych raka brodawkowego nerki

Wpływ przekąźnictwa β -adrenergicznego na angiogenezę został zbadany w wielu nowotworach i omówiony przekrojowo we wstępie pracy. Postuluje się, że stymulacja przekąźnictwa wewnątrzkomórkowego przez β_2 -ARs przyczynia się do wzmożonej angiogenezy przez zwiększenie ekspresji m.in. *VEGF*. Uzyskane w mojej pracy doktorskiej wyniki potwierdzają podobny efekt w przypadku linii komórkowych pRCC. Interpretacja powyższych danych wymaga jednak w pierwszej kolejności zrozumienia działania szlaku przekąźnictwa VEGF/Flt1. Białka z rodziny VEGF obejmują kilku przedstawicieli, z których najczęściej badanym i najbardziej zaangażowanym w angiogenezę jest VEGF-A, dlatego też w literaturze często spotykaną praktyką jest stosowanie wymiennie terminu VEGF i VEGF-A. Inne białka z rodziny VEGF takie jak VEGF-B, VEGF-C i VEGF-D, PlGF zostały odkryte później i odgrywają rolę w rozwoju embrionalnym, tworzeniu naczyń limfatycznych oraz gojeniu tkanek. VEGF-A wywiera swoje działanie poprzez wiązanie białkami receptorowymi o funkcji receptorów kinazy tyrozynowej: VEGFR1 (kodowane przez gen *FLT-1*) i VEGFR2 (kodowane przez gen *FLK-1*, nazywany też *KDR*). VEGFR2 jest uznawany za receptor odpowiedzialny za aktywację sygnalizacji wewnątrzkomórkowej prowadzącej do pobudzenia angiogenezy. Rola VEGFR1 jest bardziej złożona. Uważa się, że jest to receptor o roli regulatorowej wobec VEGFR2, który nie wywiera bezpośrednio wpływu na procesy związane z angiogenezą. VEGFR1 służy natomiast jako „receptor-pułapka”, który wiąże VEGF-A ograniczając jego wpływ na VEGFR2 i działając jako naturalny antagonist.

Poddanie komórek linii ACHN, wywodzących się z przerzutowego pRCC działaniu selektywnego β_2 -antagonisty, spowodowało zmniejszoną ekspresję genu *VEGF-A*. Zaobserwowano również przeciwny, tzn. powodujący zwiększenie ekspresji *VEGF-A* wpływ salbutamolu w dawce 100 μ M na komórki linii ACHN. Wyniki uzyskane w poniższej pracy pokrywają się z doświadczeniami wykorzystującymi β_2 -agonistów i antagonistów w badaniach na liniach komórkowych raka piersi(155), jajnika(156), przełyku(157) czy żołądka(158). W przypadku komórek wywodzących się z guza pierwotnego pRCC (Caki-2) nie zaobserwowano istotnie statystycznego wpływu ICI-

118,551 i salbutamolu na poziom ekspresji *VEGF-A*. Podobne rozbieżności pomiędzy liniami komórkowymi zaobserwowano m.in. w raku piersi, gdzie pro-angiogeny efekt stymulacji β_2 -ARs był uzależniony od poziomu ekspresji genu *ADRB2* i gęstości β_2 -ARs w komórkach poszczególnych linii. W badaniach na RCC potwierdzono również, że wyższy poziom ekspresji *VEGF* wykrywany jest w komórkach pochodzących z guzów przerzutowych w porównaniu do tych pochodzących z guza pierwotnego(159). Poziom ekspresji *VEGF* koreluje też ze zwiększoną częstością zajęcia węzłów chłonnych i przerzutów odległych w RCC(160).

W pracy wykazałam również, że zahamowanie β_2 -ARs przez zastosowanie selektywnego antagonisty ICI-118,551 przełożyło się nie tylko na spadek ekspresji *VEGF-A*, ale również wzrost ekspresji genu kodującego białko receptorowe VEGFR1, *FLT*. Zależność między obniżoną ekspresją *VEGF-A* a zwiększoną ekspresją *VEGFR1* wynika z mechanizmów kompensacyjnych i wspomnianej wcześniej roli VEGFR1 jako „receptora-pułapki”. Spadek poziomu liganda jakim jest VEGF może w wyniku pętli sprzężenia ujemnego powodować wzrost ekspresji genu dla regulatorowego białka receptorowego, kontrolującego aktywność VEGFR2. Podobną zależność w szlaku przekazywania VEGFA/VEGFR1 zaobserwowano u pacjentów poddawanych terapiom antyangiogeny w innych nowotworach(161). U pacjentek z rakiem piersi zaobserwowano odwrotną zależność pomiędzy poziomem wewnątrzguzowego VEGF a rozpuszczalną formą receptora VEGFR1(162). Całokształt uzyskanych wyników może wskazywać na udział β_2 -ARs w angiogenezie i możliwe jej zahamowanie poprzez stosowanie selektywnego β_2 -antagonistę.

6 Wnioski

Część I:

1. Ekspresja genu *ADRB2* jest wyższa w liniach komórkowych wywodzących się z pRCC niż ccRCC.
2. Niski poziom ekspresji genu *ADRB2* korelował z wyższym zaawansowaniem klinicznym pRCC: zajęciem węzłów chłonnych i obecnością przerzutów odległych.
3. Niski poziom ekspresji genu *ADRB2* jest negatywnym czynnikiem prognostycznym u pacjentów z rozpoznaniem pRCC.

Część II:

1. Blokada β_2 -ARs poprzez ekspozycję komórek na selektywnego antagonistę (ICI-118,551) prowadzi do zmniejszenia żywotności komórek pRCC.
2. Blokada β_2 -ARs poprzez podanie antagonisty (ICI-118,551) wywiera złożony wpływ na fenotyp CSCs komórek linii pRCC, mogący potencjalnie prowadzić do selekcji komórek o fenotypie CSCs.
3. Blokada β_2 -ARs poprzez podanie antagonisty (ICI-118,551) może wywierać wpływ na zmniejszoną ekspresję wykładników angiogenezy (tj. spadek ekspresji *VEGF-A* oraz kompensacyjny wzrost ekspresji *VEGFR1*).
4. Wywieranie agonistycznego wpływu na β_2 -ARs poprzez podanie salbutamolu nie wpływa na żywotność komórek i ekspresję genów związanych z angiogenezą i CSCs.

7 Podsumowanie

W pracy doktorskiej wykazano, że β -AR, a w szczególności podtyp 2 tego receptora może ogrywać potencjalną rolę w patofizjologii pRCC. Biorąc pod uwagę powszechne stosowanie leków wpływających na przekąźnictwo β -adrenergiczne, zgłębienie tego tematu może mieć istotne implikacje kliniczne. Mechanizmy wpływu przekąźnictwa β_2 -adrenergicznego na nowotwór są złożone i wymagają dalszych badań przedklinicznych jak i klinicznych w tym zakresie.

8 Ograniczenia pracy

Omawiając przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej wyniki, należy wziąć pod uwagę jej ograniczenia. Ocena ekspresji β -ARs w czterech liniach komórkowych RCC została przeprowadzona metodą Real Time PCR dla genu *ADRB2*. Należy pamiętać, że badany tą metodą poziom mRNA kodującego białko receptorowe β -ARs często nie odzwierciedla rzeczywistej gęstości i liczby receptorów obecnych w komórkach. Informacje o faktycznej liczbie receptorów w danej tkance mogą być zapewnione przez ocenę ekspresji białka, które jednak są znacznie rzadziej spotykane w literaturze niż analizy ilości mRNA. Głównym ograniczeniem zastosowania w tej metody w praktyce jest brak przeciwciał, które wystarczająco selektywnie wiązałyby się z poszczególnymi podtypami receptorów typu β .

Ponadto, należy uwzględnić, że doświadczenia przeprowadzone zostały na liniach komórkowych, co uniemożliwia zbadanie wpływu mikrośrodowiska i wydzielanych endogennie katecholamin na badane receptory. Obserwowana w żywym organizmie stała stymulacja neurohormonalna β_2 -ARs sprawia, że model komórkowy może nie w pełni obrazować faktyczny wpływ badanych substancji na komórki nowotworowe.

Należy zauważyć też, że dawki substancji stosowanych w badaniach *in vitro* zazwyczaj są dużo wyższe niż te, które można uzyskać bezpiecznie w organizmie człowieka. Przykładowo średnie stężenia salbutamolu w osoczu pacjentów leczonych dożylnie salbutamolem z powodu astmy wynosiły około 2 μ M(163), podczas gdy stosowane w doświadczeniach stężenia to 10 i 100 μ M. ICI-118,551 nie ma znanego zastosowania terapeutycznego u ludzi, chociaż był szeroko wykorzystywany w badaniach przedklinicznych z wykorzystaniem modeli mysich.

9 Piśmiennictwo

1. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin.* styczeń 2023;73(1):17–48.
2. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, i in. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* maj 2024;74(3):229–63.
3. Bukavina L, Bensalah K, Bray F, Carlo M, Challacombe B, Karam JA, i in. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma: 2022 Update. *Eur Urol.* listopad 2022;82(5):529–42.
4. Wojciechowska U, Barańska K, Miklewska M, Didkowska JA. Cancer incidence and mortality in Poland in 2020. *Nowotw J Oncol.* 27 czerwiec 2023;73(3):129–45.
5. Carlo MI, Mukherjee S, Mandelker D, Vijai J, Kemel Y, Zhang L, i in. Prevalence of Germline Mutations in Cancer Susceptibility Genes in Patients With Advanced Renal Cell Carcinoma. *JAMA Oncol.* 1 wrzesień 2018;4(9):1228.
6. Haas NB, Nathanson KL. Hereditary Kidney Cancer Syndromes. *Adv Chronic Kidney Dis.* styczeń 2014;21(1):81–90.
7. Zbar B, Tory K, Merino M, Schmidt L, Glenn G, Choyke P, i in. Hereditary Papillary Renal Cell Carcinoma. *J Urol.* marzec 1994;151(3):561–6.
8. Menko FH, Maher ER, Schmidt LS, Middleton LA, Aittomäki K, Tomlinson I, i in. Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer (HLRCC): renal cancer risk, surveillance and treatment. *Fam Cancer.* grudzień 2014;13(4):637–44.
9. Organisation mondiale de la santé, Centre international de recherche sur le cancer, redaktorzy. Urinary and male genital tumours. 5th ed. Lyon: International agency for research on cancer; 2022. (World health organization classification of tumours).
10. Shuch B, Amin A, Armstrong AJ, Eble JN, Ficarra V, Lopez-Beltran A, i in. Understanding Pathologic Variants of Renal Cell Carcinoma: Distilling Therapeutic Opportunities from Biologic Complexity. *Eur Urol.* styczeń 2015;67(1):85–97.
11. Moch H, Amin MB, Berney DM, Compérat EM, Gill AJ, Hartmann A, i in. The 2022 World Health Organization Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol.* listopad

2022;82(5):458–68.

12. Kim M, Joo JW, Lee SJ, Cho YA, Park CK, Cho NH. Comprehensive Immunoprofiles of Renal Cell Carcinoma Subtypes. *Cancers*. 5 marzec 2020;12(3):602.
13. Delahunt B, Eble JN. Papillary renal cell carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 tumors. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. czerwiec 1997;10(6):537–44.
14. Lubensky IA, Schmidt L, Zhuang Z, Weirich G, Pack S, Zambrano N, i in. Hereditary and Sporadic Papillary Renal Carcinomas with c-met Mutations Share a Distinct Morphological Phenotype. *Am J Pathol*. sierpień 1999;155(2):517–26.
15. Haake SM, Weyandt JD, Rathmell WK. Insights into the Genetic Basis of the Renal Cell Carcinomas from The Cancer Genome Atlas. *Mol Cancer Res*. 1 lipiec 2016;14(7):589–98.
16. Pal SK, Ali SM, Yakirevich E, Geynisman DM, Karam JA, Elvin JA, i in. Characterization of Clinical Cases of Advanced Papillary Renal Cell Carcinoma via Comprehensive Genomic Profiling. *Eur Urol*. styczeń 2018;73(1):71–8.
17. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive Molecular Characterization of Papillary Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 14 styczeń 2016;374(2):135–45.
18. Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell Survival Responses to Environmental Stresses Via the Keap1-Nrf2-ARE Pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1 luty 2007;47(1):89–116.
19. Wysocki P, Chłosta P, Chrzan R, Czech A, Gronostaj K, Konopka K, i in. Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w raku nerkowokomórkowym — aktualizacja. *Onkol W Prakt Klin - Eduk*. 21 marzec 2024;10(4):239–75.
20. Choueiri TK, Tomczak P, Park SH, Venugopal B, Ferguson T, Chang YH, i in. Adjuvant Pembrolizumab after Nephrectomy in Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 19 sierpień 2021;385(8):683–94.
21. Steffens S, Janssen M, Roos FC, Becker F, Schumacher S, Seidel C, i in. Incidence and long-term prognosis of papillary compared to clear cell renal cell carcinoma – A multicentre study. *Eur J Cancer*. październik 2012;48(15):2347–52.

22. Pal SK, Tangen C, Thompson IM, Balzer-Haas N, George DJ, Heng DY, i in. A comparison of sunitinib with cabozantinib, crizotinib, and savolitinib for treatment of advanced papillary renal cell carcinoma: a randomised, open-label, phase 2 trial. *The Lancet*. luty 2021;397(10275):695–703.
23. McDermott DF, Lee JL, Ziobro M, Suarez C, Langiewicz P, Matveev VB, i in. Open-Label, Single-Arm, Phase II Study of Pembrolizumab Monotherapy as First-Line Therapy in Patients With Advanced Non–Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J Clin Oncol*. 20 marzec 2021;39(9):1029–39.
24. Vogelzang NJ, Olsen MR, McFarlane JJ, Arrowsmith E, Bauer TM, Jain RK, i in. Safety and Efficacy of Nivolumab in Patients With Advanced Non–Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Results From the Phase IIIb/IV CheckMate 374 Study. *Clin Genitourin Cancer*. grudzień 2020;18(6):461-468.e3.
25. Albiges L, Gurney H, Atduev V, Suarez C, Climent MA, Pook D, i in. Pembrolizumab plus lenvatinib as first-line therapy for advanced non-clear-cell renal cell carcinoma (KEYNOTE-B61): a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. sierpień 2023;24(8):881–91.
26. Lee CH, Voss MH, Carlo MI, Chen YB, Zucker M, Knezevic A, i in. Phase II Trial of Cabozantinib Plus Nivolumab in Patients With Non–Clear-Cell Renal Cell Carcinoma and Genomic Correlates. *J Clin Oncol*. 20 lipiec 2022;40(21):2333–41.
27. Powles T, Albiges L, Bex A, Comperat E, Grünwald V, Kanesvaran R, i in. Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. maj 2024;S0923753424006768.
28. Negrier S, Rioux-Leclercq N, Ferlay C, Gross-Goupil M, Gravis G, Geoffrois L, i in. Axitinib in first-line for patients with metastatic papillary renal cell carcinoma: Results of the multicentre, open-label, single-arm, phase II AXIPAP trial. *Eur J Cancer*. kwiecień 2020;129:107–16.
29. Armstrong AJ, Halabi S, Eisen T, Broderick S, Stadler WM, Jones RJ, i in. Everolimus versus sunitinib for patients with metastatic non-clear cell renal cell carcinoma (ASPEN): a multicentre, open-label, randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol*. marzec 2016;17(3):378–88.
30. Ravaud A, Oudard S, De Fromont M, Chevreau C, Gravis G, Zanetta S, i in. First-line

treatment with sunitinib for type 1 and type 2 locally advanced or metastatic papillary renal cell carcinoma: a phase II study (SUPAP) by the French Genitourinary Group (GETUG). *Ann Oncol.* czerwiec 2015;26(6):1123–8.

31. Hutson TE, Michaelson MD, Kuzel TM, Agarwal N, Molina AM, Hsieh JJ, i in. A Single-arm, Multicenter, Phase 2 Study of Lenvatinib Plus Everolimus in Patients with Advanced Non-Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol.* sierpień 2021;80(2):162–70.
32. Choueiri TK, Vaishampayan U, Rosenberg JE, Logan TF, Harzstark AL, Bukowski RM, i in. Phase II and Biomarker Study of the Dual MET/VEGFR2 Inhibitor Foretinib in Patients With Papillary Renal Cell Carcinoma. *J Clin Oncol.* 10 styczeń 2013;31(2):181–6.
33. Tykodi SS, Gordan LN, Alter RS, Arrowsmith E, Harrison MR, Percent I, i in. Safety and efficacy of nivolumab plus ipilimumab in patients with advanced non-clear cell renal cell carcinoma: results from the phase 3b/4 CheckMate 920 trial. *J Immunother Cancer.* luty 2022;10(2):e003844.
34. Janzen NK, Kim HL, Figlin RA, Belldegrun AS. Surveillance after radical or partial nephrectomy for localized renal cell carcinoma and management of recurrent disease. *Urol Clin North Am.* listopad 2003;30(4):843–52.
35. Huang J, Huang D, Yan J, Chen T, Gao Y, Xu D, i in. Comprehensive subgroup analyses of survival outcomes between clear cell renal cell adenocarcinoma and papillary renal cell adenocarcinoma. *Cancer Med.* grudzień 2020;9(24):9409–18.
36. Riveros C, Ranganathan S, Xu J, Chang C, Kaushik D, Morgan M, i in. Comparative real-world survival outcomes of metastatic papillary and clear cell renal cell carcinoma treated with immunotherapy, targeted therapy, and combination therapy. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* marzec 2023;41(3):150.e1-150.e9.
37. Moreno-Smith M, Lutgendorf SK, Sood AK. Impact of stress on cancer metastasis. *Future Oncol.* grudzień 2010;6(12):1863–81.
38. Chida Y, Hamer M, Wardle J, Steptoe A. Do stress-related psychosocial factors contribute to cancer incidence and survival? *Nat Clin Pract Oncol.* sierpień 2008;5(8):466–75.
39. Tang J, Li Z, Lu L, Cho CH. β -Adrenergic system, a backstage manipulator regulating

tumour progression and drug target in cancer therapy. *Semin Cancer Biol.* grudzień 2013;23(6):533–42.

40. Alhayek S, Preuss CV. Beta 1 Receptors. W: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [cytowane 16 marzec 2025]. Dostępne na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532904/>
41. Boivin V, Jahns R, Gambaryan S, Ness W, Boege F, Lohse MJ. Immunofluorescent imaging of β 1- and β 2-adrenergic receptors in rat kidney. *Kidney Int.* luty 2001;59(2):515–31.
42. Arif E, Nihalani D. Beta2-adrenergic receptor in kidney biology: A current prospective. *Nephrology.* maj 2019;24(5):497–503.
43. Stapleton MP. Sir James Black and propranolol. The role of the basic sciences in the history of cardiovascular pharmacology. *Tex Heart Inst J.* 1997;24(4):336–42.
44. Hales CM, Servais J, Martin CB, Kohen D. Prescription Drug Use Among Adults Aged 40-79 in the United States and Canada. *NCHS Data Brief.* sierpień 2019;(347):1–8.
45. Wiysonge CS, Volmink J, Opie LH. Beta-blockers and the treatment of hypertension: it is time to move on. *Cardiovasc J Afr.* 2007;18(6):351–2.
46. Hoehe MR, Otterud B, Hsieh WT, Martinez MM, Stauffer D, Holik J, i in. Genetic mapping of adrenergic receptor genes in humans. *J Mol Med [Internet].* czerwiec 1995 [cytowane 22 luty 2024];73(6). Dostępne na: <http://link.springer.com/10.1007/BF00231616>
47. Rasmussen SGF, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, i in. Crystal structure of the β 2 adrenergic receptor–Gs protein complex. *Nature.* 29 wrzesień 2011;477(7366):549–55.
48. Rains SL, Amaya CN, Bryan BA. Beta-adrenergic receptors are expressed across diverse cancers. *Oncoscience.* 23 sierpień 2017;4(7–8):95–105.
49. Barron TI, Sharp L, Visvanathan K. Beta-adrenergic blocking drugs in breast cancer: a perspective review. *Ther Adv Med Oncol.* maj 2012;4(3):113–25.
50. Law NC, Donaubauer EM, Zeleznik AJ, Hunzicker-Dunn M. How Protein Kinase A Activates Canonical Tyrosine Kinase Signaling Pathways To Promote Granulosa Cell Differentiation. *Endocrinology.* 1 lipiec 2017;158(7):2043–51.

51. Hager M, Haufe H, Kemmerling R, Hitzl W, Mikuz G, Moser PL, i in. Increased activated Akt expression in renal cell carcinomas and prognosis. *J Cell Mol Med.* 2 sierpień 2009;13(8b):2181–8.
52. Brodziak A, Sobczuk P, Bartnik E, Fiedorowicz M, Porta C, Szczylik C, i in. Drug resistance in papillary RCC: from putative mechanisms to clinical practicalities. *Nat Rev Urol.* listopad 2019;16(11):655–73.
53. Murugan AK, Grieco M, Tsuchida N. RAS mutations in human cancers: Roles in precision medicine. *Semin Cancer Biol.* grudzień 2019;59:23–35.
54. Watson LJ, Alexander KM, Mohan ML, Bowman AL, Mangmool S, Xiao K, i in. Phosphorylation of Src by phosphoinositide 3-kinase regulates beta-adrenergic receptor-mediated EGFR transactivation. *Cell Signal.* październik 2016;28(10):1580–92.
55. Wells A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol.* czerwiec 1999;31(6):637–43.
56. Chakroborty D, Sarkar C, Basu B, Dasgupta PS, Basu S. Catecholamines Regulate Tumor Angiogenesis. *Cancer Res.* 1 maj 2009;69(9):3727–30.
57. Yang EV, Kim S jae, Donovan EL, Chen M, Gross AC, Webster Marketon JI, i in. Norepinephrine upregulates VEGF, IL-8, and IL-6 expression in human melanoma tumor cell lines: Implications for stress-related enhancement of tumor progression. *Brain Behav Immun.* luty 2009;23(2):267–75.
58. Yang EV, Sood AK, Chen M, Li Y, Eubank TD, Marsh CB, i in. Norepinephrine Up-regulates the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor, Matrix Metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 in Nasopharyngeal Carcinoma Tumor Cells. *Cancer Res.* 1 listopad 2006;66(21):10357–64.
59. Le CP, Nowell CJ, Kim-Fuchs C, Botteri E, Hiller JG, Ismail H, i in. Chronic stress in mice remodels lymph vasculature to promote tumour cell dissemination. *Nat Commun.* 1 marzec 2016;7(1):10634.
60. Padro CJ, Sanders VM. Neuroendocrine regulation of inflammation. *Semin Immunol.* październik 2014;26(5):357–68.
61. Thapa S, Cao X. Nervous regulation: beta-2-adrenergic signaling in immune homeostasis, cancer immunotherapy, and autoimmune diseases. *Cancer Immunol Immunother.* sierpień 2023;72(8):2549–56.

62. Ben-Eliyahu S, Shakhar G, Page GG, Stefanski V, Shakhar K. Suppression of NK Cell Activity and of Resistance to Metastasis by Stress: A Role for Adrenal Catecholamines and β -Adrenoceptors. *Neuroimmunomodulation*. 2000;8(3):154–64.
63. Wang W, Cao X. Beta-Adrenergic Signaling in Tumor Immunology and Immunotherapy. *Crit Rev Immunol*. 2019;39(2):93–103.
64. Sloan EK, Priceman SJ, Cox BF, Yu S, Pimentel MA, Tangkanangnukul V, i in. The Sympathetic Nervous System Induces a Metastatic Switch in Primary Breast Cancer. *Cancer Res*. 15 wrzesień 2010;70(18):7042–52.
65. Lamkin DM, Ho HY, Ong TH, Kawanishi CK, Stoffers VL, Ahlawat N, i in. β -Adrenergic-stimulated macrophages: Comprehensive localization in the M1-M2 spectrum. *Brain Behav Immun*. październik 2016;57:338–46.
66. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. 1 listopad 2002;23(11):549–55.
67. Qin J fang, Jin F jiao, Li N, Guan H tao, Lan L, Ni H, i in. Adrenergic receptor β 2 activation by stress promotes breast cancer progression through macrophages M2 polarization in tumor microenvironment. *BMB Rep*. 31 maj 2015;48(5):295–300.
68. Yang H, Xia L, Chen J, Zhang S, Martin V, Li Q, i in. Stress–glucocorticoid–TSC22D3 axis compromises therapy-induced antitumor immunity. *Nat Med*. wrzesień 2019;25(9):1428–41.
69. Bucsek MJ, Qiao G, MacDonald CR, Giridharan T, Evans L, Niedzwecki B, i in. β -Adrenergic Signaling in Mice Housed at Standard Temperatures Suppresses an Effector Phenotype in CD8⁺ T Cells and Undermines Checkpoint Inhibitor Therapy. *Cancer Res*. 15 październik 2017;77(20):5639–51.
70. Partecke LI, Speerforck S, Käding A, Seubert F, Kühn S, Lorenz E, i in. Chronic stress increases experimental pancreatic cancer growth, reduces survival and can be antagonised by beta-adrenergic receptor blockade. *Pancreatology*. maj 2016;16(3):423–33.
71. Huang R, Fujimura A, Nakata E, Takihira S, Inoue H, Yoshikawa S, i in. Adrenergic signaling promotes the expansion of cancer stem-like cells of malignant peripheral nerve sheath tumors. *Biochem Biophys Res Commun*. czerwiec 2021;557:199–205.

72. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. listopad 2001;414(6859):105–11.
73. Chu X, Tian W, Ning J, Xiao G, Zhou Y, Wang Z, i in. Cancer stem cells: advances in knowledge and implications for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther*. 5 lipiec 2024;9(1):170.
74. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. lipiec 1997;3(7):730–7.
75. Lasorsa F, Rutigliano M, Milella M, Ferro M, Pandolfo SD, Crocetto F, i in. Cancer Stem Cells in Renal Cell Carcinoma: Origins and Biomarkers. *Int J Mol Sci*. 24 sierpień 2023;24(17):13179.
76. Neradil J, Veselska R. Nestin as a marker of cancer stem cells. *Cancer Sci*. lipiec 2015;106(7):803–11.
77. Ozbek E, Calik G, Otunctemur A, Aliskan T, Cakir S, Dursun M, i in. Stem cell markers aldehyde dehydrogenase type 1 and nestin expressions in renal cell cancer. *Arch Ital Urol Androl Organo Uff Soc Ital Ecogr Urol E Nefrol*. marzec 2012;84(1):7–11.
78. Mamun MA, Mannoor K, Cao J, Qadri F, Song X. SOX2 in cancer stemness: tumor malignancy and therapeutic potentials. *J Mol Cell Biol*. 20 luty 2020;12(2):85–98.
79. Zhang Q, Han Z, Zhu Y, Chen J, Li W. The Role and Specific Mechanism of OCT4 in Cancer Stem Cells: A Review. *Int J Stem Cells*. 30 listopad 2020;13(3):312–25.
80. Rasti A, Mehrazma M, Madjd Z, Abolhasani M, Saeednejad Zanjani L, Asgari M. Co-expression of Cancer Stem Cell Markers OCT4 and NANOG Predicts Poor Prognosis in Renal Cell Carcinomas. *Sci Rep*. 6 sierpień 2018;8(1):11739.
81. Yu B, Cai H, Xu Z, Xu T, Zou Q, Gu M. Expressions of stem cell transcription factors Nanog and Oct4 in renal cell carcinoma tissues and clinical significance. *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol*. 16 listopad 2016;44(8):1818–23.
82. Gu W, Wang B, Wan F, Wu J, Lu X, Wang H, i in. SOX2 and SOX12 are predictive of prognosis in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Lett [Internet]*. 19 styczeń 2018 [cytowane 27 listopad 2024]; Dostępne na: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2018.7828>

83. Rivero EM, Piñero CP, Gargiulo L, Entschladen F, Zänker K, Bruzzone A, i in. The β 2-Adrenergic Agonist Salbutamol Inhibits Migration, Invasion and Metastasis of the Human Breast Cancer MDA-MB- 231 Cell Line. *Curr Cancer Drug Targets* [Internet]. 19 wrzesień 2017 [cytowane 30 styczeń 2024];17(8). Dostępne na: <http://www.eurekaselect.com/151233/article>
84. Carie AE, Sebtí SM. A chemical biology approach identifies a beta-2 adrenergic receptor agonist that causes human tumor regression by blocking the Raf-1/Mek-1/Erk1/2 pathway. *Oncogene*. 31 maj 2007;26(26):3777–88.
85. Pérez Piñero C, Bruzzone A, Sarappa M, Castillo L, Lüthy I. Involvement of α 2- and β 2-adrenoceptors on breast cancer cell proliferation and tumour growth regulation. *Br J Pharmacol*. maj 2012;166(2):721–36.
86. Re G, Badino P, Girardi C, Di Carlo F. Effects of a β 2-agonist (clenbuterol) on cultured human (CG-5) breast cancer cells. *Pharmacol Res*. grudzień 1992;26(4):377–84.
87. Kim TH, Vazquez-Hidalgo E, Abdou A, Tan XHM, Christodoulides A, Farris CM, i in. β -adrenergic signaling modulates cancer cell mechanotype through a RhoA-ROCK-myosin II axis [Internet]. 2019 [cytowane 23 październik 2024]. Dostępne na: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/777755>
88. Choy C, Raytis JL, Smith DD, Duenas M, Neman J, Jandial R, i in. Inhibition of β 2-adrenergic receptor reduces triple-negative breast cancer brain metastases: The potential benefit of perioperative β -blockade. *Oncol Rep*. czerwiec 2016;35(6):3135–42.
89. Chin C, Li J, Lee K, Huang Y, Wang K, Lai H, i in. Selective β 2-AR Blockage Suppresses Colorectal Cancer Growth Through Regulation of EGFR-Akt/ERK1/2 Signaling, G1-Phase Arrest, and Apoptosis. *J Cell Physiol*. luty 2016;231(2):459–72.
90. Wong HPS, Ho JWC, Koo MWL, Yu L, Wu WKK, Lam EKY, i in. Effects of adrenaline in human colon adenocarcinoma HT-29 cells. *Life Sci*. czerwiec 2011;88(25–26):1108–12.
91. Masur K, Niggemann B, Zanker KS, Entschladen F. Norepinephrine-induced migration of SW 480 colon carcinoma cells is inhibited by beta-blockers. *Cancer Res*. 1 kwiecień 2001;61(7):2866–9.
92. Fjæstad KY, Rømer AMA, Goitea V, Johansen AZ, Thorseth ML, Carretta M, i in.

- Blockade of beta-adrenergic receptors reduces cancer growth and enhances the response to anti-CTLA4 therapy by modulating the tumor microenvironment. *Oncogene*. 25 luty 2022;41(9):1364–75.
93. Lin Y, Liu Y, Gao Z, Jing D, Bi R, Cui X, i in. Beta-adrenergic receptor blocker propranolol triggers anti-tumor immunity and enhances irinotecan therapy in mice colorectal cancer. *Eur J Pharmacol*. czerwiec 2023;949:175718.
 94. Shin VY, Wu WKK, Chu KM, Koo MWL, Wong HPS, Lam EKY, i in. Functional Role of β -Adrenergic Receptors in the Mitogenic Action of Nicotine on Gastric Cancer Cells. *Toxicol Sci*. 28 listopad 2006;96(1):21–9.
 95. Koh M, Takahashi T, Kurokawa Y, Kobayashi T, Saito T, Ishida T, i in. Propranolol suppresses gastric cancer cell growth by regulating proliferation and apoptosis. *Gastric Cancer*. wrzesień 2021;24(5):1037–49.
 96. Lu Y, Zhang Y, Zhao H, Li Q, Liu Y, Zuo Y, i in. Chronic stress model simulated by salbutamol promotes tumorigenesis of gastric cancer cells through β 2-AR/ERK/EMT pathway. *J Cancer*. 2022;13(2):401–12.
 97. Rangarajan S, Enserink JM, Kuiperij HB, De Rooij J, Price LS, Schwede F, i in. Cyclic AMP induces integrin-mediated cell adhesion through Epac and Rap1 upon stimulation of the β 2-adrenergic receptor. *J Cell Biol*. 17 luty 2003;160(4):487–93.
 98. Enserink JM, Price LS, Methi T, Mahic M, Sonnenberg A, Bos JL, i in. The cAMP-Epac-Rap1 Pathway Regulates Cell Spreading and Cell Adhesion to Laminin-5 through the α 3 β 1 Integrin but Not the α 6 β 4 Integrin. *J Biol Chem*. październik 2004;279(43):44889–96.
 99. Thaker PH, Han LY, Kamat AA, Arevalo JM, Takahashi R, Lu C, i in. Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nat Med*. 1 sierpień 2006;12(8):939–44.
 100. Lang K, Drell TL, Lindecke A, Niggemann B, Kaltschmidt C, Zaenker KS, i in. Induction of a metastatogenic tumor cell type by neurotransmitters and its pharmacological inhibition by established drugs. *Int J Cancer*. listopad 2004;112(2):231–8.
 101. Liao X, Chaudhary P, Qiu G, Che X, Fan L. The role of propranolol as a radiosensitizer in gastric cancer treatment. *Drug Des Devel Ther*. marzec 2018;Volume 12:639–45.

102. Grytli HH, Fagerland MW, Fosså SD, Taskén KA. Association Between Use of β -Blockers and Prostate Cancer-Specific Survival: A Cohort Study of 3561 Prostate Cancer Patients with High-Risk or Metastatic Disease. *Eur Urol.* marzec 2014;65(3):635–41.
103. Wang HM, Liao ZX, Komaki R, Welsh JW, O'Reilly MS, Chang JY, i in. Improved survival outcomes with the incidental use of beta-blockers among patients with non-small-cell lung cancer treated with definitive radiation therapy. *Ann Oncol.* maj 2013;24(5):1312–9.
104. Lemeshow S, Sørensen HT, Phillips G, Yang EV, Antonsen S, Riis AH, i in. β -Blockers and Survival among Danish Patients with Malignant Melanoma: A Population-Based Cohort Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1 październik 2011;20(10):2273–9.
105. Watkins JL, Thaker PH, Nick AM, Ramondetta LM, Kumar S, Urbauer DL, i in. Clinical impact of selective and nonselective beta-blockers on survival in patients with ovarian cancer: Beta-Blockers and Ovarian Cancer Survival. *Cancer.* 1 październik 2015;121(19):3444–51.
106. Choi CH, Song T, Kim TH, Choi JK, Park JY, Yoon A, i in. Meta-analysis of the effects of beta blocker on survival time in cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol.* lipiec 2014;140(7):1179–88.
107. Leung HWC, Hung LL, Chan ALF, Mou CH. Long-Term Use of Antihypertensive Agents and Risk of Breast Cancer: A Population-Based Case–Control Study. *Cardiol Ther.* czerwiec 2015;4(1):65–76.
108. Zheng G, Sundquist J, Sundquist K, Ji J. Beta-Blockers Use and Risk of Breast Cancer in Women with Hypertension. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1 maj 2021;30(5):965–73.
109. Yang J, Zhang S, Jiang W. Impact of Beta Blockers on Breast Cancer Incidence and Prognosis. *Clin Breast Cancer.* sierpień 2023;23(6):664-671.e21.
110. Caparica R, Bruzzzone M, Agostinetti E, De Angelis C, Fêde Â, Ceppi M, i in. Beta-blockers in early-stage breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *ESMO Open.* kwiecień 2021;6(2):100066.
111. Hiller JG, Cole SW, Crone EM, Byrne DJ, Shackleford DM, Pang JMB, i in.

- Preoperative β -Blockade with Propranolol Reduces Biomarkers of Metastasis in Breast Cancer: A Phase II Randomized Trial. *Clin Cancer Res.* 15 kwiecień 2020;26(8):1803–11.
112. Shaashua L, Shabat-Simon M, Haldar R, Matzner P, Zmora O, Shabtai M, i in. Perioperative COX-2 and β -Adrenergic Blockade Improves Metastatic Biomarkers in Breast Cancer Patients in a Phase-II Randomized Trial. *Clin Cancer Res.* 15 sierpień 2017;23(16):4651–61.
 113. Haldar R, Ricon-Becker I, Radin A, Gutman M, Cole SW, Zmora O, i in. Perioperative COX2 and β -adrenergic blockade improves biomarkers of tumor metastasis, immunity, and inflammation in colorectal cancer: A randomized controlled trial. *Cancer.* wrzesień 2020;126(17):3991–4001.
 114. Zhou L, Li Y, Li X, Chen G, Liang H, Wu Y, i in. Propranolol Attenuates Surgical Stress–Induced Elevation of the Regulatory T Cell Response in Patients Undergoing Radical Mastectomy. *J Immunol.* 15 kwiecień 2016;196(8):3460–9.
 115. De Giorgi V, Grazzini M, Benemei S, Marchionni N, Botteri E, Pennacchioli E, i in. Propranolol for Off-label Treatment of Patients With Melanoma: Results From a Cohort Study. *JAMA Oncol.* 8 luty 2018;4(2):e172908.
 116. Seretis A, Cividini S, Markozannes G, Tseretopoulou X, Lopez DS, Ntzani EE, i in. Association between blood pressure and risk of cancer development: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Sci Rep.* 12 czerwiec 2019;9(1):8565.
 117. Kim CS, Han KD, Choi HS, Bae EH, Ma SK, Kim SW. Association of Hypertension and Blood Pressure With Kidney Cancer Risk: A Nationwide Population-Based Cohort Study. *Hypertension.* czerwiec 2020;75(6):1439–46.
 118. Handler J. Renal Cell Carcinoma and Hypertension. *J Clin Hypertens.* kwiecień 2005;7(4):249–51.
 119. Ba Z, Xiao Y, He M, Liu D, Wang H, Liang H, i in. Risk Factors for the Comorbidity of Hypertension and Renal Cell Carcinoma in the Cardio-Oncologic Era and Treatment for Tumor-Induced Hypertension. *Front Cardiovasc Med.* 17 luty 2022;9:810262.
 120. Fukushima H, Inoue M, Kijima T, Yoshida S, Yokoyama M, Ishioka J, i in. Incidence and Risk Factors of Hypertension Following Partial Nephrectomy in Patients With

Renal Tumors: A Cross-sectional Study of Postoperative Home Blood Pressure and Antihypertensive Medications. *Clin Genitourin Cancer*. październik 2020;18(5):e619–28.

121. Ptinopoulou AG, Sprangers B. Tyrosine kinase inhibitor-induced hypertension—marker of anti-tumour treatment efficacy or cardiovascular risk factor? *Clin Kidney J*. 3 luty 2021;14(1):14–7.
122. Bono P, Rautiola J, Utriainen T, Joensuu H. Hypertension as predictor of sunitinib treatment outcome in metastatic renal cell carcinoma. *Acta Oncol*. maj 2011;50(4):569–73.
123. Ha M, Kim DW, Kim J, Hong CM, Park SM, Woo IA, i in. Prognostic role of the beta-2 adrenergic receptor in clear cell renal cell carcinoma. *Anim Cells Syst*. 3 wrzesień 2019;23(5):365–9.
124. Albiñana V, Gallardo-Vara E, De Rojas-P I, Recio-Poveda L, Aguado T, Canto-Cano A, i in. Targeting β 2-Adrenergic Receptors Shows Therapeutical Benefits in Clear Cell Renal Cell Carcinoma from Von Hippel–Lindau Disease. *J Clin Med*. 25 sierpień 2020;9(9):2740.
125. Xie Y, Xu P, Wang M, Zheng Y, Tian T, Yang S, i in. Antihypertensive medications are associated with the risk of kidney and bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Aging*. 22 styczeń 2020;12(2):1545–62.
126. Parker WP, Lohse CM, Zaid HB, Cheville JC, Boorjian SA, Leibovich BC, i in. Evaluation of beta-blockers and survival among hypertensive patients with renal cell carcinoma. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. styczeń 2017;35(1):36.e1-36.e6.
127. Korkmaz M, Eryılmaz MK, Koçak MZ, Er MM, Hendem E, Demirkıran A, i in. The effect of concomitant beta-blocker use on survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with a vascular endothelial growth factor receptor inhibitors in the first line. *Eur J Clin Pharmacol*. czerwiec 2024;80(6):941–7.
128. Patel VG, Oh WK, Galsky MD, Liaw BCH, Tsao CK. Effect of concurrent beta-blocker (BB) use in patients receiving immune checkpoint inhibitors for metastatic urothelial (mUC) and renal cell carcinomas (mRCC). *J Clin Oncol*. 1 marzec 2019;37(7_suppl):467–467.
129. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, i in. The cBio Cancer

- Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. *Cancer Discov.* 1 maj 2012;2(5):401–4.
130. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, i in. Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the cBioPortal. *Sci Signal* [Internet]. 2 kwiecień 2013 [cytowane 17 październik 2023];6(269). Dostępne na: <https://www.science.org/doi/10.1126/scisignal.2004088>
 131. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *J Am Stat Assoc.* czerwiec 1958;53(282):457–81.
 132. Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst.* lipiec 1977;59(1):221–6.
 133. Brodaczewska KK, Szczylik C, Fiedorowicz M, Porta C, Czarnecka AM. Choosing the right cell line for renal cell cancer research. *Mol Cancer.* grudzień 2016;15(1):83.
 134. Williams RD, Elliott AY, Stein N, Fraley EE. In vitro cultivation of human renal cell cancer. I. Establishment of cells in culture. *In Vitro.* wrzesień 1976;12(9):623–7.
 135. Shinojima T, Oya M, Takayanagi A, Mizuno R, Shimizu N, Murai M. Renal cancer cells lacking hypoxia inducible factor (HIF)-1 expression maintain vascular endothelial growth factor expression through HIF-2. *Carcinogenesis.* 18 sierpień 2006;28(3):529–36.
 136. Ding XF, Zhou J, Hu QY, Liu SC, Chen G. The Tumor Suppressor pVHL Down-regulates Never-in-Mitosis A-related Kinase 8 via Hypoxia-inducible Factors to Maintain Cilia in Human Renal Cancer Cells. *J Biol Chem.* styczeń 2015;290(3):1389–94.
 137. Kochevar J. Blockage of autonomous growth of ACHN cells by anti-renal cell carcinoma monoclonal antibody 5F4. *Cancer Res.* 15 maj 1990;50(10):2968–72.
 138. Korhonen M, Sariola H, Gould VE, Kangas L, Virtanen I. Integrins and laminins in human renal carcinoma cells and tumors grown in nude mice. *Cancer Res.* 15 sierpień 1994;54(16):4532–8.
 139. Hakimi AA, Chevinsky M, Hsieh JJ, Sander C, Sinha R. MP23-11 GENOMIC COMPARISON OF RENAL CELL CARCINOMA CELL LINES TO HUMAN TUMORS. *J Urol* [Internet]. kwiecień 2014 [cytowane 19 styczeń 2025];191(4S). Dostępne na: <http://www.jurology.com/doi/10.1016/j.juro.2014.02.879>

140. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. grudzień 2001;25(4):402–8.
141. DepMap B. DepMap 24Q4 Public [Internet]. Figshare+; 2024 [cytowane 11 marzec 2025]. s. 30825074613 Bytes. Dostępne na: https://plus.figshare.com/articles/dataset/DepMap_24Q4_Public/27993248/1
142. Kruskal WH, Wallis WA. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *J Am Stat Assoc*. grudzień 1952;47(260):583–621.
143. Dunn OJ. Multiple Comparisons Using Rank Sums. *Technometrics*. sierpień 1964;6(3):241–52.
144. Virtanen P, Gommers R, Oliphant TE, Haberland M, Reddy T, Cournapeau D, i in. SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nat Methods*. 2 marzec 2020;17(3):261–72.
145. Seabold, Skipper, Perkold, Josef. statsmodels: Econometric and statistical modeling with python. W 2010.
146. Furge KA, Chen J, Koeman J, Swiatek P, Dykema K, Lucin K, i in. Detection of DNA Copy Number Changes and Oncogenic Signaling Abnormalities from Gene Expression Data Reveals *MYC* Activation in High-Grade Papillary Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res*. 1 kwiecień 2007;67(7):3171–6.
147. Albiñana V, Recio-Poveda L, González-Peramato P, Martínez-Piñeiro L, Botella LM, Cuesta AM. Blockade of β 2-Adrenergic Receptor Reduces Inflammation and Oxidative Stress in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 25 styczeń 2022;23(3):1325.
148. Hopkinson HE, Latif ML, Hill SJ. Non-competitive antagonism of β_2 -agonist-mediated cyclic AMP accumulation by ICI 118551 in BC3H1 cells endogenously expressing constitutively active β_2 -adrenoceptors. *Br J Pharmacol*. wrzesień 2000;131(1):124–30.
149. Zhang X, Han B, Huang J, Zheng B, Geng Q, Aziz F, i in. Prognostic Significance of OCT4 Expression in Adenocarcinoma of the Lung. *Jpn J Clin Oncol*. 1 październik 2010;40(10):961–6.
150. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RDG. CNS stem cells express a new class of

- intermediate filament protein. *Cell*. luty 1990;60(4):585–95.
151. Daido W, Nakashima T, Masuda T, Sakamoto S, Yamaguchi K, Horimasu Y, i in. Nestin and Notch3 collaboratively regulate angiogenesis, collagen production, and endothelial–mesenchymal transition in lung endothelial cells. *Cell Commun Signal*. 21 wrzesień 2023;21(1):247.
 152. Han E, Kim J, Jung MJ, Chin S, Lee JH, Won KY, i in. ERG and nestin: useful markers of immature vessels and novel prognostic markers in renal cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2021;14(1):116–25.
 153. Gnarr JR, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MH, Li H, i in. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet*. maj 1994;7(1):85–90.
 154. Cros J, Sbidian E, Posseme K, Letierce A, Guettier C, Benoît G, i in. Nestin expression on tumour vessels and tumour-infiltrating macrophages define a poor prognosis subgroup of pt1 clear cell renal cell carcinoma. *Virchows Arch*. wrzesień 2016;469(3):331–7.
 155. Madden KS, Szpunar MJ, Brown EB. β -Adrenergic receptors (β -AR) regulate VEGF and IL-6 production by divergent pathways in high β -AR-expressing breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat*. grudzień 2011;130(3):747–58.
 156. Lutgendorf SK, Cole S, Costanzo E, Bradley S, Coffin J, Jabbari S, i in. Stress-related mediators stimulate vascular endothelial growth factor secretion by two ovarian cancer cell lines. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 październik 2003;9(12):4514–21.
 157. Liu X, Wu WKK, Yu L, Sung JJY, Srivastava G, Zhang ST, i in. Epinephrine stimulates esophageal squamous-cell carcinoma cell proliferation via β -adrenoceptor-dependent transactivation of extracellular signal-regulated kinase/cyclooxygenase-2 pathway. *J Cell Biochem*. wrzesień 2008;105(1):53–60.
 158. Che. The β -adrenoceptor antagonist, propranolol, induces human gastric cancer cell apoptosis and cell cycle arrest via inhibiting nuclear factor κ B signaling. *Oncol Rep* [Internet]. 26 październik 2010 [cytowane 24 październik 2024];24(6). Dostępne na: <http://www.spandidos-publications.com/or/24/6/1669>
 159. Khan MI, Czarnecka AM, Lewicki S, Helbrecht I, Brodaczewska K, Koch I, i in. Comparative Gene Expression Profiling of Primary and Metastatic Renal Cell

Carcinoma Stem Cell-Like Cancer Cells. Castresana JS, redaktor. PLOS ONE. 3 listopad 2016;11(11):e0165718.

160. Mei X, Shu J, Huang R, Chu X, Tian Y. Expression of VEGF, CD73 and their relationship with clinical pathology, microvessel density, and prognosis in renal cell carcinoma. *Transl Androl Urol.* czerwiec 2020;9(3):1366–73.
161. Zhang Z, Neiva KG, Lingen MW, Ellis LM, Nör JE. VEGF-dependent tumor angiogenesis requires inverse and reciprocal regulation of VEGFR1 and VEGFR2. *Cell Death Differ.* marzec 2010;17(3):499–512.
162. Bando H, Weich HA, Brokelmann M, Horiguchi S, Funata N, Ogawa T, i in. Association between intratumoral free and total VEGF, soluble VEGFR-1, VEGFR-2 and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer.* luty 2005;92(3):553–61.
163. Vet NJ, De Winter BCM, Koninckx M, Boeschoten SA, Boehmer ALM, Verhallen JT, i in. Population Pharmacokinetics of Intravenous Salbutamol in Children with Refractory Status Asthmaticus. *Clin Pharmacokinet.* luty 2020;59(2):257–64.

10 Opinia Komisji Bioetycznej

Z uwagi na charakter przeprowadzonych doświadczeń (badanie liniach komórkowych oraz analiza danych z bazy otwartej bazy danych) nie występują przesłanki świadczące o zaliczeniu powyższych badań do kategorii eksperymentu medycznego. W załączeniu do pracy znajduje się informacja o przyjęciu do wiadomości przez Komisję Bioetyczną Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego doświadczeń przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej.