

**mgr Agata Borkowska**

**Rola autofagii i starzenia w chemooporności raka nerki:  
analiza *in vitro* i *in vivo***

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

Promotor: prof. dr hab. Claudine Kieda

Promotor pomocniczy: dr Halina Waś

Laboratorium Onkologii Molekularnej i Terapii Innowacyjnych  
Wojskowy Instytut Medyczny Państwowy Instytut Badawczy



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2023r.

***Słowa kluczowe:*** rak nerkowokomórkowy, starzenie komórkowe, hipoksja, autofagia, chemioterapia

***Key words:*** renal cell carcinoma, senescence, hypoxia, autophagy, chemotherapy

Prace badawcze zaprezentowane w niniejszej rozprawie były finansowane w ramach projektów:

- „Rola autofagii i starzenia w chemooporności komórek nowotworowych: badania in vitro, in vivo i analiza materiału klinicznego” (2017/26/E/NZ3/00434)  
Narodowe Centrum Nauki, Sonata Bis 7  
Kierownik projektu: dr Halina Waś
- „Effect of myo-inositol trispyrophosphate (ITPP) on chemoresistance of renal carcinoma cells” Grant statutowy no. 500.  
MNiSW, WIM-BIP. 2019-2021.  
Kierownik projektu: dr Halina Waś

Stypendium doktoranckie finansowane było w ramach projektu:

- „Program interdyscyplinarnych Studiów Doktoranckich wykorzystujących sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) w medycynie spersonalizowanej” (POWR.03.02.00-00-I041/16-00)  
Fundusze Europejskie Wiedza Edukacja Rozwój – Unia Europejska Fundusz Społeczny.





*Dziękuję mojej promotor prof. dr hab. Claudine Kieda  
oraz promotor pomocniczej dr Halinie Waś,  
za cenne wskazówki merytoryczne i poświęcony czas,  
szczególnie w okresie przygotowywania niniejszej rozprawy doktorskiej.*

*Pragnę wyrazić moją wdzięczność dla wszystkich pracowników  
Laboratorium Onkologii Molekularnej i Terapii innowacyjnych,  
Wojskowego Instytutu Medycznego-Państwowego Instytutu Badawczego,  
przede wszystkim  
dr Robertowi Zdanowskiemu, dr Klaudii Brodaczewskiej, dr Agnieszce Synowiec  
mgr Aleksandrze Olszewskiej-Banach oraz mgr Maciejowi Golanowi.  
za stworzenie niezastąpionego i wyjątkowego środowiska pracy.  
Wasze wsparcie, dobre słowo i pomoc w realizacji projektu były niezastąpione.*

*Składam też serdeczne podziękowania dla wszystkich osób,  
które przyczyniły się do pozyskania  
wyników przedstawionych w niniejszej pracy*

*Członkiniom zespołu Pracowni Badań Przedklinicznych o Podwyższonym Standardzie  
Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie  
prof. dr hab. Urszuli Wojda, dr Annie Mietelskiej-Porowskiej,  
dr Grażynie Hoser oraz dr Annie Kiryk-Jaśkiewicz  
za przeprowadzenie eksperymentów na zwierzętach laboratoryjnych,*

*Pracownikom firmy Intelliseq  
dr Słowomirowi Gouda oraz mgr Dżesice Hoinkins  
Za przeprowadzenie analiz bioinformatycznych NGS,*

*Pracownikom zakładu Patomorfologii  
mgr Zuzannie Wichrzyckiej, mgr Urszuli Brzósłowskiej  
i plk. dr n. med. Szczepanowi Cierniakowi  
Za pomoc w przygotowaniu materiału do analiz mikroskopowych.*

*Szczególne podziękowania należą się moim Rodzicom.  
Dziękuję Wam za wsparcie i za to, że nigdy we mnie nie zwątpiliście.*



## Spis treści

1. Spis rycin .....	1
1.1. Spis figur .....	1
1.2. Spis tabel .....	3
2. Spis skrótów .....	5
3. Streszczenie .....	10
4. Abstract.....	13
5. Wstęp teoretyczny .....	15
5.1. Rak nerki .....	15
5.1.1. Definicja i epidemiologia .....	15
5.2. Mikrośrodowisko guzów nerki.....	16
5.3. Leczenie raka nerki.....	18
5.4. Hipoksja.....	20
5.4.1. Molekularne mechanizmy odpowiedzi na hipoksję .....	21
5.5. Chemooporność .....	22
5.6. Starzenie komórkowe .....	24
5.6.1. Starzenie replikacyjne .....	25
5.6.2. Starzenie niezależne od limitu replikacyjnego .....	25
5.6.2.1. Blokada cyklu komórkowego, a indukcja starzenia .....	26
5.6.2.2. Fenotyp starzeniowy .....	29
5.6.2.3. SASP.....	30
5.6.3. Starzenie, a fenotyp macierzysty .....	31
5.6.4. Ucieczka od starzenia .....	32
5.6.5. Terapie senolityczne .....	34
5.7. Autofagia .....	35
5.7.1. Przebieg procesu autofagii .....	36
5.7.2. Autofagia jako cel terapii przeciwnowotworowych.....	38
6. Założenia i cel pracy.....	40
7. Materiały i metody .....	41
7.1. Materiały.....	41
7.1.1. Hodowle komórkowe .....	41
7.1.2. Główny schemat eksperymentu.....	41
7.1.2.1. Schemat eksperymentu z wyciszeniem genów autofagicznych .....	42
7.1.2.2. Schemat eksperymentu z farmakologicznym zahamowaniem autofagii .....	43
7.1.3. Eksperymenty in vivo.....	44
7.1.3.1. Planowana nekropsja i zabezpieczenie materiału badawczego .....	46
7.2. Metody.....	47
7.2.1. Analiza aktywności metabolicznej .....	47
7.2.2. Analiza proliferacji komórek.....	47
7.2.3. Oznaczenie aktywności $\beta$ -Galaktozydazy związanej ze starzeniem komórkowym (SA- $\beta$ -Gal) na preparatach komórkowych.....	48
7.2.4. Oznaczenie aktywności $\beta$ -Galaktozydazy (SA- $\beta$ -Gal) związanej ze starzeniem komórkowym na preparatach tkankowych .....	49
7.2.5. Barwienia immunofluorescencyjne .....	50
7.2.6. Izolacja białka.....	52
7.2.7. Oznaczenie stężenia białka metodą BCA.....	53
7.2.8. Analiza hipertrofii .....	54

7.2.9.	Analiza Western Blot.....	54
7.2.10.	Analiza SASP.....	58
7.2.11.	Analiza morfologii komórek i cyklu komórkowego z wykorzystaniem cytometrii przepływowej.....	60
7.2.11.1.	Strategia bramkowania komórek granulanych i komórek powiększonych.....	61
7.2.11.2.	Strategia bramkowania faz cyklu komórkowego i poliploidii.....	62
7.2.12.	Analiza aktywności lizosomalnej.....	63
7.2.12.1.	Analiza morfologii jąder komórkowych.....	64
7.2.13.	Izolacja RNA.....	65
7.2.14.	Odwrotna transkrypcja.....	65
7.2.15.	Ilościowa reakcja łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym – RT-PCR.....	66
7.2.16.	Analiza sekwencjonowania następnej generacji (NGS).....	68
7.2.17.	Analiza statystyczna.....	69
8.	Wyniki.....	70
8.1.	Indukcja starzenia w liniach komórkowych raka nerki.....	70
8.1.1.	Wybór stężeń leków powodujących starzenie.....	70
8.1.2.	Ocena wpływu chemoterapeutyków na markery starzenia komórkowego w normoksji i w hipoksji.....	74
8.1.3.	VIN blokuje progresję cyklu komórkowego.....	81
8.1.4.	VIN promuje sekrecję czynników SASP.....	86
8.1.5.	VIN aktywuje autofagię.....	88
8.1.6.	Analiza zmian ekspresji genów w wyniku indukcji TIS.....	90
8.2.	Rola autofagii w starzeniu komórkowym.....	99
8.2.1.	Zahamowanie autofagii na jej wczesnych etapach nie wpływa na starzenie komórek raka nerki.....	99
8.2.2.	Zahamowanie późnych etapów autofagii w starych komórkach nowotworowych hamuje ich aktywność metaboliczną i proliferację.....	101
8.2.3.	HCQ promuje ucieczkę od starzenia w komórkach raka nerki traktowanych VIN.....	106
8.2.3.1.	Hipoksja przyspiesza generację komórek potomnych w wyniku zahamowania autofagii.....	110
8.2.4.	Generacja komórek potomnych może być związana z blokadą przepływu autofagii i reaktywacją aktywności lizosomalnej.....	112
8.2.5.	Inhibicja autofagii zmienia sekrecję SASP.....	118
8.2.6.	Wpływ inhibicji autofagii na zmianę ekspresji genów w starych komórkach nowotworowych – sekwencjonowanie następnej generacji.....	119
8.2.6.1.	Weryfikacja wyników NGS.....	126
8.3.	Wpływ inhibicji autofagii na proces starzenia indukowanego chemioterapią <i>in vivo</i> .....	128
8.3.1.	Opracowanie modelu starzenia komórkowego indukowanego chemioterapią <i>in vivo</i> .....	128
8.3.1.1.	Kontrola wzrostu guza wiąże się z zastosowaniem wysoce toksycznych dawek chemioterapii.....	130
	Objawy.....	132
8.3.1.2.	HCQ aktywuje autofagię <i>in vivo</i> .....	135
8.3.2.	Starzenie jest indukowane <i>in vivo</i> .....	137
8.3.3.	HCQ nie wpływa na proliferację, ale promuje wyjście z blokady cyklu komórkowego oraz tendencję do aktywacji śmierci komórkowej w guzach.....	140

8.3.4. HCQ nie wpływa na mikrośrodowisko guzów poza odpowiedzią antyoksydacyjną .....	142
9. Dyskusja .....	149
10. Wnioski.....	167
11. Piśmiennictwo .....	169
12. Zgoda komisji etycznej.....	186



# 1. Spis rycin

## 1.1. Spis figur

Figura 1. Wykres kołowy przedstawiający rozkład najczęściej występujących histologicznych podtypów raka nerki.....	15
Figura 2. Wzory strukturalne leków cytotoksycznych stosowanych w leczeniu RCC.....	18
Figura 3. Szlak sygnałowy odpowiedzi na hipoksję. ....	22
Figura 4. Schemat przedstawiający główne szlaki prowadzące do zahamowania cyklu komórkowego.....	28
Figura 5. Schemat przebiegu autofagii w komórkach ssaczyh.....	36
Figura 6. Schemat przeprowadzenie eksperymentów in vivo.....	45
Figura 7. Strategia bramkowania komórek granularnych i powiększonych. ....	62
Figura 8. Strategia bramkowania komórek w fazach cyklu komórkowego i komórek poliploidalnych.....	63
Figura 9. Zdjęcia reprezentatywne przedstawiające morfologię jąder komórkowych. .	65
Figura 10. Główny schemat eksperymentu. ....	70
Figura 11. Chemioterapeutyki w sposób dawko-zależny obniżają aktywność metaboliczną i proliferację ludzkich komórek RCC w normoksji i hipoksji. ....	71
Figura 12. Chemoterapeutyki w sposób dawko-zależny obniżają aktywność metaboliczną i proliferację mysich komórek RenCa w normoksji i hipoksji. ....	73
Figura 13. VIN i GEM w dawko-zależny sposób promują aktywność SA-β-Gal oraz hipertrofię. ....	74
Figura 14. VIN w większym stopniu niż GEM powoduje akumulację komórek powiększonych i granularnych.....	75
Figura 15. 5-FU indukuje markery starzenia w niższym stopniu niż VIN.....	76
Figura 16. 5-FU wpływa w mniejszym stopniu niż VIN na akumulację komórek powiększonych i ziarnistych.....	77
Figura 17. VIN i GEM w niższym stopniu promują rozwój fenotypu starzeniowego komórek mysich w hipoksji niż w normoksji.....	78
Figura 18. Niedotlenienie nie wpływa na indukcję starzenia pod wpływem 5-FU w komórkach mysich.....	80
Figura 19. Traktowanie VIN generuje więcej komórek apoptotycznych niż 5-FU....	81
Figura 20. VIN promuje blokadę komórek w fazie G2/M oraz poliploidię.....	82
Figura 21. Leczenie VIN i 5-hamuje ekspresję białek związanych regulacją cyklu komórkowego.....	84
Figura 22. Traktowanie komórek VIN powoduje nadekspresję p53 i aktywację białka PTEN.....	85
Figura 23. VIN promuje sekrecję czynników SASP niezależnie od warunków tlenowych.....	88
Figura 24. VIN aktywuje autofagię.....	90
Figura 25. Mapa cieplna przedstawiająca wyniki ekspresji genów istotnie zmienionych w porównaniu UNT N vs VIN N.....	91
Figura 26. Mapa cieplna przedstawiająca wyniki ekspresji genów istotnie zmienionych w porównaniu UNT H vs VIN H.....	92
Figura 27. Diagramy Venna przedstawiający geny zmienionej ekspresji komórek nietraktowanych (UNT) względem komórek traktowanych VIN (VIN) w normoksji i w hipoksji. ....	93
Figura 28. Analiza szlaków najbardziej zmienionych dla genów o obniżonej ekspresji po traktowaniu VIN w normoksji i hipoksji w odniesieniu do bazy danych KEGG.....	95

Figura 29. Analiza szlaków najbardziej zmienionych dla genów o podwyższonej ekspresji po traktowaniu VIN w normoksji i hipoksji w odniesieniu do bazy danych KEGG.....	96
Figura 30. Mapa cieplna przedstawiająca wyniki ekspresji genów istotnie zmienionych w porównaniu VIN N vs VIN H. ....	97
Figura 31. Analiza szlaków najbardziej zmienionych dla genów o podwyższonej ekspresji w porównaniu VIN N vs VIN H w odniesieniu do bazy danych KEGG.....	98
Figura 32. Schemat przeprowadzenia eksperymentów, na podstawie których wykonano analizę wpływu modulacji autofagii na indukcję starzenia pod wpływem chemioterapii. ....	100
Figura 33. Wyciszenie genów związanych z regulacją wczesnej autofagii nie wpływa na aktywność metaboliczną i proliferację komórek traktowanych VIN i 5-FU.....	100
Figura 34. Wzory strukturalne inhibitorów autofagii.....	101
Figura 35. Schemat przeprowadzenia eksperymentów, na podstawie których wykonano analizę wpływu inhibicji autofagii na komórki po wcześniejszym leczeniu chemioterapią. ....	102
Figura 36. BafA1 hamuje aktywność metaboliczną i proliferację komórek traktowanych 5-FU i VIN. ....	103
Figura 37. HCQ obniża aktywność metaboliczną i proliferację komórek traktowanych VIN i 5-FU. ....	104
Figura 38. HCQ w mniejszym stopniu hamuje aktywność metaboliczną i proliferację komórek nietraktowanych niż komórek traktowanych chemoterapeutykami.....	105
Figura 39. HCQ zmniejsza gęstość hodowli komórek nietraktowanych oraz komórek traktowanych VIN. ....	106
Figura 40. HCQ promuje akumulację komórek w fazie sub-G1 w hodowlach komórek nietraktowanych i traktowanych VIN. ....	107
Figura 41. HCQ zmienia rozkład komórek nietraktowanych i komórek traktowanych VIN w cyklu komórkowym.....	108
Figura 42. HCQ hamuje ekspresję białek związanych z regulacją cyklu komórkowego, ale obniża ekspresję inhibitorów cyklu komórkowego w komórkach traktowanych VIN. ....	110
Figura 43. Analiza kinetyki zmian w odsetkach populacji komórek o różnych typach morfologii jąder komórkowych.....	112
Figura 44. HCQ blokuje przepływ autofagiczny w komórkach raka nerki.....	113
Figura 45. HCQ wzmacnia aktywność lizosomalną komórek w normoksji w komórkach traktowanych VIN i 5-FU w miarę upływu czasu.....	115
Figura 46. W hipoksji HCQ promuje aktywność lizosomalną w niższym stopniu niż w normoksji.....	116
Figura 47. Traktowanie HCQ zwiększa sekrecję katepsyny S w komórkach nietraktowanych i komórkach traktowanych VIN. ....	117
Figura 48. Inhibicja autofagii wpływa w znaczący sposób na zmiany w sekrecji czynników SASP w modelach komórek młodych oraz TIS .....	119
Figura 49. Mapa cieplna przedstawiająca wyniki ekspresji genów istotnie zmienionych w porównaniu VIN N vs VIN + HCQ N.....	120
Figura 50. Mapa cieplna przedstawiająca wyniki ekspresji genów istotnie zmienionych w porównaniu VIN H vs VIN + HCQ H.....	121
Figura 51. Diagramy Venna przedstawiający geny zmienionej ekspresji komórek starych (VIN) względem komórek starych leczonych HCQ (VIN+HCQ) w normoksji i w hipoksji. ....	122



Figura 52. Analiza szlaków najbardziej zmienionych dla genów wspólnych dla normoksji i hipoksji o obniżonej ekspresji po traktowaniu HCQ. ....	123
Figura 53. Analiza szlaków najbardziej zmienionych dla genów wspólnych dla normoksji i hipoksji o podwyższonej ekspresji po traktowaniu HCQ. ....	123
Figura 54. Mapa cieplna przedstawiająca wyniki ekspresji genów istotnie zmienionych w porównaniu VIN + HCQ N vs VIN + HCQ H. ....	124
Figura 55. Analiza szlaków najbardziej zmienionych dla genów o podwyższonej ekspresji w porównaniu po traktowaniu HCQ. ....	125
Figura 56. Analiza ekspresji genów wybranych do weryfikacji NGS.....	127
Figura 57. HCQ nie wpływa na tempo wzrostu guza.....	129
Figura 58. Zastosowanie HCQ nie wpłynęło na średnią masę guza. ....	130
Figura 59. HCQ nie wpływa na parametry krwi. ....	133
Figura 60. HCQ nie wpływa na masę organów myszy.....	134
Figura 61. Zastosowanie HCQ nie wpływa na przeżywalność zwierząt.....	135
Figura 62. Farmakologiczna inhibicja autofagii wpływa na aktywację autofagii ale nie na aktywność lizosomalną. ....	136
Figura 63. HCQ nie wpływa na wielkość powierzchni tkanki SA-β-Gal pozytywnej w guzach <i>in vivo</i> . ....	138
Figura 64. Sekrecja IL-8 i osteopontyny wzrasta po leczeniu HCQ. ....	139
Figura 65. HCQ nie wpływa na proliferację komórek w guzach <i>in vivo</i> . ....	140
Figura 66. HCQ hamuje ekspresję p16 <i>in vivo</i> . ....	142
Figura 67. HCQ promuje ekspresję GpX1 <i>in vivo</i> . ....	143
Figura 68. HCQ nie wpływa na ekspresję markerów EMT.....	144
Figura 69. HCQ nie wpływa na ekspresję markerów EMT i macierzystości <i>in vivo</i> . ....	145
Figura 70. HCQ nie wpływa na poziom ekspresji markerów hipoksji.....	146
Figura 71. HCQ nie wpływa na odpowiedź immunologiczną w guzach. ....	147

## 1.2. Spis tabel

Tabela 1. Lista leków wykorzystana w eksperymentach oceny wpływu chemioterapii na rozwój fenotypu starzeniowego.....	42
Tabela 2. Opis dawek i czasu trwania leczenia zwierząt na poszczególnych etapach eksperymentu.....	45
Tabela 3. Opis znieczulenia zastosowanego przed nekropsją u myszy. ....	46
Tabela 4. Spis przeciwciał wykorzystanych do wykonania barwień immunofluorescencyjnych. ....	50
Tabela 5. Opis filtrów wykorzystanych do wizualizacji preparatów fluorescencyjnych. ....	51
Tabela 6. Opis składu żeli poliakrylamidowych wykorzystanych do elektroforezy żelowej.....	55
Tabela 7. Spis przeciwciał pierwszorzędowych wykorzystanych do analizy Western Blot i barwień immunofluorescencyjnych.....	56
Tabela 8. Ilość białka całkowitego wykorzystanego do analizy produkcji czynników SASP w tkance guza. ....	59
Tabela 9 Skład mieszaniny reakcyjnego stosowany do odwrotnej transkrypcji. ....	66
Tabela 10 Protokół przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji. ....	66
Tabela 11. Skład mieszaniny reakcyjnej do przeprowadzenia reakcji RT-PCR. ....	67
Tabela 12. Sekwencje primerów wykorzystane do przeprowadzenia reakcji RT-PCR. ....	67
Tabela 13. Protokół reakcji RT-PCR. ....	68

Tabela 14. Dawki leków wybrane do analizy fenotypu i zmian molekularnych w starych komórkach nowotworowych. ....	73
Tabela 15. Podsumowanie zmian w markerach fenotypowych starzenia komórkowego w komórkach ludzkiej i mysiej linii raka nerki. ....	79
Tabela 16. Podsumowanie zmian w cyklu komórkowym oraz w ekspresji białek regulujących jego funkcjonowanie. ....	86
Tabela 17. Lista genów o niższej ekspresji po traktowaniu HCQ. ....	125
Tabela 18. Lista genów wybrana do weryfikacji NGS wraz wartościami logFC dla analizowanych porównań. ....	126
Tabela 19. Podsumowanie wystąpienia nieprawidłowości w anatomii organów zwierząt biorących udział w eksperymencie ocenionych pośmiertnie. ....	132

## 2. Spis skrótów

Skrót	Rozwinięcie po angielsku	Rozwinięcie po polsku
<b>5-FU</b>	5-fluorouracil	5-fluorouracyl
<b>ABC</b>	ATP-binding cassette	transporter ABC
<b>ACD</b>	Autophagic Cell Death	autofagiczna śmierć komórkowa
<b>ACR</b>	Autophagy Cargo Receptors	receptory ładunku autofagii
<b>AMPK</b>	AMP-activated protein kinase	kinaza AMPK
<b>APS</b>	Ammonium Persulfate	nadsiarczan amonu
<b>ASF1A</b>	Anti-Silencing Factor 1A	białko osłonowe histonów ASF1A
<b>ATGs</b>	Autophagy-related Genes	geny związane z autofagią
<b>ATM</b>	Ataxia Telangiectasia Mutated kinase	kinaza ATM
<b>ATR</b>	Ataxia Telangiectasia and Rad3-related kinase	kinaza ATR
<b>BafA1</b>	Bafilomycine A1	bafilomycyna A1
<b>BCA</b>	BiCinchoninic Acid	kwas bis-cynchoninowy
<b>BCL-2</b>	B-Cell Lymphoma 2	chłoniak z komórek B2
<b>BHD</b>	Birt-Hogg-Dubé syndrome	syndrom Birt-Hogg-Dubé
<b>BP</b>	Band Pass	dzielnik wiązki
<b>BRAF</b>	V-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B	homolog B wirusa mysiego mięsaka V-Raf
<b>BrdU</b>	5-bromo-2-deoxyuridine	5-bromo-2'-deoksyurydyna
<b>C/EBP-β</b>	CCAAT/ Enhancer-Binding Protein-β	ccaat/białko wiążące wzmacniacz transkrypcji
<b>ccRCC</b>	Clear Cell Renal Carcinoma	rak jasnokomórkowy nerek
<b>CDK</b>	Cyclin dependent kinases	kinaza cyklinozależna
<b>CHK</b>	Checkpoint kinases	kinaza punktu kontrolnego
<b>CMA</b>	Chaperone Mediated Autophagy	autofagia regulowana białkami opiekuńczymi
<b>CPM</b>	Counts Per Million	ilość zliczeń na milion
<b>CSC</b>	Cancer Stem Cells	macierzyste komórki nowotworowe
<b>CTLA-4</b>	Cytotoxic T cell antigen 4	antygen 4 cytotoksycznych limfocytów T
<b>DAPI</b>	4'-6-diamidino-2-phenylindole	4',6-diaminoino-2-fenyлиндol
<b>DDR</b>	DNA Damage Response	szlak odpowiedzi na uszkodzenia DNA
<b>DEGs</b>	Differentially Expressed Genes	geny o zmienionej ekspresji
<b>dFdCTP</b>	gemcitabine triphosphate	trifosforan gemcytabiny
<b>DMSO</b>	Dimethyl sulfoxide	dimetylosulfotlenek
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid	kwas deoksyrybonukleinowy
<b>dNTP</b>	Trójfosforan deoksyrybonukleotydu	deoxyribonucleotide triphosphate) trójfosforan

<b>DSB</b>	Double Strand Breaks	uszkodzenia podwójnej nici dna
<b>dTMP</b>	Deoxythymidine monophosphate	monofosforan dezoksytymidyny
<b>E2F</b>	E2 transcription factor	czynnik transkrypcyjny E2
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	test immunoenzymatyczny
<b>EM</b>	Emission wavelenght	długość fali emisji
<b>EMT</b>	Epithelial to Mesenchymal Transition	tranzycja epithelialno-mezenchymalna
<b>EX</b>	Excitation wavelenght	długość fali wzbudzenia
<b>FBS</b>	Fetal Bovine Serum	wołowa surowica płodowa
<b>FDR</b>	False Discovery Rate	wskaźnik fałszywych wykryć
<b>FdUMP</b>	Fluorodeoxyuridine monophosphate	monofosforan fluorodezoksyurydyny
<b>FdUTP</b>	Fluorodeoxyuridine triphosphate	trifosforan fluorodezoksyurydyny
<b>FGF</b>	Fibroblast Growth Factor	czynnik wzrostu fibroblastów
<b>FSC</b>	Forward scatter characteristic	charakterystyka rozproszenia od przodu
<b>FUTP</b>	Fluoruridine triphosphate	trifosforan fluorourydydyny
<b>GABARAP</b>	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein	białko związane z receptorem kwasu gamma-aminomasłowego
<b>GATA</b>	GATA-binding factor 1	czynnik wiążący GATA 1
<b>GEM</b>	gemcitabine	gemcytabina
<b>GpX1</b>	Glutathione Peroxidase 1	peroksydaza glutationowa 1
<b>HCQ</b>	hydroxychloroquine	hydroksychlorochina
<b>HIF</b>	Hypoxia Inducible Factor	czynnik indukowany hipoksją
<b>HIRA</b>	Histone regulatory homolog A	homolog A regulatorów histonów
<b>HLRCC</b>	Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer	dziedziczne mięśniaki gładkokomórkowe i rak nerkowokomórkowy
<b>HPRC</b>	Hereditary papillary renal cancer	dziedziczny rak papilarny nerki
<b>HRE</b>	Hypoxia-responsive elements	elementy reagujące na niedotlenienie
<b>I-CAM1</b>	intercellular adhesion molecule 1	cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1
<b>ICI</b>	Immune checkpoints inhibitors	inhibitory immunologicznego punktu kontrolnego
<b>IFN-α 2b</b>	Type-I interferon α 2b	interferon alfa-2b

<b>IGFBP3</b>	Insulin Like Growth Factor Binding Protein 3	insulinopodobny czynnik wzrostu 3
<b>IL</b>	Interleukin	interleukina
<b>KEGG</b>	Kyoto encyclopedia of genes and genomes	kyoto encyklopedia genów i genomów
<b>LC3</b>	Microtubule-associated protein light chain 3	lekkie łańcuchy białka 3 związane z mikrotubulami
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinases	kinaza białkowa aktywowana mitogenami
<b>MDR1</b>	Multidrug resistance 1	gen oporności wielolekowej
<b>MHCI</b>	Major histocompatibility complex class I	układ zgodności tkankowej klasy I
<b>MMP</b>	Matrix Metalloproteinases	metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej
<b>mRCC</b>	Mestatic Renal Cell Carcinoma	przerzutujące raki nerkowokomórkowe
<b>mTOR</b>	mammalian Target Of Rapamycin kinase	ssaczy cel rapamycyny
<b>MTORC1</b>	Mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1	mechanistyczny cel kompleksu rapamycyny 1
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2h-tetrazolium bromide	bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazolowy
<b>NF1</b>	Neurofibromin 1	neurofibromina 1
<b>NF-κB</b>	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	czynnik jądrowy oddziałujący ze wzmacniaczem sekwencji lekkiego łańcucha immunoglobuliny w aktywowanych limfocytach B
<b>NGS</b>	Next Generation Sequencing	sekwencjonowanie następnej generacji
<b>NK</b>	Natural Killer cells	komórki NK
<b>OIS</b>	Oncogene Induced Senescence	starzenie indukowane onkogenami
<b>P-gp</b>	P-glycoprotein	glikoproteina P
<b>PAS</b>	Phagophore formation site	miejsce składania fagoforu
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline	bufor fosforanowy
<b>PD-1</b>	Programmed death receptor 1	receptor programowanej śmierci komórkowej
<b>PDGF</b>	Platelet Derived Growth Factor	płytkopochodny czynnik wzrostu
<b>PDL-1</b>	Programmed Death Receptor 1 Ligand	ligand receptora programowanej śmierci komórkowej
<b>PGCCs</b>	Polyploid Giant Cancer Cells	wielkie komórki poliploidalne
<b>PHD</b>	Proline Hydroxylase Family	rodzina hydroksylaz proliny

<b>PI</b>	Propidium Iodide	jodek propidyny
<b>PI3P</b>	Phosphatidylinositol-3-phosphate	3-fosforanu fosfatydyloinozytolu
<b>PRAK</b>	p38-Regulated/Activated protein Kinase	regulowana/aktywowana kinaza białkowa p38
<b>PTEN</b>	Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome ten	fosfataza i homolog tensyny usunięty na chromosomie 10
<b>pVHL</b>	von Hippel-Lindau protein	białko von Hippel-Lindau'a
<b>Rb</b>	Retinoblastoma protein	białko retinoblastomy
<b>RCC</b>	Renal Cell Carcinoma	rak nerkowokomórkowy
<b>RIN</b>	RNA Integrity Number	współczynnik integralności RNA
<b>RNA</b>	Rybonucleic acid	kwas rybonukleinowy
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species	reaktywne formy tlenu
<b>RPM</b>	Rounds per minute	obroty na minutę
<b>RT</b>	Room temperature	temperatura pokojowa
<b>SA-β-Gal</b>	Senescence Associated β Galactosidase	SA-β-galaktozydaza związana ze starzeniem
<b>SAHF</b>	Senescence Associated Heterochromatin Foci	ogniska nieaktywnej transkrypcyjnie heterochromatyny związane ze starzeniem komórkowym
<b>SASP</b>	Senescence Associated Secretory Phenotype	fenotyp sekrecyjny związany ze starzeniem
<b>SC</b>	Synaptosomal Complex	kompleksy synaptonemalne
<b>SDS</b>	Sodium Dodecyl Sulphate	siarczan dodecyłu sodu
<b>SEM</b>	Standard Error of Measurement	standardowy błąd pomiaru
<b>SIPS</b>	Stress Induced Premature Senescence	starzenie indukowane czynnikami stresowymi
<b>SSC</b>	Side Scatter Characteristic	charakterystyka rozproszenia bocznego
<b>SQSTM1/p62</b>	Sequestosome-1/ubiquitin-binding protein p62	Sequestosome-1/białko wiążące ubikwitynę p62
<b>T CD8+</b>	Cytotoxic T cell CD8+	cytotoksyczne limfocyty T CD8+
<b>TEMED</b>	N',N',N',N'-tetramethylethylenediamine	N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina
<b>TG</b>	Tris-Glycine	bufor tris-glicyna
<b>TGF-β1</b>	Transforming Growth Factor- β1	transformujący czynnik wzrostu-β1
<b>TGS</b>	Tris-Glycine-SDS	bufor tris-glicyna-SDS
<b>Th1</b>	T helper cells type 1	limfocyty T pomocnicze typu 1
<b>Th2</b>	T helper cells type 2	limfocyty T pomocnicze typu 2
<b>TIS</b>	Therapy Induced Senescence	starzenie indukowane terapią
<b>TME</b>	Tumor MicroEnvironment	mikrośrodowisko guza

<b>Treg</b>	Regulatory T cells	limfocyty T regulatorowe
<b>ULK-1</b>	Unc-51-like kinase 1	kinaza ULK 1
<b>VEG-TKI</b>	VEGF receptor Tyrosine Kinase Inhibitors	inhibitory kinazy tyrozynowej VEGF
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor	czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego
<b>VHL</b>	Von Hippel-Lindau syndrome	choroba von Hippel-Lindau'a
<b>VIN</b>	vinblastine	winblastyna
<b>X-gal</b>	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside	5-bromo-4-chloro-3-indolilo-beta-d-galaktopiranozyd
<b><math>\Delta</math>MFI</b>	delta Mean Fluorescence Intensity	względna wartość średniej intensywności fluorescencji

### 3. Streszczenie

Raki nerkowokomórkowe (ang. Renal Cell Carcinoma, RCC) stanowią około 90% wszystkich przypadków raków nerek. W 90% przypadków RCC obserwuje się brak funkcjonalności białka pVHL, negatywnego regulatora czynników indukowanych hipoksją (ang. Hypoxia Inducible Factors, HIF). Jego brak prowadzi do rozwoju permanentnego stanu odpowiedzi na hipoksję w komórce. Ponieważ RCC wykazują słabą odpowiedź na większość standardowych terapii systemowych, istnieje duże zapotrzebowanie na opracowanie nowych strategii terapeutycznych. Podejrzewa się, że komórki nowotworowe, które rozwinęły fenotyp starzeniowy w odpowiedzi na terapię (ang. Therapy Induced Senescence, TIS), mogą być odpowiedzialne za rozwój chemooporności. Komórki TIS są nieodwracalnie zahamowane w cyklu komórkowym i wykazują charakterystyczne zmiany morfologiczne, biochemiczne i molekularne. Mimo nieodwracalnej blokady cyklu komórkowego, komórki te zdolne są do generacji komórek potomnych. Podejrzewa się, że autofagia może odgrywać istotną rolę w przeżyciu komórek starych, a także w aktywizacji ich podziałów. Jej modulacja wydaje się być obiecującą strategią w terapiach senolitycznych. Dlatego celem niniejszej pracy było określenie czy inhibicja autofagii uwrażliwi stare komórki raka nerki na indukcję śmierci komórkowej i/lub wpłynie na wznowienie ich potencjału proliferacyjnego i produkcję komórek potomnych, w warunkach normoksji i hipoksji.

W pierwszej części eksperymentów komórki raka ludzkiego raka nerki, o zmutowanym pVHL oraz komórki mysie o normalnym pVHL, poddano działaniu chemioterapii w warunkach normoksji (~19% O<sub>2</sub>) oraz hipoksji (1% O<sub>2</sub>). Do indukcji starzenia wykorzystano lek blokujący podział mitotyczny – winblastynę (ang. vinblastine, VIN), oraz leki o działaniu genotoksycznym – gemcytabinę (ang. gemcitabine, GEM) i 5-fluorouracyl (ang. 5-fluorouracil, 5-FU). Po zakończeniu eksperymentów przeprowadzono analizy ekspresji markerów starzenia.

Wykazano, że VIN ma najsilniejsze dawko-zależne działanie prostarzeniowe w komórkach raka nerki, a jej działanie jest niezależne od niedotlenienia, w sytuacji, kiedy komórki mają zmutowany pVHL. Pod wpływem leczenia większość komórek w hodowli charakteryzowała się wysoką aktywnością SA-β-Galaktozydazy i sekrecją czynników SASP. W hodowlach zaobserwowano też nagromadzenie komórek powiększonych, granularnych i poliploidalnych. Komórki były zablokowane w cyklu komórkowym, co potwierdziła istotnie wyższa ekspresja inhibitorów tego procesu, p21 i p53. Analizy NGS potwierdziły, że w wyniku indukcji starzenia dochodzi do blokady



replikacji DNA oraz cytokinezy. Indukcji starzenia towarzyszyła, też aktywacja autofagii. Analizy NGS wykazały, że w komórkach starych dochodzi także do aktywacji szlaków związanych z przewodzeniem aksonów i neuroaktywną interakcją ligand-receptor, które nigdy wcześniej nie były wiązane z procesem indukcji starzenia.

W drugim etapie badań przeprowadzono eksperymenty oceniające wpływ zahamowania wczesnej i późnej autofagii w komórkach ulegających starzeniu indukowanemu chemoterapeutykami. Wczesną autofagię zahamowano w komórkach przed traktowaniem ich VIN i 5-FU. W tym celu w ludzkich komórkach raka nerki wyciszono pojedyncze geny kodujące białka ATG5, ATG7, Becn1 oraz ULK1 metodą siRNA. Analizy wykazały, że inhibicja wczesnej autofagii nie wpływa w sposób istotny na indukcję starzenia. Z kolei farmakologiczne zahamowanie późnej autofagii z użyciem HCQ wiązało się z indukcją śmierci komórkowej oraz blokadą cyklu komórkowego. Zmiany te zaobserwowano w komórkach nietraktowanych oraz traktowanych VIN. Wskazuje to, że HCQ nie jest związkiem senolitycznym. Ponadto, zaobserwowano, że pod wpływem inhibicji autofagii dochodzi do ucieczki od starzenia, a hipoksja przyspieszyła generację komórek potomnych. Generacja komórek była najprawdopodobniej wynikiem podziałów amitotycznych. Zmianom tym towarzyszyło zahamowanie przepływu autofagicznego, wzmożona aktywność lizosomalna oraz zwiększona sekrecja SASP. Ponadto, analizy NGS pozwoliły na wytypowanie 67 genów, których ekspresja różniła się między normoksją, a hipoksją w komórkach uciekających od starzenia. Geny te mogą odgrywać kluczową rolę w regulacji procesu generacji komórek potomnych.

Eksperymenty na mysim modelu syngenicznym wykazały, że przy użyciu chemioterapii można skutecznie indukować starzenie *in vivo*. Analizy molekularne wykazały, że zahamowanie autofagii przy użyciu HCQ, w perspektywie krótkotrwałej terapii nie wpływa na wzrost guza oraz ekspresję markerów tranzycji epithelialno-mezenchymalnej, macierzystości, odpowiedzi immunologicznej oraz hipoksji. Zastosowanie HCQ promowało jednak produkcję IL-8 i osteopontyny w guzach, co korelowało z obniżeniem ekspresji inhibitora cyklu komórkowego, p16 oraz wyższą ekspresją białka odpowiedzi antyoksydacyjnej, GpX1. Zmiany te sugerują, że inhibicja autofagii mogła przyczynić się do ucieczki od starzenia *in vivo*. Wyniki te wymagają jednak potwierdzenia w eksperymentach na większych grupach badawczych.

Podsumowując komórki raka nerki ulegają starzeniu komórkowemu pod wpływem działania leków cytotoksycznych, niezależnie od warunków tlenowych.

Zahamowanie późnej autofagii prowadzi do ucieczki od starzenia, a hipoksja przyspiesza generację komórek potomnych. Wyniki te wskazują, że inhibicja autofagii może mieć negatywny skutek w terapiach długoterminowych, wymaga to jednak potwierdzenia w dalszych badaniach.

#### **4. Abstract**

A Renal cell carcinomas (RCCs) account for approximately 90% of all renal cancers. In 90% of RCC cases, there is a lack of functionality of the pVHL protein, a negative regulator of hypoxia inducible factors (HIF). Its absence leads to a state of pseudohypoxia. Since RCCs show a poor response to most standard systemic therapies, there is a strong need for the development of new therapeutic strategies. It is suspected that cancer cells that have developed an aging phenotype in response to therapy (therapy-induced senescence, TIS) may be responsible for the development of chemoresistance. TIS cells are irreversibly inhibited in the cell cycle and show characteristic morphological, biochemical, and molecular changes. TIS cells, despite the irreversible blockade of the cell cycle, are capable of generating daughter cells. It is suspected that autophagy may play an important role in the survival of old cells, as well as in the activation of their division. Its modulation seems to be a promising strategy in senolytic therapies. Therefore, this study aimed to determine whether the inhibition of autophagy would sensitize old renal cell carcinoma cells to cell death induction and/or affect the resumption of their proliferative potential and production of daughter cells under normoxic and hypoxic conditions.

In the first part of the experiment, human renal cell carcinoma cells with mutated pVHL and mouse cells with normal pVHL were treated with chemotherapeutics under normoxic (~19% O<sub>2</sub>) and hypoxic (1% O<sub>2</sub>) conditions. For the induction of senescence, a drug that blocks the mitotic division - vinblastine, and drugs with genotoxic properties - gemcitabine and 5-fluorouracil were used. When the experiments were completed, analyses of senescence markers expression were performed.

It has been shown that vinblastine has the strongest dose-dependent pro-senescence effect in kidney cancer cells, and its effect is independent of hypoxia when pVHL is mutated. Under the influence of treatment, most of the cells in the culture expressed activity of SA- $\beta$ -Galactosidase and secreted SASP factors. Accumulations of enlarged, granular and polyploid cells were also observed in the cultures. The cells showed lower proliferation associated with cell cycle blockade. The induction of senescence was confirmed by significantly higher expression of p21 and p53 proteins. NGS analyses confirmed that DNA replication and cytokinesis are blocked as a result of senescence induction. In addition, NGS analyses have shown that in senescent cells, pathways related to neuronal development: axon guidance and neuroactive ligand-

receptor interaction were activated, which induction has not been described in context of senescence induction before.

In the second stage of the research, experiments were carried out to assess the effect of early and late autophagy inhibition in cells undergoing TIS. Early autophagy was inhibited in the cells before exposure to VIN and 5-FU. To this end, single genes encoding the ATG5, ATG7, Becn1, and ULK1 proteins were silenced in human kidney cancer cells by siRNA. The analysis showed that the inhibition of early autophagy does not significantly affect the induction of aging. In turn, pharmacological inhibition of late autophagy with HCQ was associated with the induction of cell death and blockade of the cell cycle. These changes were observed in untreated and VIN-treated cells. This indicates that HCQ is not a senolytic compound. In addition, it was observed that under the influence of autophagy inhibition, there is an escape from senescence, and hypoxia accelerated the generation of daughter cells. Cells generation was most likely the result of amitotic divisions. These changes were accompanied by the inhibition of autophagic flow, increased lysosomal activity, and increased SASP secretion. In addition, NGS analyses identified 67 genes whose expression differed between normoxia and hypoxia in cells escaping senescence. These genes may play a key role in regulating the generation of daughter cells. Experiments in a syngeneic mouse model have shown that aging can be effectively induced using chemotherapy *in vivo*. Molecular analyzes have shown that inhibition of autophagy with HCQ, in the perspective of short-term therapy, does not affect tumor growth and the expression of markers of epithelial-mesenchymal transition, stemness, immune response, and hypoxia. However, the use of HCQ promoted the production of IL-8 and osteopontin in tumors, which correlated with a decrease in the expression of the cell cycle inhibitor, p16, and a higher expression of the antioxidant response protein, GpX1. These changes suggest that the inhibition of autophagy may have contributed to escape from senescence *in vivo*. These results, however, require confirmation in experiments on larger research groups.

In conclusion, kidney cancer cells undergo cellular senescence under the influence of cytotoxic drugs, regardless of aerobic conditions. Inhibition of late autophagy leads to escape from aging, and hypoxia accelerates the generation of daughter cells. These results indicate that the inhibition of autophagy may have a negative effect in long-term therapies, but this needs to be confirmed in further studies.

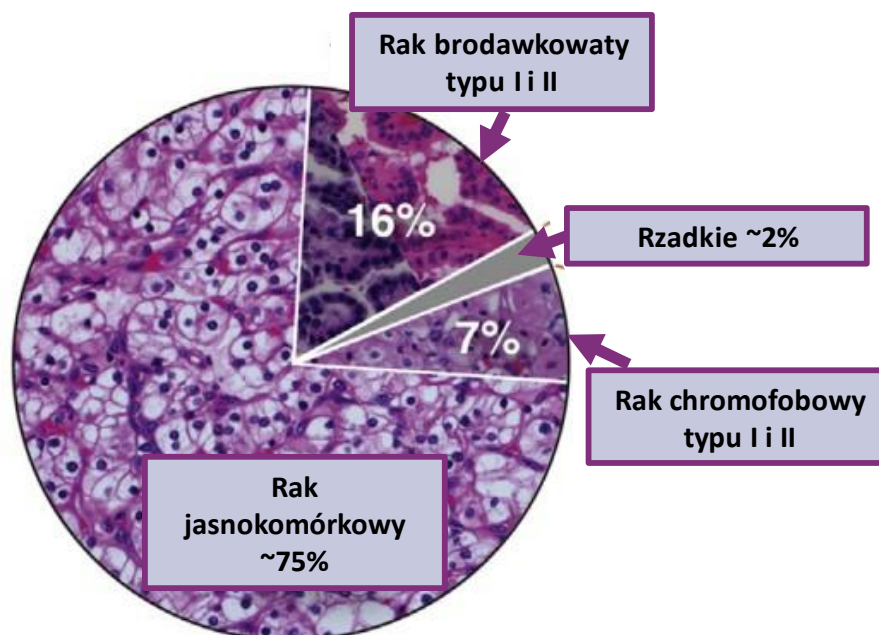
## 5. Wstęp teoretyczny

### 5.1. Rak nerki

#### 5.1.1. Definicja i epidemiologia

Najczęściej występującym rodzajem raka nerek, stanowiącym 90% wszystkich przypadków, jest rak nerkowokomórkowy (ang. Renal Cell Carcinoma, RCC). RCC powstaje z komórek epitelialnych tworzących kanaliki nerkowe. Raki nerkowokomórkowe wykazują się wysoką heterogennością histologiczną i morfologiczną [1-3].

RCC diagnozuje się u około 2% populacji światowej, gdzie występowanie tego typu nowotworów zwiększa się z każdym rokiem [4]. Najczęściej występującym i najbardziej agresywnym podtypem jest rak jasnokomórkowy nerek (ang. ccRCC, Clear Cell Renal Carcinoma), który stanowi ok 70-75% wszystkich diagnozowanych przypadków RCC [2, 5]. Rzadziej występującymi typami raka nerki są rak brodawkowaty (10-16% przypadków) i rak chromofobowy (5-7%). Pozostałe ok. 2% przypadków stanowią rzadkie typy nowotworów nerki, takie jak rak kanalików zbiorczych, raki translokacyjne oraz rak rdzeniasty (Fig.1) [6].



**Figura 1. Wykres kołowy przedstawiający rozkład najczęściej występujących histologicznych podtypów raka nerki.**

Wykres zmodyfikowany na podstawie Shuch B, Amin A, Armstrong AJ, Eble JN, Ficarra V, Lopez-Beltran A, Martignoni G, Rini BI, Kutikov A. Understanding pathologic variants of renal cell carcinoma: distilling therapeutic opportunities from biologic complexity. Eur Urol. 2015 Jan;67(1):85-97.

Statystyka 5-letniego okresu przeżycia jest w głównej mierze zależna od stopnia zaawansowania choroby w momencie jej diagnozy. Guzy wykryte we wczesnych stadiach rozwoju stanowią ok. 2/3 wszystkich przypadków, a przeżywalność dla tych pacjentów wynosi około 92%. W przypadkach guzów przerzutujących odsetek ten spada do około 12%. Całkowity odsetek 5-letniego przeżycia pacjentów z RCC stanowi ok. 75% [7-9].

RCC diagnozowane są najczęściej u ludzi w przedziale wiekowym 50-70 lat, a ryzyko ich występowania wzrasta wraz z wiekiem. RCC występuje średnio 2 razy częściej u mężczyzn niż u kobiet [10]. Wśród czynników ryzyka zwiększających prawdopodobieństwo rozwinięcia się nie-dziedzicznej formy RCC wymienia się palenie, otyłość oraz nadciśnienie tętnicze. Nie-dziedziczne RCC stanowią ok 96% wszystkich diagnozowanych guzów [5]. Pozostałe 4% przypadków RCC są spowodowane chorobami dziedzicznymi takimi jak choroba von Hippel-Lindau'a (ang. Von Hippel-Lindau syndrome, VHL), dziedziczne mięśniaki gładkokomórkowe i rak nerkowokomórkowy (ang. Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer, HLRCC), syndrom Birt-Hogg-Dubé (ang. Birt-Hogg-Dubé syndrome, BHD) oraz dziedzicznego raka papilarnego nerki (ang. Hereditary Papillary Renal Cancer, HPRC) [5, 11].

## **5.2. Mikrośrodowisko guzów nerki**

Mikrośrodowisko guza (ang. Tumor microenvironment, TME) jest wysoce niejednorodnym i zmiennym systemem składającym się z niezłośliwych komórek takich jak fibroblasty, komórki układu odpornościowego, naczyń krwionośnych oraz składników macierzy zewnątrzkomórkowej. Interakcje pomiędzy komponentami TME determinują progresję nowotworu poprzez regulację procesów wzrostu, uśpienia i inwazji guza, oraz powstawania przerzutów. Komórki nowotworowe mogą bezpośrednio wpływać na TME poprzez wydzielanie czynników wzrostu oraz cytokin. Ich pośrednie działanie na mikrośrodowisko opiera się na rozwoju przewlekłego niedotlenienia, inaczej nazywanego hipoksją, wynikającego z nadmiernej proliferacji komórek nowotworowych. Może to prowadzić do rozwoju nekrozy. Nekroza jest rodzajem śmierci komórkowej, która w odróżnieniu od apoptozy promuje rozwój ostrego stanu zapalnego. W efekcie tego do TME rekrutowane są komórki niezłośliwe takie jak komórki śródbłonna, perycyty, czy komórki układu odpornościowego.

Komórki nowotworowe mogą też aktywnie wpływać na skład macierzy zewnątrzkomórkowej, przyczyniając się przy tym do generacji przerzutów [12, 13].

W 90% przypadków RCC obserwuje się bialleliczną utratę białka pVHL (ang. VON Hippel Lindau protein), białka supresorowego, które działa jako negatywny regulator czynników odpowiedzi hipoksyjnej (ang. hypoxia inducible factors, HIFs). Akumulacja HIF prowadzi do aktywacji komórkowej odpowiedzi na hipoksję, w efekcie której dochodzi do aktywacji angiogenezy, glikolizy i nieprawidłowego metabolizmu kwasów tłuszczowych, co przyczynia się do powstania charakterystycznych dla RCC złogów cytoplazmatycznych bogatych w glikogen i lipidy oraz hiperunaczynienia [14-16].

W porównaniu do innych nowotworów pochodzenia epitelialnego ccRCC charakteryzuje najwyższy stopień angiogenezy. Angiogeneza to wzrost nowych naczyń krwionośnych z istniejącego układu naczyniowego. Jest ona fizjologicznym procesem, który reguluje dostarczanie tlenu i składników odżywczych do komórek i tkanek. Prawidłowa angiogeneza wymaga utrzymania stabilnej równowagi pomiędzy czynnikami pro- i antyangiogennymi. Zachwianie równowagi pomiędzy tymi czynnikami wpływa na rozwój patologicznej angiogenezy, która przyczynia się do wzrostu i progresji guza. Głównym czynnikiem regulującym angiogenezę w TME jest niedotlenienie. Nadekspresja czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. vascular endothelial growth factor, VEGF) oraz płytkopochodnego czynnika wzrostu (ang. platelet derived growth factor, PDGF) uznawane są za główne sygnały dla rozwoju patologicznej angiogenezy. Receptory czynników pro-angiogennych również ulegają nadekspresji na powierzchni komórek w guzie. Komórki śródbłonna i komórki nowotworowe odgrywają kluczową rolę w stymulowaniu angiogenezy poprzez aktywację szlaków sygnałowych kinazy RAS/RAF/MEK/ERK i kinazy PI3/AKT/mTOR, co prowadzi do zwiększonej proliferacji, a także do kontynuacji wzmoczonej produkcji cytokin angiogennych i zapalnych. [12, 17].

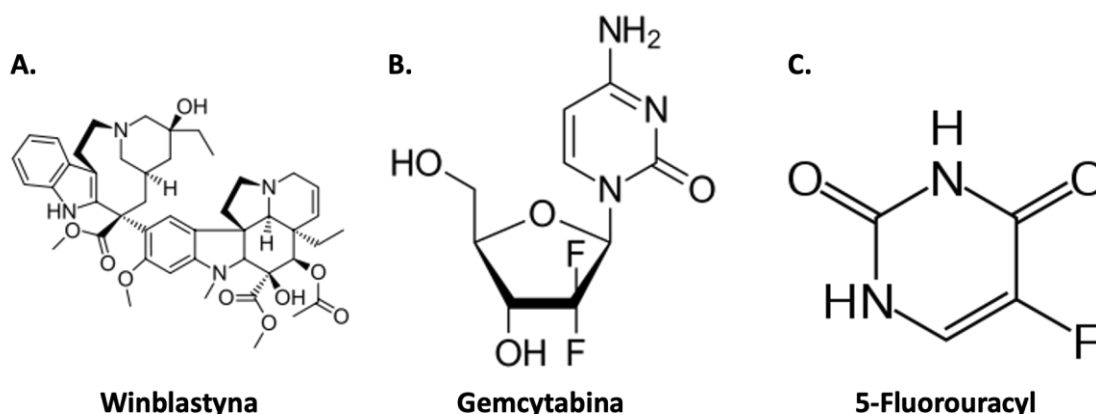
Guzy RCC są wysoko immunogennymi guzami [12, 18]. Niedotlenienie guza promuje miejscową supresję immunologiczną [19]. W RCC obserwuje się wysoką liczbę cytotoksycznych limfocytów T CD8+ (ang. cytotoxic T cell CD8+, T CD8+), limfocytów T pomocniczych typu 1 (ang. T helper cells type 1, Th1), komórek dendrytycznych, neutrofilii i komórek cytotoksycznych oraz stosunkowo niskie populacje limfocytów pomocniczych typu 2 (ang. T helper cells, Th2) i limfocytów T regulatorowych (ang. regulatory T cells, Treg), co sugeruje ogólny prozapalny profil

tych guzów [20, 21]. Należy jednak podkreślić, że wśród ccRCC obserwuje się wysoką heterogeniczność, gdzie poszczególne podgrupy, różnią się zarówno aktywnością programów angiogenezy, jak i wzorcami infiltracji immunologicznej. Wpływa to na skuteczność stosowanej terapii. Guzy o wysokim wskaźniku rekrutacji komórek układu immunologicznego uważa się za bardziej złośliwe niż guzy wysoce angiogenne. Szczególnie złośliwe wydają się być guzy o wysokim poziomie nacieku komórek T CD8+ [14].

### 5.3. Leczenie raka nerki

Ingerencja chirurgiczna jest preferowaną formą terapii guzów wykrytych we wczesnych stadiach. W zależności od lokalizacji i wielkości guza przeprowadzane są nefrektomie cytoredukcyjne lub radykalne [3, 22]. Nefrektomie rzadziej przeprowadza się u pacjentów, u których wykryto przerzuty (ang. metastatic RCC, mRCC) [3]. Mimo wysokiego potencjału terapeutycznego nefrektomii, u około 20-40% pacjentów z biegiem czasu obserwuje się wznowę choroby [23]. Szczególnie duże wyzwanie stanowi terapia mRCC, które przez wiele lat uważane były za praktycznie nieuleczalne. Jest to związane z ich wysoką opornością na leczenie genotoksyczne, szczególnie chemioterapię [24, 25].

W terapii raka nerki badanymi lekami cytotoksycznymi były alkaloidy barwinka różyczkowego (ang. Vinca alkaloids), Gemcytabina (ang. Gemcitabine, GEM) oraz pochodne fluoropirymidyny [26].



**Figura 2. Wzory strukturalne leków cytotoksycznych stosowanych w leczeniu RCC.**

**A.** Wzór strukturalny Winblastyny (Źródło: <https://pl.wikipedia.org/wiki/Winblastyna>); **B.** Wzór strukturalny Gemcytabiny (Źródło: <https://pl.wikipedia.org/wiki/Gemcytabina>); **C.** Wzór strukturalny 5-Fluorouracylu (Źródło: <https://pl.wikipedia.org/wiki/5-Fluorouracyl>).

Spośród alkaloidów barwinka różyczkowego w raku nerki najczęściej wspominana jest winblastyna (ang. Vinblastine, VIN) (Fig. 2A). Jej działanie opiera się



na wiązaniu tubuliny, co w efekcie hamuje powstawanie mikrotubul i uniemożliwia wytworzenie wrzeciona podziałowego. W konsekwencji komórki zostają zahamowane w cyklu komórkowym w fazie mitozy. Ponadto, VIN blokuje syntezę aminokwasów poprzez hamowanie działania kwasu glutaminowego. Zapobiega też syntezie puryn i mocznika, oraz blokuje cykl Krebsa [26-28].

GEM (Fig. 2B) jest analogiem cytydyny. Ulega dwuetapowej fosforylacji do czynnego metabolitu, trifosforanu gemcytabiny (ang. gemcitabine triphosphate, dFdCTP), który włącza się do syntezującego się łańcucha DNA. dFdCTP inkorporuje do DNA podczas jego syntezy. Prowadzi to do zahamowania elongacji DNA. Dodatkowo GEM może hamować działanie enzymu reduktazy rybonukleotydowej, uczestniczącego w syntezie deoksyrybonukleotydów [29].

Do grupy pochodnych fluoropirymidyn badanych w raku nerki zalicza się 5-fluorouracyl (ang. 5-Fluorouracil, 5-FU) (Fig. 2C). 5-FU jest pochodną uracylu, zasady pirymidynowej, który w komórkach ssaczych przekształca się w aktywne metabolity:

- 1) Monofosforan fluorodezoksyurydyny (ang. Fluorodeoxyuridine monophosphate, FdUMP),
- 2) Trifosforan fluorodezoksyurydyny (ang. Fluorodeoxyuridine triphosphate, FdUTP),
- 3) Trifosforan fluorourydyny (ang. Fluoruridine triphosphate, FUTP).

Cytotoksyczne działanie 5-FU opiera się na hamowaniu syntazy tymidylanowej (ang. thymidylate synthase, TS). FdUMP tworzy stabilny kompleks z TS, a tym samym hamuje wytwarzanie monofosforanu dezoksytymidyny (ang. deoxythymidine monophosphate, dTMP), który jest niezbędny do naprawy i replikacji DNA. Niedobór TS powoduje zatrzymanie widełek replikacyjnych i niedokończenie powielenia informacji DNA, co w konsekwencji powoduje zatrzymanie komórek w fazie S. FdUMP inkorporuje do DNA w trakcie jego syntezy. Zarówno FdUMP jak i FdUTP indukują uszkodzenia DNA. FUTP może też inkorporować do RNA zmieniając jego funkcję i przetwarzanie [30-32].

Badania kliniczne wykazały, że żaden lek cytotoksyczny stosowany w monoterapii nie charakteryzuje się zadowalającą skutecznością w leczeniu zaawansowanego raka nerki [33]. Niską efektywność zaobserwowano też przy stosowaniu terapii kombinowanej z wykorzystaniem GEM i 5-FU [26]. Tylko w nielicznych przypadkach zaobserwowano zmniejszenie wielkości guza lub zahamowanie jego wzrostu [34]. Obecnie chemioterapia cytotoksyczna

rekomendowana jest do leczenia tylko niektórych podtypów RCC w tym mięsakoraków oraz guzów wywodzących się z kanalików zbiorczych. Nie jest to jednak leczenie proponowane w pierwszej linii terapii [26].

Do 2005 roku jedynymi opcjami systematycznego leczenia mRCC pozostawała nieskuteczna terapia związkami cytotoksycznymi lub wysoce toksyczna terapia cytokinami: interferonem alfa-2b oraz interleukiną 2 [35, 36]. RCC są guzami wysoce unaczynionymi i immunogennymi. Hamowanie tworzenia naczyń przez terapie antyangiogenne, a także stymulacja układu odpornościowego przez immunoterapię okazały się być skuteczne w terapii RCC. [12, 18]. Obecnie rekomendowane jest leczenie z wykorzystaniem inhibitorów kinazy tyrozynowej VEGF (ang. VEGF Receptor Tyrosine Kinase inhibitors, VEG-TKI) takich jak Pazopanib, Sunitinib oraz Axitinib oraz inhibitorów immunologicznego punktu kontrolnego (ang. Immune Checkpoints inhibitors, ICI). Wśród ICI stosuje się leki skierowane przeciwko receptorowi programowanej śmierci komórkowej (ang. Programmed Death Receptor 1, PD-1), np. Nivolumab czy Pembrolizumab, oraz jego ligandowi (ang. Programmed Death Receptor 1 Ligand, PDL-1) np. Avelumab oraz. Ponadto stosuje się Ipilimumab, związek celujący w białko CTLA-4 (ang. cytotoxic T cell antigen 4) [37-39]. Mimo o wiele wyższej skuteczności terapii nowej generacji w porównaniu do terapii cytotoksycznych, u 20-25% pacjentów występuje oporność na ich działania [24]. U pacjentów często obserwuje się też nawrót choroby [40].

#### **5.4. Hipoksja**

Niedotlenienie w guzach jest wynikiem zaburzenia gospodarki pomiędzy dostarczaniem, a zużyciem tlenu [41]. Guzy nerki charakteryzują się wysoką heterogennością o niejednorodnym przepływie krwi. Powstawanie nowych, ale wadliwych i nieszczelnych, naczyń krwionośnych, oraz duże rozmiary guzów wynikające z niekontrolowanej proliferacji komórek nowotworowych prowadzą do powstania przewlekłego niedotlenienia, zwanego także hipoksją. Jest to patologiczny fenomen polegający na nie-fizjologicznym obniżeniu poziomu tlenu ( $O_2$ ) w tkance do ok. 1%. W guzach nerki poziom  $O_2$  spada do 1.3% [39, 42].

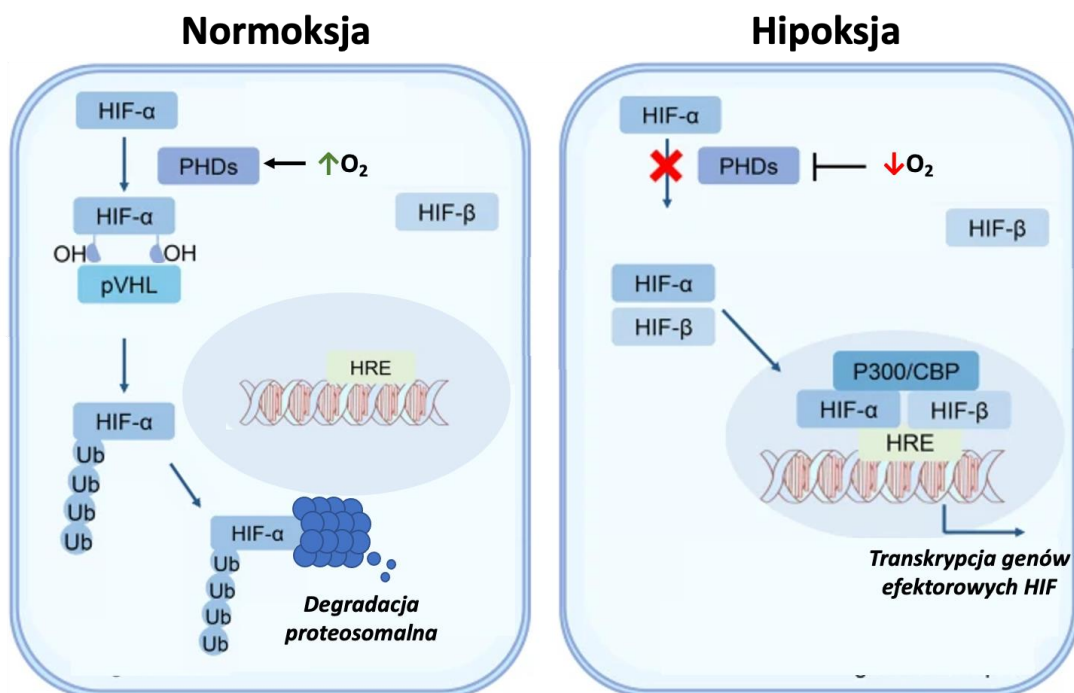
Hipoksja jest istotnym czynnikiem prognostycznym w nowotworach nerek, wpływającym zarówno na chemooporność na poziomie molekularnym, jak i poprzez wpływ na mikrośrodowisko guza. Powoduje również większą heterogenność i

plastyczność guzów, sprzyjając rozwojowi bardziej agresywnego i przerzutowego fenotypu [43].

#### **5.4.1. Molekularne mechanizmy odpowiedzi na hipoksję**

W wyniku niedotlenienia w komórkach dochodzi do aktywacji szlaku odpowiedzi na hipoksję, za którego regulację odpowiada stabilizacja ekspresji białek należących do rodziny czynników indukowanych hipoksją (Fig. 3). Do rodziny tej zaliczane są trzy czynniki HIF-1, HIF-2 oraz HIF-3. Na białko HIF-1 składają się dwie podjednostki:  $\alpha$  i  $\beta$ . Dla czynników HIF-2 i HIF-3 obserwowana jest tylko podjednostka  $\alpha$  [44, 45]. Posiadają one domeny degradacji białka zależnego od tlenu z dwoma miejscami hydroksylacji. W warunkach fizjologicznego stężenia tlenu HIF- $\alpha$  ulega hydroksylacji kontrolowanej przez białka z rodziny hydroksylaz proliny (ang. Proline Hydroxylase Family, PHD). Aktywność enzymatyczna PHD wymaga obecności tlenu, żelaza oraz 2-okso-glutaranu. Hydroksylowane białko HIF- $\alpha$  wchodzi w interakcję z białkiem VHL, w wyniku której dochodzi do jego poliubikwitynacji i degradacji [44-46].

W warunkach niedotlenienia aktywność PHD jest zahamowana. Białko HIF- $\alpha$  wchodzi w interakcję z białkiem HIF- $\beta$ , które ulega stałej ekspresji niezależnie od hipoksji, tworząc przy tym aktywny kompleks transkrypcyjny. Dimer HIF- $\alpha$ / HIF- $\beta$  zdolny jest do translokacji do jądra komórkowego, gdzie wiąże się z elementami reagującymi na niedotlenienie (ang. Hypoxia Response Elements, HREs), będącymi elementami sekwencji proksymalnych promotrów wybranych genów docelowych, aktywując ich ekspresję [44-46].



**Figura 3. Szlak sygnałowy odpowiedzi na hipoksję.**

Zmodyfikowano na podstawie Luo, Z., Tian, M., Yang, G. et al. Hypoxia signaling in human health and diseases: implications and prospects for therapeutics. *Sig Transduct Target Ther* 7, 218 (2022).

Izoformy HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$  wykazują się wysoką homologią [46]. HIF-1 $\alpha$  ulega ekspresji we wszystkich analizowanych tkankach i typach nowotworów, gdy izoforma HIF-2 $\alpha$  ulega ekspresji głównie w komórkach śródbłonna nerek, płuc i wątroby. Co więcej HIF-1 $\alpha$  został zidentyfikowany jako czynnik odpowiedzi na hipoksję nagłą, krótkotrwałą. HIF-2 $\alpha$  związany jest z głównie z odpowiedzią na hipoksję przewlekłą. Ponadto wydaje się, że HIF-2 jest bardziej znaczącym czynnikiem powodującym powstawanie nowotworów RCC [47-49].

Szlak HIF reguluje ekspresję genów związanych z procesami angiogenezy, metabolizmu, proliferacji i wzrostu komórek, autofagii, reakcji redoks, odpowiedzi immunologicznej i stanu zapalnego, oraz inwazji i migracji. Promuje również rozwój fenotypu macierzystego i aktywuje szlaki apoptozy: pyroptozy, nekroptozy i ferroptozy, co prowadzi do indukcji śmierci komórkowej [44, 46-48, 50].

### 5.5. Chemooporność

Chemooporność jest jednym z głównych czynników wpływających na skuteczność leczenia oraz szanse na przeżycie pacjentów. Jednym z głównych czynników przyczyniających się do rozwoju chemooporności jest hipoksja [51].

Hipoksja prowadzi do zachwiania równowagi produkcji czynników pro – i antyangiogennych, przyczyniając się do powstawania naczyń krwionośnych o patologicznej budowie i funkcjonalności, które nie zapewniają odpowiedniego przepływu krwi w tkance. Nieprawidłowości w unaczynieniu przyczyniają się do szybszego wzrostu guza oraz ograniczają przenikalność leków do zmienionej chorobowo tkanki. Niedotlenienie może też wpływać negatywnie na skuteczność działania leków cytotoksycznych oraz radioterapii wymagających obecności O<sub>2</sub> [42, 52]. Hipoksja prowadzi też do nadekspresji genów związanych opornością wielolekową [43]. W RCC zaobserwowano podwyższoną ekspresję takich białek jak MDR1 (ang. multidrug resistance 1, MDR1) [53], P-gp (ang. P-glycoprotein, P-gp) [54] oraz białek ABC (ang. ATP-binding cassette, ABC) [55]. Badania nad skutecznością antagonistów P-gp wykazały jednak, że zahamowanie aktywności tego białka nie wpływa na skuteczność terapii oraz nie zmniejsza oporności guzów nerki na leczenie. Wskazuje to na zaangażowanie innych mechanizmów promujących chemooporność [56, 57].

Hipoksja promuje glikolizę oraz produkcję kwasu mlekowego prowadząc przy tym do zakwaszenia środowiska guza [43]. Obniżenia zewnątrzkomórkowego pH wpływa na niszę immunologiczną, prowadząc do rozwoju stanu zapalnego, deregulacji odpowiedzi immunologicznej nabytej oraz wrodzonej, a także na rekrutację komórek odpornościowych [58]. W takich warunkach obserwuje się zahamowanie proliferacji, aktywacji i cytotoksyczności limfocytów T [59]. Ponadto hipoksja przyczynia się do wytracania przez komórki nowotworowe cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej klasy I (ang. major histocompatibility complex class I, MHC-I) co ogranicza ich interakcje z limfocytami T oraz komórkami NK (ang. Natural Killer cells) [60, 61].

Hipoksja ma działanie selekcyjne. Jako czynnik stresogenny, w większości komórek indukuje śmierć komórkową. Długotrwała ekspozycja na niedotlenienie może jednak aktywizować procesy chroniące komórki przed śmiercią. W konsekwencji, dochodzi do selekcji komórek o wysokiej adaptacji do niedotlenienia i oporności na indukcję śmierci komórkowej [42]. Ponadto hipoksja może indukować chemooporność wrodzoną poprzez selekcję komórek o fenotypie podobnym do macierzystego charakteryzujących się wyższą opornością na terapię [62].

Jednym z mechanizmów chroniących komórki przed śmiercią w hipoksji jest zahamowanie wzrostu i/lub spowolniona proliferacja. Ogranicza to efektywność terapii cytotoksycznych działających w aktywnie dzielących się komórkach [42].

Zahamowanie cyklu komórkowego jest cechą charakterystyczną starych komórek nowotworowych. Do tej pory uważało się, że hipoksja chroni komórki przed starzeniem [42]. Istnieją jednak dowody, które wskazują, że komórki narażone na przewlekłą hipoksję mogą rozwijać fenotyp starzeniowy w wyniku akumulacji uszkodzeń DNA i stresu replikacyjnego [48, 63]. Ponadto, stabilna aktywność HIF-1 $\alpha$  przyczynia się do podtrzymania tego fenotypu *in vitro* zarówno w hipoksji jak i w normoksji [51].

Jednym z kluczowych mechanizmów związanych z chemoodpornością jest też starzenie komórkowe [51]. Indukcja starzenia jest mechanizmem obronnym chroniącym komórki przed śmiercią komórkową aktywowaną przez działanie np. chemioterapii [64]. Mimo, że starzenie komórkowe przyczynia się do zahamowania proliferacji komórek nowotworowych, najnowsze badania wykazały, że obecność takich komórek w guzie zmniejsza szansę na przeżycie pacjentów [65], w tym chorych na RCC [66]. Stare komórki nowotworowe mogą promować progresję i wznowę choroby nowotworowej, jednak mechanizmy za to odpowiedzialne nadal nie są jasne [67]. Dlatego kluczowym jest prowadzenie badań nad zrozumieniem roli starzenia komórkowego w rozwoju chemooporności i wznowy RCC, z uwzględnieniem hipoksji, jako jednego ze zjawisk naturalnie występujących w guzach nowotworowych [68-71].

## **5.6. Starzenie komórkowe**

Ogólna definicja raka opisuje go jako chorobę niekontrolowanej proliferacji komórkowej. Napędzana jest przez takie procesy jak indukcja trwałej sygnalizacji proliferacyjnej, unikanie sygnałów hamujących wzrost komórkowy oraz odporność na indukcję śmierci komórkowej [72-74]. Gdyby rak był tylko chorobą polegającą na niekontrolowanej proliferacji, można by przypuszczać, że wszystkie schematy chemio – i radioterapii, ukierunkowane na komórki aktywnie proliferujące, skutecznie eliminowałyby zmiany nowotworowe. W rzeczywistości jednak u pacjentów często obserwuje się oporność na tego typu terapie. To z jakiego powodu terapie są nieskuteczne zależy od rodzaju leczenia, typu guza oraz jego tła genetycznego. [75, 76].

Zahamowanie proliferacji wydaje się być strategią adaptacyjną, którą komórki nowotworowe stosują w odpowiedzi na czynniki stresowe. Ponadto, komórki te mogą być przyczyną opóźnionego nawrotu choroby [75, 77]. Starzeniem komórkowym określa się stan, w którym progresja cyklu komórkowego jest trwale zahamowana przy równoczesnym zachowaniu aktywności metabolicznej komórek. Starzenie jest jednym z mechanizmów odpowiedzi komórek na czynniki stresowe powodujące uszkodzenia

DNA, chroniąc je przed śmiercią komórkową. Komórki stare nie ulegają apoptozie przez co są stale obecne w tkance, wpływając na biologię swojego otoczenia. Starzenie jest procesem wysoce heterogennym, wpływającym na wiele aspektów fizjologicznych i patologicznych w tym gojenie się ran, starzenie organizmu, a także nowotworzenie [78, 79]. Zwiększenie naszej wiedzy na temat tej fazy choroby może wyjaśnić nowe paradygmaty leczenia pacjentów, z potencjałem zapobiegania wznowy, przytłaczającemu czynnikowi śmiertelności nowotworów.

### **5.6.1. Starzenie replikacyjne**

Replikacyjne starzenie komórkowe po raz pierwszy zostało opisane przez Leonarda Hayflicka w latach 60-tych XX wieku, stwierdzając, że komórki somatyczne mają ograniczoną zdolność do podziałów komórkowych [80, 81]. Dzisiaj wiemy, że główną rolę w tym procesie odgrywa degradacja telomerów. Telomery to powtarzalne tandemowo sekwencje nukleotydów znajdujące się na końcach chromosomów. Telomery chronią chromosomy przed działaniem nukleaz oraz niespecyficzną fuzją ramion chromosomalnych w czasie podziałów komórkowych. Z każdym podziałem sekwencje telomerów skracają się [82]. Po osiągnięciu krytycznej długości telomerów w komórkach dochodzi do nieodwracalnego zahamowania proliferacji [83]. Telomery mogą także ulegać uszkodzeniom i degradacji na skutek działania czynników stresogennych, np. pod wpływem działania stresu oksydacyjnego [84].

W komórkach somatycznych potencjał proliferacyjny jest ściśle ograniczony, a komórki wchodzą w stadium starzenia po przejściu około 50-70 podziałów [85]. Z kolei komórki nowotworowe, podobnie jak komórki macierzyste, nie mają limitu replikacyjnego [73, 86, 87]. Telomeraza jest enzymem odpowiadającym za odbudowę sekwencji telomerów poprzez dołączanie do niej tandemowych sekwencji kwasów nukleinowych bogatych w guaninę [85]. Wykazano, że 90% nowotworów charakteryzuje się wysoką aktywnością telomerazy, która wpływa na odbudowę telomerów [88, 89]. Udowodniono jednak, że komórki nowotworowe mogą przedwcześnie ulegać starzeniu, niezależnie od limitu replikacyjnego.

### **5.6.2. Starzenie niezależne od limitu replikacyjnego**

W komórkach somatycznych oraz nowotworowych przedwczesna indukcja procesu starzenia jest jednym z mechanizmów odpowiedzi komórek na czynniki stresowe (ang. Stress Induced Premature Senescence, SIPS) powodujących uszkodzenia

DNA i aktywacji odpowiedzi na jego uszkodzenia (ang. DNA Damage Response, DDR). Niezależnie od rodzaju czynników, efektem ich działania jest zahamowanie proliferacji i indukcja istotnych, heterogenicznych zmian morfologicznych w komórkach, co w efekcie chroni je przed indukcją śmierci komórkowej. Wśród SIPS wyróżnia się Starzenie komórkowe aktywowane onkogenami (ang. Oncogene Induced Senescence, OIS) oraz starzenie indukowane terapią (ang. Therapy Induced Senescence, TIS) [90-92].

OIS jest kompleksowym mechanizmem aktywowanym w odpowiedzi na stres wywołany aktywacją onkogeną [93]. inicjacja OIS następuje w wyniku mutacji takich onkogenów jak *Ras*, *cyklina E*, *BRAF* czy *E2F1*. Nadekspresja onkogenów prowadzi do aktywacji takich białek jak p53 i p16, będących bezpośrednimi regulatorami inicjacji starzenia. Ponadto OIS może być aktywowane w wyniku zahamowania aktywacji genów supresorowych takich jak *PTEN* czy *NF1* [90].

TIS indukowane jest głównie przez terapie genotoksyczne takie jak chemioterapia, czy radioterapia [92, 94]. Pierwsze doniesienia dotyczące wpływu chemioterapii na indukcję starzenia komórkowego dotyczyły leków takich jak cisplatyna [95] czy doksorubicyna [96]. Do dnia dzisiejszego udowodniono, że efekt ten może być wywoływane przez związki o odmiennych mechanizmach działania, w tym czynniki alkilujące, trucizny mikrotubul, inhibitory kinaz, szlaku mTOR, kinaz CDK4/6 czy inhibitory PARP [97], a także leki o działaniu antyoksydacyjnym [64].

W odpowiedzi na uszkodzenia DNA, niezależnie czy są one wynikiem aktywacji genów onkogennych czy działania czynników genotoksycznych, w komórkach dochodzi do aktywacji DDR. W efekcie tego procesu w komórce dochodzi do blokady cyklu komórkowego, który w zależności od rodzaju stresu, jego nasilenia oraz czasu jego działania, może zakończyć się wznowieniem proliferacji, śmiercią komórkową lub starzeniem (Fig. 4) [98-101].

#### **5.6.2.1. Blokada cyklu komórkowego, a indukcja starzenia**

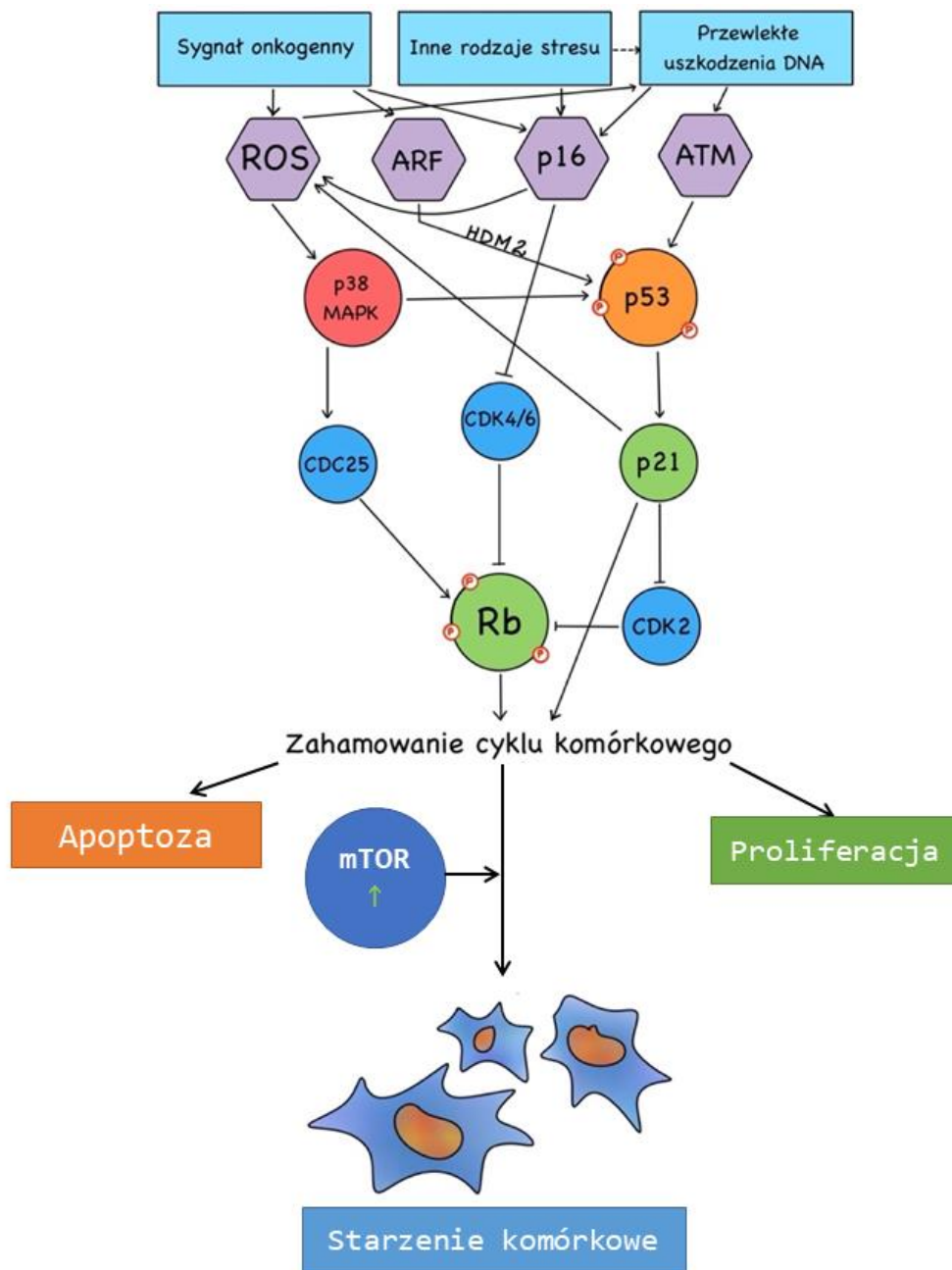
Cyklem komórkowym określa się szereg złożonych zmian biochemicznych oraz biofizycznych, których efektem jest powstanie dwóch komórek potomnych o identycznym materiale genetycznym. Cykl komórkowy podzielony jest na dwie główne fazy: interfazę, w czasie której dochodzi do podwojenia ilości DNA i przygotowanie komórki do podziału, oraz sam podział, czyli mitozę. Progresja cyklu komórkowego



jest zależna od przejścia przez cztery punkty kontrolne: 1) Przejście z fazy G1 do S, 2) Przejście punktu kontrolnego fazy S, 3) przejście z fazy G2 do M oraz 4) przejście przez punkt kontrolny tranzycji z metafazy do anafazy (ang. mitotic spindle checkpoint) w czasie samej mitozy [98, 99, 102]. Zahamowanie progresji komórek w cyklu komórkowym jest kluczowym elementem w indukcji procesu starzenia, który jest aktywowany w odpowiedzi na aktywację DDR [98-101].

Uszkodzenia DNA wykrywane są przez kompleksy białek sensorowych (ang. sensor protein complexes). Kinaza ATM (ang. Ataxia Telangiectasia–Mutated kinase, ATM), jest białkiem rekrutowanym w momencie, kiedy dojdzie do uszkodzenia obu nici DNA (ang. Double strand break, DBS). Do jednoniciowych uszkodzeń aktywowana i rekrutowana jest kinaza ATR (ang. Ataxia Telangiectasia and Rad3-related kinase, ATR). W wyniku aktywacji ATM i ATR dochodzi do fosforylacji i aktywacji białek efektorowych kinaz CHK1 lub CHK2 (ang. checkpoint kinases, CHK). Niezależnie od tego, który mechanizm uległ aktywacji, kaskady uszkodzeń DNA zbiegają się, aktywując białko p53, które następnie inicjuje ekspresję białka p21. Białko p21, należące do rodziny inhibitorów kinaz zależnych od cyklu komórkowego (ang. Cyclin-dependent kinases, CDK) jest niezbędne do inicjacji blokady cyklu komórkowego w fazach G1/S lub G2/M. Blokada cyklu komórkowego następuje na skutek zahamowania fosforylacji białka Rb (ang. Retinoblastoma protein, Rb), które w swojej aktywnej formie aktywuje ekspresję czynnika transkrypcyjnego E2F. E2F jest głównym regulatorem ekspresji białek związanych z syntezą DNA i progresją mitozy. Brak fosforylowanej formy Rb uniemożliwia komórce aktywną proliferację. Promocja starzenia przez aktywację p21 może odbywać się także niezależnie od p53 [91, 99, 103, 104].

Białko p16, tak jak p21 odpowiada za utrzymanie niskiego poziomu aktywności białka pRb, poprzez blokadę kinaz CDK4 i 6. Sama ekspresja p16 jest aktywowana na skutek aktywacji szlaku DDR podobnie jak p53 [98]. Ścieżki p53/p21 i p16/p-Rb wydają się stale oddziaływać na siebie nawzajem, jednak mechanizmy za to odpowiedzialne nie zostały jeszcze do końca poznane. Kiedy szlak p53/p21 odgrywa kluczową rolę w indukcji starzenia, to szlak składający się z białek p16 i p-Rb wydaje się być odpowiedzialny za utrzymanie fenotypu starzeniowego w komórce [103]. Udowodniono, że komórki mogą uniknąć starzenia komórkowego poprzez inaktywację p53 zanim dojdzie do nadekspresji białka p16, w przeciwnym wypadku zmiany komórkowe są nieodwracalne [103, 105].



**Figura 4. Schemat przedstawiający główne szlaki prowadzące do zahamowania cyklu komórkowego.**

Na podstawie Yang J, Liu M, Hong D, Zeng M, Zhang X. The Paradoxical Role of Cellular Senescence in Cancer. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Aug 12;9:722205.

Aktywacja ekspresji onkogenów lub zahamowanie aktywności genów supresorowych obserwowane w OIS może prowadzić do akumulacji uszkodzeń DNA w wyniku stresu replikacyjnego. Udowodniono też, że aktywacji białka Ras towarzyszy podwyższona generacja mitochondrialnych ROS. Zahamowanie cyklu komórkowego na skutek akumulacji reaktywnych form tlenu (ang. Reactive Oxygen Species, ROS) prowadzi do aktywacji białka p53 przez białko PRAK (ang. p38-

regulated/activated protein kinase, PRAK), które aktywowane jest przez kinazę p38/MAPK. Kinaza p38/MAPK może też hamować aktywność pRb poprzez inhibicję cykliny CDC25 [91].

Blagosklonny w swoich badaniach udowodnił, że do indukcji starzenia nie wystarcza zahamowanie cyklu komórkowego, które samo z siebie jest procesem odwracalnym. Pełny fenotyp starzeniowy wykształca się na drodze aktywacji szlaków kinaz mTOR (ang. mammalian Target Of Rapamycin kinase, mTOR) i MAPK (ang. Mitogen-Activated Protein Kinases, MAPK) odpowiadających za regulację wzrostu komórki, w czasie, gdy w komórce doszło już do zahamowania progresji cyklu komórkowego. Proces ten nazywany jest gerokonwersją i prowadzi on do rozwoju hipertrofii [106, 107].

### **5.6.2.2. Fenotyp starzeniowy**

Stare komórki charakteryzują się wysoką heterogennością. Ich fenotyp różni się od komórek normalnych. Nie istnieje jednak jeden specyficzny marker, którego ekspresja potwierdzałaby starzenie komórki. Ponadto, w starzejących się komórkach nie wszystkie cechy fenotypowe muszą ulegać zmianie. W związku z tym w celu prawidłowej identyfikacji starych komórek niezbędna jest walidacja wielu cech morfologicznych, biochemicznych i molekularnych by móc potwierdzić ich fenotyp [104, 108, 109].

Poza nadekspresją p16, p21, p53 oraz spadku fosforylacji białka Rb, związanych z zahamowaniem progresji cyklu komórkowego [110], w starych komórkach obserwuje się też ogniska nieaktywnej transkrypcyjnie heterochromatyny związanych ze starzeniem komórkowym (ang. Senescence Associated Heterochromatin Foci, SAHF). Formowanie SAHF jest efektem aktywacji białek p53 oraz pRb. ich powstanie odbywa się za pośrednictwem działania kompleksu białek opiekuńczych ASF1A (ang. Anti-Silencing Factor 1A, ASF1A1) oraz HIRA (ang. HIstone Regulatory Homolog A). Powstawanie SAHF przyczynia się do wyciszenia genów promujących proliferację, takich jak cyklina A, będąca genem efektorowym czynnika E2F, przyczyniając się do promocji starzenia [64, 79, 111, 112]. inne zmiany w obrębie jąder komórkowych obejmują utratę białka jądrowego włókna pośredniego i modulatora epigenetycznego, laminy B1. Ekspresja laminy B1 jest regulowana przez E2F, a obniżenie jej ekspresji jest bezpośrednim efektem zahamowania aktywności Rb [113, 114].

W wyniku indukcji starzenia komórki przejawiają też charakterystyczne zmiany morfologiczne takie jak zwiększenie wielkości, obserwowane zarówno *in vitro* [115] oraz w tkankach [116]. istotne zwiększenie rozmiaru starych komórek nowotworowych nazywane jest też hipertrofią [110]. Poza zwiększeniem swoich rozmiarów stare komórki charakteryzuje występowanie granularności w cytoplazmie oraz wakuolizacji [110, 117]. Jako granularności komórkowe określa się gęste cząsteczki obecne w cytoplazmie komórkowej, w związku z tym na podwyższoną granularność w starych komórkach nowotworowych przekłada się także akumulacja agregatów białkowych czy pęcherzyków powstających w wyniku egzocytozy. Powstawanie granularności związane jest też z podwyższoną aktywnością lizosomalną starych komórek. Prowadzi to do nagromadzenia się powiększonych lizosomów [118].

Wysoką aktywnością lizosomalną starych komórek odzwierciedla podwyższona ekspresja lizosomalnego enzymu SA- $\beta$ -Galaktozydazy (ang. Senescence Associated  $\beta$  Galactosidase, SA-  $\beta$  -Gal) [104]. Jest to enzym lizosomalny, który w starych komórkach nowotworowych ulega aktywacji w pH=6. Aktywność tego enzymu można oszacować na podstawie barwienia kolorymetrycznego. Oznaczenie to jest powszechnie stosowane do identyfikacji komórek starych [104, 119]. W komórkach starych obserwuje się też nagromadzenie mitochondriów o zmienionym potencjale błonowym i zwiększoną produkcją ROS, fosforylacją oksydacyjną i zużyciem tlenu [120]. Ponadto, komórki stare wyróżnia fenotyp sekrecyjny związany ze starzeniem (ang. Senescence Associated Secretary Phenotype, SASP) [109].

### **5.6.2.3. SASP**

Stare komórki charakteryzują się nadmiernym wydzielaniem prozapalnych cytokin i chemokin, czynników wzrostu, czynników angiogennych i białek z grupy metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. Matrix Metalloproteinases, MMP) zbiorczo nazywanych fenotypem sekrecyjnym SASP [109]. Stare komórki dzięki SASP mogą działać w sposób parakryny lub autokryny na swoje otoczenie [104] Skład SASP jest wysoce heterogenny i w głównej mierze zależy od rodzaju komórki która uległa starzeniu oraz od rodzaju czynnika który doprowadził do indukcji tego procesu [121].

Mechanizmy odpowiedzialne za aktywację SASP są złożone i nadal nie do końca poznane. Jego regulacja zachodzi na poziomie transkrypcji, translacji, stabilności mRNA oraz samej sekrecji. Pewnym jest też, że wzmocnienie sygnału SASP zależne

jest od autokrynnego i parakrynnego pozytywnego sprzężenia zwrotnego. Obecnie za główne mechanizmy molekularne odpowiedzialne za indukcję sekrecji SASP przyjmuje się szlaki aktywowane kompleksami białek NF- $\kappa$ B (ang. nuclear factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) oraz C/EBP- $\beta$  (ang. CCAAT/ enhancer-binding protein- $\beta$ ), które związane są z regulacją odpowiedzi zapalnej [79, 122, 123]. Wykazano też, że w komórkach OIS sekrecja SASP jest promowana w wyniku aktywacji autofagii [124].

SASP w istotny sposób wpływa na progresję nowotworów. W jego skład wchodzi czynniki wzrostu, np. amfiregulina, promująca proliferację komórek oraz czynnik VEGF, promujący angiogenezę. Sekrecja białek z grupy MMP propaguje inwazyjność komórek nowotworowych, a interleukiny (ang. Interleukins, IL), takie jak IL-6 i IL-8 aktywują tranzycję epithelial to mesenchymal transition, EMT). Ponadto IL-6 może promować chemooporność. Rolą cytokin i chemoatraktantów należących do SASP jest też rekrutacja i aktywacja dojrzewania komórek zapalnych takich jak komórki NK, limfocyty T i makrofagi oraz promowanie przewlekłego stanu zapalnego w środowisku guza. Co więcej niektóre chemokiny oraz czynniki takie jak transformujący czynnik wzrostu beta (ang. Transforming Growth Factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ ) w sposób parakrynnny mogą wpływać na propagację starzenia komórek w guzie [79, 122, 125, 126].

### **5.6.3. Starzenie, a fenotyp macierzysty**

Nowotworowe komórki macierzyste (ang. Cancer Stem Cells, CSC) stanowią małą populację komórek guza, o wysokich zdolnościach regeneracji i różnicowania do komórek o heteogennym fenotypie. Pojedyncza komórka CSC zdolna jest do urworzenia całego heterogennego guza [127].

Charakteryzują się one zdolnością do podziałów asymetrycznych oraz symetrycznych, w zależności od potrzeb. Ponadto, uczestniczą w EMT i wykazują się wysoką opornością na chemioterapię, co związane jest z nadekspresją białek odpowiedzialnych za naprawę DNA i białek oporności lekowej. Ponadto, uważa się, że komórki CSCs są odporne na działanie leków terapeutycznych. Z tego powodu uważa się, że odgrywają one kluczową rolę w procesie inicjacji, progresji i przerzutowania guzów złośliwych, a także, że odpowiedzialne są za wznowę nowotworową [127-129].

Wykazano, że CSC cechuje wysoka plastyczność, co objawia się zmianą ich fenotypu i funkcjonalności. Zmiany te są indukowane przez chemio- i radioterapię. Na ich plastyczność mogą wpływać także zmiany w mikrośrodowisku guza wywołane

przez stare komórki nowotworowe. CSCs mogą powstawać zarówno z komórek macierzystych, jak i komórek zróżnicowanych. Czynnikiem inicjującym ich powstanie mogą być stres terapeutyczny oraz zmiany w TME. Podejrzewa się, że jednym z typów komórek zdolnych do transformacji do CSC mogą być komórki TIS [130-132].

Ekspresję markerów macierzystości zaobserwowano w starych komórkach nowotworowych [131, 133-137]. Dokładne mechanizmy prowadzące do ekspresji cech macierzystych przez komórki stare nie są znane. Podejrzewa się, że znaczącą rolę w tym procesie odgrywa SASP. Zaobserwowano, że stare komórki nowotworowe o cechach macierzystych mają istotnie wyższy potencjał inicjacji nowotworowej niż komórki, które nie rozwinęły fenotypu starzeniowego. Wskazuje to na znaczącą rolę komórek starych jako źródła wznowy choroby nowotworowej [138, 139].

#### **5.6.4. Ucieczka od starzenia**

Do niedawna dominowała teoria, że starzenie komórkowe jest korzystnym efektem przeciwnowotworowym chemio- i radioterapii. Teoria ta opierała się na założeniu, że podziały komórek starych są trwale zablokowane. Badania nad biologią starych komórek nowotworowych przyczyniły się do zrozumienia, że aktywnie wpływają one na biologię guza, między innymi dzięki swojej niezahamowanej aktywności metabolicznej [64, 140, 141]. Obecnie szeroko znanym jest fakt, że mają one zdolność do komunikacji z mikrośrodowiskiem guza, głównie poprzez sekrecję SASP, ale także poprzez tworzenie bezpośrednich cytoplazmatycznych połączeń z otaczającymi je komórkami, uwalnianie ROS czy wydzieleniu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, takich jak egzozomy. Sygnały wysyłane przez komórki stare przyczyniając się między innymi do progresji guza poprzez promocję stanu zapalnego oraz stymulację niekontrolowanej proliferacji niezmiennych starzeniowo komórek nowotworowych obecnych w guzie [109, 133]. Co więcej, niektóre komórki TIS wykazują zdolność do ucieczki od starzenia [142].

Zdolność komórek TIS do ucieczki od starzenia zaobserwowano w wielu typach nowotworów, takich jak rak jelita grubego [135, 143-145], białaczka [131], czy rak piersi [146]. Mechanizmy związane z tym zjawiskiem nadal nie są do końca jasne. Komórki, które uciekły od starzenia, charakteryzują większym zróżnicowaniem, niż komórki z których pierwotnie się wywodziły. Ponadto, wykazują się wysoką opornością na chemioterapie oraz wyższą agresywność przyczyniająca się do intensywniejszej proliferacji i tworzenia większej liczby przerzutów [28, 147-149].

Podjeżdżewa się, że kluczową rolę w tym procesie odgrywa poliploidyzacja. Poliploidia jest to stan, w którym komórka posiada więcej niż dwie kopie materiału genetycznego. Wielkie komórki poliploidalne (ang. Polyploid Giant Cancer Cells, PGCCs) obserwowane są najczęściej po leczeniu chemioterapią, w szczególności taksanami celującymi w mikrotubule. Wykazują się one opornością na leczenie chemoterapeutyczne, przez co ich eliminacja wydaje się być praktycznie niemożliwa. Co więcej, wykazano, że posiadają one markery charakterystyczne dla komórek macierzystych, które zaobserwowano także w komórkach starych [133-137].

Komórki poliploidalne zdolne są do inicjacji nietypowych podziałów komórkowych zwanych neozą. Neoza jest formą redukcyjnego podziału komórkowego, która w wyniku pączkowania jąder komórkowych i asymetrycznej cytokinezy prowadzi do powstania komórek potomnych (ang. progeny) o zmniejszonej ploidii, ale zdolności do prawidłowych podziałów mitotycznych. [148]. Ponadto udowodniono, że w wyniku endoreplikacji komórki PGCCs mają zdolność do odnawiania się [28]. Nie wszystkie komórki TIS charakteryzują się poliploidią [150, 151], dlatego coraz popularniejsza staje się teoria głosząca, że tylko niewielka populacja poliploidalnych komórek starych wysoce opornych na warunki stresowe oraz chemioterapię jest zdolna do wznowy podziałów [149].

Zespół Rajamarana, który po raz pierwszy opisał powstawanie komórek potomnych w wyniku neozy, wskazał, że komórki potomne przejściowo mogą nabywać cechy komórek macierzystych [152]. W kilku typach nowotworów wykazano jednak, że to w komórkach starych, w tym PGCCs, dochodzi do nadekspresji markerów macierzystości takich jak NANOG, CD24, Oct3/4, co sugeruje nabycie przez nie zdolności do inicjacji nowotworzenia [131, 135-137].

Nie istnieje jednoznaczna odpowiedź, która tłumaczyłaby, dlaczego stare komórki poliploidalne zdolne są do ucieczki i wznowy podziałów. Jedną z teorii głosi, że depoliploidyzacja PGCCs związana jest z aktywacją procesów podobnych do mejozy. W komórkach HeLa kilka dni po leczeniu radioterapią zaobserwowano struktury podobne do kompleksów synaptonemalnych (ang. Synaptonemal Complex, SC) charakterystycznych dla komórek ulegających mejozie. Ponadto w komórkach poliploidalnych obserwowano nadekspresję białek związanych z mejozą, takich jak SYCP, REC8, DMC1 [153] czy SPO11 [154], co może tłumaczyć zdolność PGCCs do redukcji nadmiaru chromatyny, co przypomina redukcję chromosomów w trakcie normalnej mejozy [155]. Podjeżdżewa się, że aktywacja autofagii niezbędna jest do

inicjacji ucieczki od starzenia [156, 157]. Dlatego można przypuszczać, że inhibicja autofagii może przyczynić się do ograniczenia ucieczki od starzenia poliploidalnych komórek TIS.

### 5.6.5. Terapie senolityczne

Akumulacja i przewlekła obecność starych komórek nowotworowych w guzie negatywnie wpływa na jego mikrośrodowisko, głównie poprzez SASP. Komórki TIS są też zdolne do aktywizacji produkcji komórek potomnych *in vitro*, dlatego podejrzewa się, że podobnie jak komórki CSC mogą stanowić źródło wznowy choroby nowotworowej. Z tego powodu coraz częściej mówi się o konieczności opracowania terapii selektywnie usuwających stare komórki. Proponowane jest też użycie terapii przeciwnowotworowych opierających się na indukcji starzenia, by następnie selektywnie usuwać komórki TIS. Terapie takie określa się mianem „podwójnego uderzenia” (ang. „one-two punch” therapies) [158, 159]. Zastosowanie takiej strategii może okazać się skuteczne szczególnie w nowotworach charakteryzujących się wysoką chemoodpornością, takich jak RCC.

Ponieważ starzejące się komórki są wysoce heterogeniczne zarówno pod względem biologii molekularnej, jak i funkcji fizjologicznych, opracowuje się strategię, które zapobiegałyby ucieczce od starzenia i/lub ograniczyły ich negatywny wpływ na TME. Obecne terapie koncentrują się na eliminowaniu funkcji starzejących się poprzez stosowanie senolityków oraz senomorfików [158]. Terapie senomorficzne opierają się na hamowaniu produkcji, inaktywacji lub anatagonizacji SASP, neutralizując przy tym negatywny efekt komórek starych na mikrośrodowisko guza. Należy jednak zauważyć, że głównym założeniem senomorfików nie jest eliminacja starych komórek nowotworowych, co nie ogranicza ich potencjalnej wznowy podziałów [160, 161].

W odróżnieniu od senomorfików, senolityki to leki selektywnie eliminujące komórki stare. W 30-70% komórek starych dochodzi do nadekspresji szlaków przyżyciowych, chroniących komórki stare przed śmiercią komórkową. Z tego powodu leki senolityczne pierwszej generacji opierały się na celowaniu jednego lub kilku szlaków antyapoptotycznych [162, 163]. W niektórych przypadkach związki senolityczne, które celują w pojedynczy szlak antyapoptotyczny, takie jak inhibitory szlaku BCL-2, ABT-263, A1331852 lub A1155463, mają tendencję do indukowania apoptozy tylko w niektórych typach starych komórek nowotworowych [164, 165].



Warto jednak zauważyć, że ABT-263 może powodować małopłytkowość i neutropenię, nawet po krótkiej ekspozycji [166, 167]. Podejrzewa się, że jednoczesne hamowanie różnorodnych szlaków molekularnych, przy równoczesnym zastosowaniu niższych dawek leków, może przyczynić się do osiągnięcia efektu senolitycznego w szerszej grupie komórek starych przy jednoczesnym ograniczeniu ich toksyczności [168].

Inne podejście terapii senolitycznych opiera się na wysokiej aktywności lizosomalnej niektórych starzejących się komórek. Czyni je to wrażliwymi na lizosomalne inhibitory ATPazy [169]. Nagromadzenie lizosomów sugeruje też możliwość indukcji senolizy poprzez modulację autofagii [158].

### **5.7. Autofagia**

Autofagia jest procesem zależnej od lizosomów degradacji i eliminacji niepotrzebnych lub uszkodzonych składników komórkowych. Mechanizm ten jest odgrywa kluczową rolę w rozwoju, różnicowaniu i przeżyciu komórek, które to procesy są niezbędne do zachowania homeostazy. W komórkach nowotworowych autofagia działa dwójako. Jako mechanizm chroniący komórki przed szkodliwym działaniem stresu oksydacyjnego lub terapii genotoksycznych zapobiega akumulacji potencjalnie kancerogennych uszkodzeń organelli czy też mutacji, zapobiegając przy tym procesowi nowotworzenia. Aktywacja autofagii może mieć także efekt toksyczny na komórki nowotworze, poprzez bezpośrednią inicjację programowanej śmierci komórkowej, apoptozy lub nekrozy, albo sama może indukować proces śmierci komórkowej niezależnej od kaspaz. Proces ten określa się mianem autofagicznej śmierci komórkowej (ang. Autophagic Cell Death, ACD). Z drugiej strony, autofagia odpowiada za homeostazę komórek, niezależnie od ich typu. Dotyczy to też komórek nowotworowych, gdzie aktywację tego procesu zaobserwowano w wyniku ekspozycji na działanie różnych czynników stresowych, takich jak hipoksja czy chemioterapia. Z tego powodu uważa się, że aktywacja autofagii może być mechanizmem promującym nowotworzenie [157, 170-172].

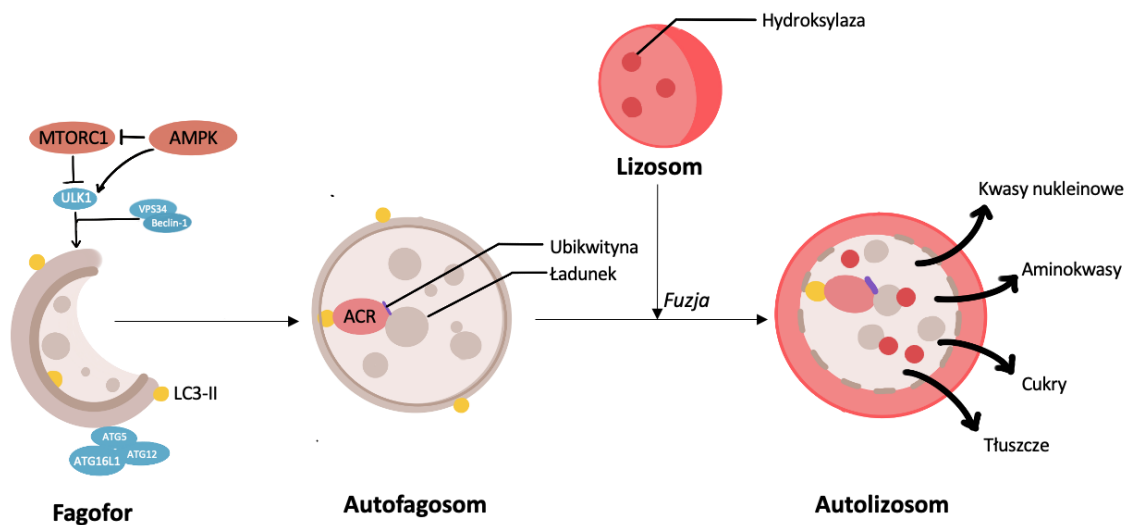
Związek między autofagią i starzeniem jest niejasny. Istnieją dowody wskazujące na pro- jak i antystarzeniowy efekt autofagii w indukcji OIS. Efekt może zależeć od tego czy w procesie zaangażowana jest autofagia selektywna czy nieselektywna [124, 173]. Ponadto, autofagia, tak jak starzenia mogą wpływać na odpowiedź na chemioterapię i progresję guza [174]. Wskazuje to na konieczność

prowadzenia badań z uwzględnieniem warunków mikrośrodowiska guza, które mogłyby pomóc w zrozumieniu roli autofagii w starzeniu.

### 5.7.1. Przebieg procesu autofagii

W komórkach ssaków wyróżnia się trzy typy autofagii: makroautofagię, mikroautofagię oraz autofagię zależną od białek ochronnych (ang. Chaperone-Mediated Autophagy, CMA). Tylko w przypadku makroautofagii obserwuje się tworzenie unikalnych organelli autofagosomów o podwójnej błonie, do których pakowany jest materiał przeznaczony do degradacji. W przypadku mikroautofagii i CMA autofagosomy nie są generowane, a materiał przeznaczony do degradacji kierowany jest bezpośrednio do lizosomów [171].

Proces makroautofagii składa się z pięciu etapów: 1) inicjacji, 2) nukleacji, 3) elongacji, 4) zamknięcia autofagosomów i 5) ich fuzji z lizosomami [175]. Biogeneza autofagosomów koordynowana jest przez grupę białek związanych z autofagią ATG (ang. Autophagy-related genes, ATG), tworzących kompleksy białkowe regulujące poszczególne etapy tego procesu [171] (Fig. 5).



**Figura 5. Schemat przebiegu autofagii w komórkach ssaczych.**

Na podstawie Debnath, J., Gammoh, N. & Ryan, K.M. Autophagy and autophagy-related pathways in cancer. Nat Rev Mol Cell Biol (2023).

Inicjacja autofagii następuje na skutek aktywacji kompleksu ULK w skład, którego wchodzi białko ULK-1 (ang. UNC-51-like kinase 1, ULK-1), inaczej znanego jako ATG1. W normalnych warunkach aktywność ULK-1 jest hamowana w wyniku fosforylacji przez kompleks MTORC1 (ang. mammalian target of rapamycin complex 1, MTORC1). MTORC1 jest aktywny, kiedy komórka ma nieograniczony dostęp do składników odżywczych. W sytuacjach stresowych dochodzi do jego inaktywacji.

ULK-1 ulega też aktywacji na skutek działania kinazy AMPK (ang. AMP-activated protein kinase, AMPK). Aktywacja autofagii przez AMPK odbywa się poprzez bezpośrednią fosforylację ULK-1 lub poprzez dezaktywację kompleksu MTORC1 [176, 177].

Po aktywacji, kompleks ULK jest rekrutowany do miejsca składania fagoforów (ang. Phagophore formation site, PAS) aktywując etap nukleacji. Skutkiem tego procesu jest formowanie izolowanej membrany autofagicznej, fagoforu. W tym celu kompleks ULK wchodzi w interakcję kompleksem białkowym PI3K klasy III, w skład którego wchodzi białka Beclin1, ATG15, VPS34 oraz VPS15 katalizując tym samym produkcję 3-fosforanu fosfatydyloinozytolu (ang. Phosphatidylinositol-3-phosphate, PI3P) na membranach autofagicznych [177].

PI3P następnie rekrutuje maszynę związaną z elongacją fagoforu składającą się z kompleksu białek ATG16L1–ATG5–ATG12, oraz ATG3 i ATG7. Białka te umożliwiają lipidową koniugację białek z rodziny ATG8, do których zaliczne jest białko LC3 (ang. microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3, LC3) oraz białka z rodziny GABARAP i GATA. LC3-I poprzez koniugację z fosfatydyloetanolaminą przekształcane jest w postać lipidową zwaną LC3-II. Proces ten jest regulowany przez kompleks ATG16L1–ATG5–ATG12. Następnie białka z rodziny ATG8 wiązane są w błonie fagoforu, gdzie regulują proces wiązania materiału przeznaczonego do degradacji oraz biosyntezy autofagosomu. Głównymi regulatorami wiązania ładunku do autofagosomu w czasie autofagii selektywnej są receptory ACR (ang. Autophagy Cargo Receptors, ACR) np. SQSTM1/p62 (ang. Sequestosome-1/p62). Wiążą się one do błony autofagosomu poprzez białka z rodziny ATG8, np. LC3-II, gdzie rozpoznają materiał przeznaczony do degradacji, wcześniej poddany procesowi niezależnej ubikwitylizacji [171, 177-180].

Po zamknięciu fagoforu, autofagosom dojrzewa i łączy się z lizosomem w celu degradacji ładunku. Fuzja autofagosomu o podwójnej błonie z lizosomem następuje za pośrednictwem białek SNARE. Na pierwszym etapie fuzji zewnątrz błona autofagosomu łączy się z pojedynczą błoną lizosomu. Pełna fuzja następuje w momencie degradacji wewnętrznej membrany autofagosomu przez hydrolazy, co w konsekwencji wystawia materiał przeznaczony do degradacji na działanie enzymów lizosomalnych. Aminokwasy, tłuszcze, kwasy nukleinowe i cukry powstałe w wyniku degradacji są następnie uwalniane do cytoplazmy i poddawane recyklingowi [177, 178, 181, 182].

O wydajności procesu autofagii świadczy przepływ autofagiczny (ang. Autophagic flux), który jest miarą szybkości degradacji autofagicznej. Jedną z najpopularniejszych metod oceny przepływu autofagicznego jest analiza ekspresji białek LC3-II oraz p62. Podwyższona ekspresja LC3-II w stosunku do formy LC3-I świadczy o nagromadzeniu lizosomów i aktywacji autofagii. Degradacja białka p62 następująca równoległe z lizą autofagolizosomów świadczy o zakończeniu i wydajności reakcji [183, 184]

### **5.7.2. Autofagia jako cel terapii przeciwnowotworowych**

Autofagia odgrywa kluczową rolę jako pro-przeżyciowy mechanizm w komórkach nowotworowych, w tym RCC [185]. Z tego powodu uważa się, że modulacja autofagii może być skuteczną strategią terapeutyczną w leczeniu nowotworów. W zależności od statusu indukcji tego procesu w komórkach nowotworowych, proponowana jest indukcja śmierci autofagicznej (ang. Autophagic Cell Death, ACD) lub zahamowanie aktywności autofagii [124, 157].

ACD początkowo uważano jako termin morfologiczny opisujący umierające komórki wykazujące cechy autofagii. Obecnie wiadomo, że autofagia może bezpośrednio prowadzić do śmierci komórki niezależnie od innych programowanych szlaków śmierci komórkowej. Śmierć autofagiczna jest wynikiem aktywacji autofagi prowadzącej do nadmiernego przepływu autofagicznego. ACD w komórkach nowotworowych zaobserwowano w efekcie promocji stresu oksydacyjnego oraz działania terapii przeciwnowotworowych takich jak rezweratrol, tamoxifen, trójtlenek arsenu czy radioterapia [172, 186, 187]. W liniach raka nerki o zmutowanym pVHL zaobserwowano, że indukcja autofagii przy użyciu związku STF-62247 promuje śmierć komórkową w wyższym stopniu niż w komórkach z niezmutowanym pVHL. Co więcej indukcja autofagii w raku nerki przyczyniła się do zwiększenia wrażliwości komórek na działanie radioterapii [188, 189].

Zahamowanie mechanizmu ochronnego komórek nowotworowych jakim jest autofagia prowadzi do akumulacji uszkodzeń i w konsekwencji do śmierci komórkowej. Autofagia może być blokowana na wczesnym jak i późnym etapie. Blokowanie autofagii na wczesnym etapie hamuje powstawanie autofagosomów. Z kolei gdy proces ten blokowany jest na etapie późnym w komórkach obserwuje się akumulację autofagosomów wynikającą z blokady ich fuzji z lizosomami [190, 191]. Jednymi z najczęściej badanych inhibitorów o takim działaniu jest hydroksychlorochina (ang.

Hydroxychloroquine, HCQ). Jest ona obiektem badań klinicznych, które wykazały, że jej zastosowanie w znaczący sposób zwiększa efektywność chemioterapii, także w przypadku RCC [185, 192]. Zahamowanie autofagii może też indukować śmierć komórek starych co wykazały badania przedkliniczne [193]. Inhibicja kinazy ULK-1, wykazała się wysoką skutecznością w eliminacji starych komórek raka jelita grubego [194]. Taki sam efekt zaobserwowano po zastosowaniu fibratów, metoforminy, czy inhibitorów kompleksu MTORC1, których działanie doprowadziło do zahamowania autofagii na jej wczesnych etapach, [195-197].

Mimo obiecujących wyników wskazujących na skuteczność inhibicji autofagii w terapiach przeciwnowotworowych i senolitycznych nie jest znany długotrwały efekt takich terapii. Ponieważ autofagia jest też aktywna w komórkach niezmiennych nowotworowo trudno jest przewidzieć, czy zastosowanie dawek inhibitorów hamujących progresję guza nie wpłynie cytotoksycznie na komórki zdrowe [157]. Należy też brać pod uwagę, że rola autofagii w starych komórkach jest procesem złożonym i nie do końca zbadanym. Dane literaturowe coraz częściej donoszą o kluczowej roli autofagii w regulacji procesu ucieczki od starzenia oraz przywracania ich potencjału proliferacyjnego, co w konsekwencji może prowadzić do wznowy choroby nowotworowej [157, 198, 199]. Badania przedkliniczne *in vivo* wykazały, że krótkotrwałe zahamowanie autofagii na jej późnych etapach może przyczynić się do generacji komórek potomnych przez stare komórki poliploidalne promując nawrót nowotworu. Ucieczka od blokady cyklu komórkowego może być związana z reaktywacją autofagii, zaobserwowaną kilka dni po odstawieniu inhibitora na co wskazują badania *in vitro*. Efekt ten wydaje się być zależny od hipoksji, ponieważ regeneracja guzów *in vivo* przez komórki TIS po modulacji autofagii była szybsza, niż przez komórki, w których nie wpływno na ten proces [135].

## 6. Założenia i cel pracy

Celem niniejszej pracy było określenie czy modulacja autofagii poprzez jej inhibicję uwrażliwi stare komórki raka nerki na indukcję śmierci komórkowej i/lub wpłynie na wznowienie ich potencjału proliferacyjnego i produkcji komórek potomnych w normoksji i w hipoksji.

W tym celu przeprowadzono badania oceniające czy komórki raka nerki ulegają procesowi starzenia w odpowiedzi na chemioterapię oraz czy inhibicja autofagii wpływa na stare komórki nowotworowe.

W pracy szczególną wagę poświęcono następującym aspektom:

1. Ocena czy ludzkie i mysie komórki raka nerki mogą ulegać starzeniu komórkowemu *in vitro* pod wpływem chemioterapii poprzez ocenę zmian molekularnych i fenotypowych;
2. Ocena wpływu hipoksji na rozwój fenotypu starzeniowego;
3. Zbadanie czy zahamowanie autofagii wpływa na proces indukcji starzenia w ludzkim modelu komórkowym raka nerki;
4. Zbadanie efektu zahamowania autofagii w ludzkich komórkach nowotworowych wcześniej poddanych indukcji starzenia z wykorzystaniem chemioterapii;
5. Ocena zmian w ekspresji genów i ścieżek sygnałowych w wyniku indukcji starzenia oraz zahamowania autofagii w komórkach starych na podstawie analizy NGS;
6. Opracowanie modelu indukcji starzenia w syngenicznym mysim modelu *in vivo*;
7. Ocena wpływu zahamowania autofagii na zmiany molekularne i fenotypowe w guzach w modelu *in vivo*.

## **7. Materiały i metody**

### **7.1. Materiały**

#### **7.1.1. Hodowle komórkowe**

Ludzka linia komórkowa raka nerkowokomórkowego, RCC4, posiadająca mutację genu VHL, została udostępniona przez prof. Salema Chouaib. Autentykacja linii została przeprowadzona przez American Type Cell Culture (ATCC; Manassas, VA, USA). Linia RCC4 była hodowana w medium Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM (Gibco, Life Technologies Limited, Wielka Brytania). Mysia linia gruczołowego raka nerki, RenCa została zakupiona z ATCC (Manassas, VA, USA). Linia RenCa hodowana była w medium RPMI (Gibco, Life Technologies Limited, Wielka Brytania). Media dla obu linii były suplementowane 10% płodową surowicą bydlęcą (Gibco, Life Technologies Limited, Wielka Brytania) oraz 1% mieszaniną środków antybiotycznych i antygrzybiczych o składzie 100 jednostkami/ml penicyliny, 100 µg/ml streptomycyny oraz 25 µg/ml amfoterycyny B (Gibco, Life Technologies Corporation, Grand island, NY, USA). Hodowle komórkowe były prowadzone w atmosferze zawierającej 5% stężenia CO<sub>2</sub> w temperaturze 37°C. Hodowle normoksyjne były prowadzone w warunkach o atmosferycznym stężeniu tlenu (~19% O<sub>2</sub>). Hodowle hipoksyjne były prowadzone w atmosferze o obniżonym stężeniu tlenu (1% O<sub>2</sub>), w komorze hipoksyjnej o kontrolowanym stężeniu tlenu (X3 system, Biospherix, Parish, NY, USA).

#### **7.1.2. Główny schemat eksperymentu**

Komórki RCC4 i RenCa wysiano w gęstości 5000 komórek/cm<sup>2</sup>. Po wysianiu hodowle prowadzono przez 24 godziny w warunkach normoksji. Po tym czasie hodowle podzielono na dwie grupy. Hodowlę pierwszej grupy kontynuowano w normoksji. Druga grupa została przeniesiona do komory hipoksyjnej, gdzie medium zmieniono na hipoksyjne tzn. wcześniej inkubowane przez 24 godziny w warunkach hipoksji. Medium było przygotowywane w ten sam sposób na przy jego każdorazowej zmianie. Hodowle prowadzone w warunkach hipoksji nie były wyjmowane z komory hipoksyjnej do końca eksperymentu. Po kolejnych dobie przeprowadzono inkubację z chemioterapeutykami, winblastyną (VIN) (Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA), 5-Fluorouracylem (5-FU) (Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA) lub gemcytabiną (GEM) (Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA), która trwała 24 godziny. Roztwory wyjściowe leków przygotowano poprzez rozpuszczenie ich w nierozcieńczonym DMSO lub w wodzie destylowanej (dH<sub>2</sub>O). Komórki były wystawione też na działanie 0.1 % DMSO rozcieńczonego w pożywce. Następnie roztwory rozcieńczono do badanych

stężeń w medium hodowlanym. Listę chemoterapeutyków wraz zastosowanymi rozpuszczalnikami, stężeniami wyjściowymi i stężeniami badanymi przedstawiono w Tabeli 1. Po 24 godzinach inkubacji medium zmieniono na wolne od chemoterapeutyków. Hodowlę kontynuowano przez następne 7 dni, przy czym 4 dni po zakończeniu inkubacji z lekami medium zostało ponownie wymienione. Eksperymenty zakończono w dniu 11.

**Tabela 1. Lista leków wykorzystana w eksperymentach oceny wpływu chemioterapii na rozwój fenotypu starzeniowego.**

Odczynniki	Rozpuszczalnik	Stężenie wyjściowe	Stężenia badane dla RCC4	Stężenia badane dla RenCa
Winblastyna (VIN)	DMSO	10 mM	0.1 i 0.5 $\mu$ M	0.01 i 0.05 $\mu$ M
5-Fluorouracyl (5-FU)	DMSO	100 mM	75 i 100 $\mu$ M	1 i 5 $\mu$ M
Gemcytabina (GEM)	dH <sub>2</sub> O	10 mM	0.01 i 0.025 $\mu$ M	0.1 i 0.25 $\mu$ M

#### 7.1.2.1. Schemat eksperymentu z wyciszeniem genów autofagicznych

Eksperyment z wyciszeniem genów autofagicznych został wydłużony o jeden dzień w porównaniu do ogólnego schematu eksperymentu. Komórki RCC4 wysiano w gęstości 2500 komórek/cm<sup>2</sup>. Po wysianiu hodowle prowadzono przez 24 godziny w warunkach normoksji normoksji. Po tym czasie hodowle podzielono na dwie grupy. Hodowlę pierwszej grupy kontynuowano w normoksji. Druga grupa została przeniesiona do komory hipoksyjnej, gdzie medium zmieniono na hipoksyjne tzn. wcześniej inkubowane przez 24 godziny w warunkach hipoksji. Medium było przygotowywane w ten sam sposób na przy jego każdorazowej zmianie. Hodowle prowadzone w warunkach hipoksji nie były wyjmowane z komory hipoksyjnej do końca eksperymentu. Po kolejnej dobie, komórki były transfekowane z siRNA celującymi geny kodujące ATG5, ATG7, Becn1, ULK-1 (ON-TARGETplus siRNA, Dharmacon, Lafayette, CO, USA) oraz siRNA niespecyficznym (ON-TARGETplus siRNA, Dharmacon, Lafayette, CO, USA). Komórki transfekowane siRNA niespecyficznym traktowano jako kontrolę. Do transfekcji wykorzystano mieszaniny



czterech różnych sekwencji siRNA celujących w różne regiony tego samego genu w celu zwiększenie efektywności wyciszenia.

W celu przygotowania roztworu do transfekcji, przygotowano odpowiednie rozcieńczenia siRNA (20 mM roztwór siRNA rozcieńczono w stosunku 1:500) oraz lipofektaminy (1:125) (Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad CA, USA). Roztwory inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej (ang. Room temperature, RT). Po tym czasie roztwory połączono w stosunku 1:1, a powstałą mieszaninę inkubowano przez kolejne 20 minut w RT, regularnie ją mieszając. Po zakończeniu inkubacji mieszaninę roztworów siRNA i lipofektaminą rozcieńczono w medium hodowlanym, uzupełnionym tylko o 10% FBS, w stosunku 1:3. Komórki inkubowano z przygotowanym roztworem przez 4.5 godziny. Po tym czasie pożywkę zmieniono na pełne medium hodowlane. Dzień po transfekcji inkubowano z wybranymi stężeniami chemoterapeutyków przez 24 godziny przedstawionymi w Tabeli 1. Po 24 godzinach medium zmieniono na wolne od chemoterapeutyków. Hodowlę kontynuowano przez następne 7 dni, przy czym 4 dni po zakończeniu inkubacji z lekami medium zostało ponownie wymienione. Eksperymenty zakończono w dniu 12.

#### **7.1.2.2. Schemat eksperymentu z farmakologicznym zahamowaniem autofagii**

W celu farmakologicznego zahamowania autofagii wykorzystano hydroksychlorochinę (HCQ; Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA) lub bafilomycynę A1 (BafA1; Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA), hamującymi proces fuzji autofagosomów i lizosomów. Schemat przeprowadzenia doświadczeń do dnia 4 od zakończenia inkubacji z chemoterapeutykami był taki sam jak główny schemat eksperymentu (Rozdział 4.1.1.1).

W celu przygotowania roztworów wyjściowych HCQ rozpuszczono w dH<sub>2</sub>O (stężenie roztworu wyjściowego 50 mM), a BafA1 w DMSO (stężenie roztworu wyjściowego 100 μM). Komórki inkubowano także z 0.1% DMSO rozcieńczonym w pożywce. W 4-tym dniu od inkubacji z chemoterapeutykami komórki zostały poddane inkubacji z roztworami HCQ lub BafA1 rozcieńczonymi w medium hodowlanym. Do eksperymentów, których celem był wybór dawki leku do dalszych analiz molekularnych zastosowano odpowiednio następujące stężenia:

- HCQ: 100 μM, 50 μM, 25 μM, 1 μM;
- BafA1: 1 μM, 0.1 μM, 0.01 μM.

Inkubacja z inhibitorami trwała 24 godziny. Po tym czasie medium zmieniono na świeże, wolne od leków. Hodowle kontynuowano przez kolejne 48 godzin (długość trwania eksperymentu 11 dni).

Do eksperymentów, których celem było przeprowadzenie pogłębionych analiz molekularnych wybrano HCQ w stężeniu 50  $\mu\text{M}$ .

W niektórych eksperymentach z użyciem HCQ hodowle przerwano bezpośrednio po 24 godzinnej inkubacji z wybranym inhibitorem (długość trwania eksperymentu 9 dni).

### 7.1.3. Eksperymenty *in vivo*

Procedury badawcze z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych przeprowadzono w Pracowni Badań Przedklinicznych o Podwyższonym Standardzie instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie. Badania przeprowadzono na podstawie zgody lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach (nr decyzji 1184/2021 z dnia 27.04.2021).

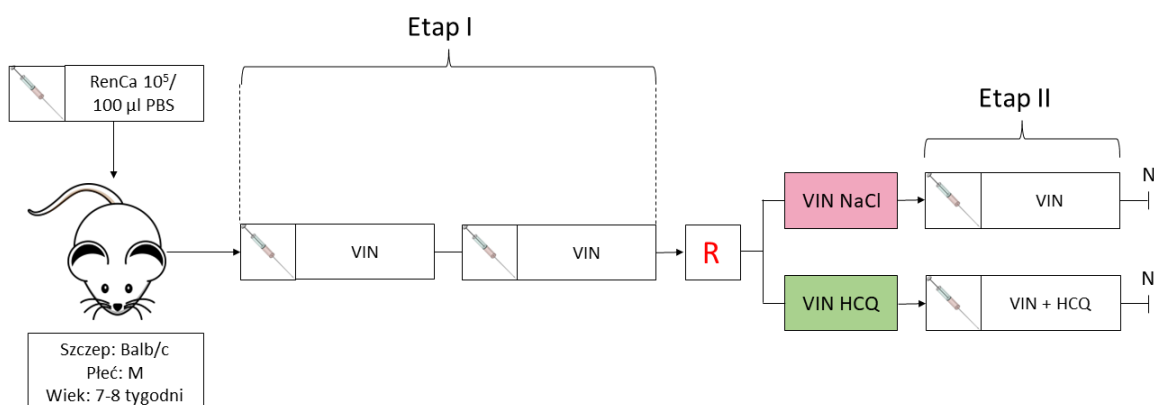
Do przeprowadzenia eksperymentów *in vivo* wykorzystano myszy syngeniczny model raka nerki. W eksperymentach wykorzystano 52 osobniki szczepu myszy Balb/c. Zwierzęta sprowadzono z Centrum Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. W eksperymentach wykorzystano samce o masie ciała ok. 26 gram, które w momencie rozpoczęcia eksperymentu miały 7-8 tygodni.

Zwierzęta w grupach po 2-3 osobniki przetrzymywano w klatkach o wzbogaconym środowisku i indywidualnej wentylacji (75 wymian/h). Klatki o powierzchni 530  $\text{cm}^2$  i wysokości 14 cm umieszczone były w regałach iVC (Techniplast), znajdujących się w pomieszczeniu spełniającym standardy SPF (ang. Specific Pathogen Free). W pomieszczeniu utrzymywano warunki nadciśnienie, temperaturę ok. 22°C i wilgotność ok. 55%. W zwierzętarni utrzymywano cykl dobowy 12/12h. Zwierzętom zapewniono nieograniczony dostęp do jałowych karmy i wody.

Zwierzęta po sprowadzeniu do zwierzętarni zostały poddane 14 dniowej kwarantannie. W czasie trwania kwarantanny myszy zostały poddane badaniom na obecność organizmów patogennych. Wszystkie wyniki były negatywne.

Po zakończeniu kwarantanny rozpoczęto procedury eksperymentalne. W pierwszej kolejności myszom podano podskórną w fałd karkowy ok. 100 000 komórek RenCa zawieszonych w 100  $\mu\text{l}$  PBS. W momencie, w którym guzy były

wyczuwalne palpacyjnie rozpoczęto leczenie. Zwierzęta poddano leczeniu dwuetapowemu. Ogólny schemat eksperymentu przedstawiono na Figurze 5.



**Figura 6. Schemat przeprowadzenie eksperymentów in vivo.**

Legenda: R- randomizacja; N-planowana nekropsja; VIN – winblastyna; HCQ – hydroxychlorochina.

W pierwszym etapie, przed randomizacją myszom podano VIN. Leczenie VIN trwało 16 dni. Po tym czasie myszy zrandomizowano do dwóch grup. Grupa pierwsza kontynuowała leczenie VIN (VIN NaCl). Druga grupa otrzymała leczenie kombinowane VIN i HCQ (VIN HCQ). Dawki leków oraz okres ich podawania na poszczególnych etapach leczenia przedstawiono w Tabeli 2. Wszystkie leki podawane były myszom dootrzewnowo przez iniekcję. Wszystkie zwierzęta były monitorowane pod kątem oceny wystąpienia toksyczności terapii. Ocenie poddana były waga, stan futra, w tym czy wystąpiła piloerekcja, stan wibrysów, stan oczu, oraz czy wystąpiło objawy biegunki. Jeżeli stan zdrowia zwierząt znacząco się pogarszał, zwierzęta poddawano humanitarnej eutanazji.

Po zakończeniu eksperymentu zwierzęta zostały poddane planowej nekropsji. Planowaną nekropsję przeprowadzono do 4 dni od zakończenia podawania leku.

**Tabela 2. Opis dawek i czasu trwania leczenia zwierząt na poszczególnych etapach eksperymentu.**

Etap leczenia	Etap i (wszystkie zwierzęta)				Etap ii (VIN NaCl)	Etap ii (WIN HCQ)
	1		2		3	3
Tydzień	1		2		3	3
Lek	Winblastyna	-	Winblastyna	-	Winblastyna	Winblastyna - HCQ

Dawka	0.5 mg/kg	-	0.38mg/kg	-	0.3 mg/kg	0.3 mg/kg – 30 mg/kg
Czas	5 dni	2 dni	5 dni	4 dni	5 dni	5 dni

U wszystkich zwierząt przed podaniem leków wykonywano pomiar masy ciała. Pomiary wielkości guza przy użyciu suwmiarki wykonywano regularnie co 2 dni. Objętość guzów obliczono zgodnie ze wzorem: objętość = (szerokość)<sup>2</sup> x długość/2.

### 7.1.3.1. Planowana nekropsja i zabezpieczenie materiału badawczego

Zwierzęta, które zakończyły eksperyment planowo zostały poddane nekropsji. Przed przeprowadzeniem nekropsji myszy usypiano w oparach izofluoranu oraz znieczulono mieszaniną medetomidyny z ketaminą w 0.9% NaCl w dawce anestetycznej poprzez iniekcję dootrzewnową. Szczegółowy opis znieczulenia został przedstawiony w Tabeli 7.

**Tabela 3. Opis znieczulenia zastosowanego przed nekropsją u myszy.**

Środek	Sposób podania	Dawka
Izofluoran (Aerane, Baxter)	Wziewna	0.5% (opary)
Ketamina 100 mg/ml	Iniekcja dootrzewnowa	75 mg/kg
Doxodomitor (medetomidyna) 0.5 mg/ml	Iniekcja dootrzewnowa	1 mg/kg

U zwierząt sprawdzono odruchy przy ściskaniu paliczków i płatków uszu w celu sprawdzenia skuteczności anestezji. Po potwierdzeniu, że anestezja zadziałała prawidłowo zwierzęta zostały uśmiercone przez skrwawienie. Ok 50 µl krwi pełnej pobrano na EDTA i poddano analizom morfologicznym przy użyciu analizatora ABC Vet. Następnie wybrane organy (mózg, serce, płuca, wątroba, śledziona, nerki) oraz guz zostały wyizolowane, przepłukane w PBS oraz poddane opisowi makroskopowemu (wymiary, waga, opis nieprawidłowości organów).

Guzy podzielono na 3 równe części. Pierwszy fragment zabezpieczono w formalinie, a następnie procesowano go w celu przygotowania bloku parafinowego. Drugi fragment zabezpieczono w ciekłym azocie i zabezpieczono w -80°C. Trzeci fragment podzielono na dwie równe części, gdzie jedna część została zamrożona w ciekłym azocie w celu późniejszej izolacji białka, a drugą część zabezpieczono w Trizolu. W eksperymentach wykorzystano fragmenty guzów zamrożone w azocie.

## **7.2. Metody**

### **7.2.1. Analiza aktywności metabolicznej**

Aktywność metaboliczną wykonano na podstawie analizy aktywności mitochondrialnej dehydrogenazy. Ocenie poddano stopień konwersji soli tetrazolowej (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowego, MTT) do formazanu w żywych komórkach.

Komórki hodowano na płytkach 96-dołkowych zgodnie ze schematami opisanymi w rozdziale 4.1. W ostatnim dniu eksperymentu do każdego dołka dodano 10  $\mu$ l roztworu MTT (Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA) o stężeniu 5 mg/ml rozpuszczonym w PBS. Końcowe stężenie MTT, z którym komórki inkubowano przez 2 godziny w warunkach normoksji lub hipoksji, wynosiło 0.5 mg/ml. Po tym czasie, medium hodowlane usunięto, a kryształki formazanu powstałe w wyniku reakcji rozpuszczono w 50 mM roztworze HCl rozcieńczonym w izopropanolu. Kryształki rozpuszczały się przez min. 30 min w temperaturze 37°C. Po tym czasie wykonano pomiar gęstości optycznej przy długości fali 562 nm przy użyciu wielodołkowego spektrofotometru skaningowego Varioskan Lux (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Aktywność mitochondrialnej dehydrogenazy była wprost proporcjonalna do wyniku odczytu gęstości optycznej. Wyniki przedstawiono jako odsetek komórek nietraktowanych hodowanych odpowiednio w normoksji lub hipoksji.

### **7.2.2. Analiza proliferacji komórek**

Analiza proliferacji komórek została przeprowadzona przy użyciu testu Cell Proliferation ELISA, BrdU kit (Roche, Mannheim, Niemcy).

Bromodeoksyurydyna (ang. Bromodeoxyuridine, BrdU) jest syntetycznym analogiem jednego z nukleozydów pirymidynowych, tymidyny. W komórkach proliferujących BrdU ulega inkorporacji do DNA w czasie jego replikacji w fazie S cyklu komórkowego. BrdU inkorporowane do DNA wykrywa się przy pomocy przeciwciał. Jego detekcja jest możliwa tylko w częściowo zdenaturowanym DNA.

Komórki hodowano na płytkach 96-dołkowych zgodnie ze schematami opisanymi w rozdziale 4.1. W ostatnim dniu eksperymentu do każdego dołka dodano po 10  $\mu$ l, wcześniej rozcieńczonego w medium hodowlanym, w stosunku 1:100, roztworu BrdU. Stężenie końcowe BrdU, z którym przez 2h inkubowano komórki w warunkach normoksji lub hipoksji, wynosiło 100  $\mu$ M. Po zakończeniu inkubacji, komórki utrwalono przez 30 minut. Do utrwalenia wykorzystano zapewniony

przez producenta roztwór zawierający alkohol, co umożliwiło częściową denaturację DNA. W kolejnych etapach komórki inkubowano z roztworem przeciwciała wykrywającego BrdU, a następnie z roztworem substratu sprzężonego z peroksydazą chrzanową, wykrywającego powstałe kompleksy BrdU-przeciwciała. Wynikiem inkubacji z substratem była reakcja barwna, której produktem był roztwór o niebieskim zabarwieniu. Rozwój reakcji zahamowano poprzez dodanie 25  $\mu$ l 1M HCl. Intensywność koloru roztworu powstałego w wyniku przeprowadzonej reakcji była wprost proporcjonalna do ilości nowo powstałego DNA w czasie inkubacji z roztworem BrdU. Wszystkie etapy reakcji zostały przeprowadzone zgodnie z instrukcją producenta.

Wynik uzyskano za pomocą pomiaru gęstości optycznej wykonanej przy długości fali 450 nm. Do pomiaru wykorzystano wielodołkowy spektrofotometr skaningowy Varioskan Lux (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Wartość proliferacji była wprost proporcjonalna do wyniku odczytu gęstości optycznej. Wyniki przedstawiono jako odsetek komórek nietraktowanych hodowanych odpowiednio w normoksji lub hipoksji

### **7.2.3. Oznaczenie aktywności $\beta$ -Galaktozydazy związanej ze starzeniem komórkowym (SA- $\beta$ -Gal) na preparatach komórkowych**

Do oznaczenia aktywności SA- $\beta$ -Gal wykorzystano zmodyfikowany protokół przygotowany na podstawie publikacji Dimri i wsp. [200].

Po zakończeniu eksperymentu, komórki odklejono przy użyciu trypsyny (Gibco, Life Technologies Limited, Wielka Brytania). Trypsynę zneutralizowano przy użyciu pełnego medium hodowlanego. Następnie komórki wirowano 5 minut w RT przy prędkości 1200 obrotów/minutę (ang. Revolutions Per Minute, RPM). Nadsącz zlano, a komórki zawieszono w PBS (PanReac AppliChem; Darmstadt, Niemcy) i policzono przy użyciu komory Bürkera. 80 000 komórek utrwalano przy użyciu 1 ml roztworu 2% formaldehydu i 0.2% gluteraldehydu w PBS przez 5 minut w RT. Roztwór utrwalający zneutralizowano poprzez rozcieńczenie 5 ml PBS. Następnie komórki wirowano 5 minut z prędkością 1200 rpm. Nadsącz zlano, a pozostały osad komórkowy zawieszono w 100  $\mu$ l PBS (PanReac AppliChem; Darmstadt, Niemcy). Przygotowaną zawiesinę komórkową naniesiono na szkiełko podstawowe umieszczone w zestawie do cytospinizacji Cytoset (MPW Med. instruments, Warszawa, Polska). Komórki wirowano 5 minut w RT z prędkością 1100 rpm przy użyciu wirówki cytologicznej

MPW 341 (MPW Med. instruments, Warszawa, Polska). Następnie szkiełka podstawowe wyciągnięto z zestawu Cytoset i umieszczono w komorze wilgotnej. Przygotowane preparaty komórkowe inkubowano przez 16 godzin w 37°C z roztworem barwiącym zawierającym 1 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopiranozyd, 5 mM żelazocyjanek potasu, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub> i 0,1 M bufor fosforanowy o pH 6,0. Roztwór rozcieńczono przy użyciu wody dejonizowanej. Po zakończeniu inkubacji preparaty płukano 3-krotnie przez 5 minut w PBS (PanReac AppliChem; Darmstadt, Niemcy). Następnie nadmiar buforu usunięto, a preparaty zamknięto szkiełkami nakrywkowym przy użyciu medium zamykającego (Dako, Carpinteria, CA, USA). Komórki zobrazowano w świetle przechodzącym przy użyciu mikroskopu odwróconego Zeiss Axio Observer z kamerą kolorową AxioCam 506 color (Zeiss, Niemcy). Komórki SA- $\beta$ -Gal pozytywne i SA- $\beta$ -Gal negatywne zostały policzone dla każdego przygotowanego preparatu (dla każdego preparatu zliczono minimum 100 komórek). Wyniki przedstawiono jako odsetek komórek SA- $\beta$ -Gal pozytywnych w stosunku do wszystkich zliczonych komórek.

#### **7.2.4. Oznaczenie aktywności $\beta$ -Galaktozydazy (SA- $\beta$ -Gal) związanej ze starzeniem komórkowym na preparatach tkankowych**

Zamrożone w ciekłym azocie fragmenty guzów, zanurzono w buforze do krioprezerwacji OCT (Leica, Wetzlar, Niemcy), a następnie skrojono przy użyciu kriostatu. Fragmenty o grubości 6  $\mu$ m umieszczono na szkiełkach podstawowych SuperFrost (Eprexia, Runcorn, Wielka Brytania). Następnie szkiełka z materiałem tkankowym umieszczono w -80°C do czasu procesowania.

W celu przeprowadzenia barwienia oceniającego aktywność SA- $\beta$ -Gal, przed utrwaleniem szkiełka z materiałem tkankowym umieszczono na 30 minut w temperaturze 4°C, w celu ich rozmrożenia. Następnie fragmenty tkanki obrysowano markerem hydrofobowym (Merck, Darmstadt, Niemcy) i inkubowano przez 5 minut w RT z buforem utrwalającym. Skład buforu utrwalającego został opisany w rozdziale 7.2.3. Po inkubacji szkiełka z materiałem tkankowym płukano w RT 3-krotnie w PBS. Pozostałe procedury wykonano tak samo jak opisano w rozdziale 7.3.2.

Analizę powierzchni tkanki wybarwionej jako SA- $\beta$ -Gal pozytywną wykonano w programie imageJ. Zdjęcia w formacie TIFF przekonwertowano na obraz 8-bitowy. Do analiz zaznaczono tylko obszary, na których znajdowała się tkanka. Pomiar obszaru

wybarwionego pozytywnie wyznaczono przy stałych parametrów progowych (ang. Threshold).

### 7.2.5. Barwienia immunofluorescencyjne

Zamrożone w ciekłym azocie fragmenty guzów, zanurzone w buforze do krioprezewacji OCT (Leica, Wetzlar, Niemcy), a następnie skrojono przy użyciu kriostatu. Fragmenty o grubości 6  $\mu\text{M}$  umieszczono na szkiełkach podstawowych SuperFrost (Eprexia, Runcorn, Wielka Brytania). Następnie szkiełka z materiałem tkankowym umieszczono w  $-80^{\circ}\text{C}$  do czasu procesowania.

Zamrożone szkiełka, bezpośrednio po wyjęciu z zamrażarki  $-80^{\circ}\text{C}$ , utrwalano w 70% metanolu (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Metanol był wcześniej przechowywany w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ . Preparaty utrwalano przez 5 minut w RT. Następnie szkiełka pozostawiano do wysuszenia w RT. Po wysuszeniu, preparaty tkankowe nawadniano przez 15 minut w PBS w RT. Po nawodnieniu, szkiełka wysuszano z nadmiaru PBS, a fragmenty tkanek obrysowywano markerem hydrofobowym. Na fragmenty tkanek nałożono około 150  $\mu\text{l}$  buforu blokującego (roztwór 5% serum koziego i 0.05% Tween w PBS). Preparaty inkubowano z buforem blokującym w RT przez godzinę. Następnie bufor zlewano, a na tkanki nałożono ok. 100  $\mu\text{l}$  roztworu przeciwciał pierwszorzędowych. Przeciwciała pierwszorzędowe zawieszano w 10x rozcieńczonym buforze blokującym. Listę przeciwciał wraz z zastosowanymi rozcieńczeniami przedstawiono w Tabeli 4. inkubację z przeciwciałami pierwszorzędowymi prowadzono przez noc w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$ .

**Tabela 4. Spis przeciwciał wykorzystanych do wykonania barwień immunofluorescencyjnych.**

Białko wykrywane	Gospodarz zwierzęcy	Klonalność	Producent	Rozcieńczenie
HIF2 $\alpha$	Królik	Poliklonalne	Abcam (Cambridge, Wielka Brytania)	1:100
Ki67	Królik	Poliklonalne	Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA	1:100
CD45	Królik	Poliklonalne	Abcam (Cambridge, Wielka Brytania)	1:100
E-Kadheryna	Królik	Monoklonalne	Cell Signaling Technology, (Danvers, MA, USA)	1:100



Wimentyna	Królik	Monoklonalne	Cell Signaling Technology, (Danvers, MA, USA)	1:100
Lyve-1	Królik	Poliklonalne	Abcam (Cambridge, Wielka Brytania)	1:100

Po zakończeniu inkubacji preparaty były trzykrotnie płukane w PBS przez 5 minut w RT. Następnie fragmenty tkanki inkubowano z roztworem przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z fluorochromem Alexa Fluor 555 (AF555; ThermoFisher, Eugene, OR, USA). Przeciwciała drugorzędowe rozcieńczono w PBS w stosunku 1:100. inkubacja prowadzona była przez 2 godziny w RT. Po tym czasie preparaty płukano w PBS 3-krotnie przez 5 minut w RT. Następnie fragmenty tkanek były inkubowane przez 5 minut z roztworem Hoechst 33342 (ThermoFisher, Eugene, OR, USA). Barwnik rozpuszczony był w PBS w stosunku 1:10000. Po zakończeniu inkubacji szkiełka ponownie płukano 3-krotnie w PBS przez 5 minut w RT. Szkiełka osuszano z nadmiaru buforu i zamyknięto szkiełkiem nakrywkowym z użyciem medium zamykającego (Dako, Carpinteria, CA, USA).

Po nawodnieniu tkanki wszystkie inkubacje przeprowadzane były w komorze wilgotnej w celu uniknięcia wysuszenia preparatów. Na każdym etapie barwienia tkanki chroniono przed bezpośrednim działaniem światła.

Dla każdego preparatu przy okazji każdego barwienia przygotowano kontrole negatywną. Etapy przygotowania kontroli negatywnych były takie same jak w przypadku barwienia pozytywnego, z wyjątkiem etapu inkubacji z przeciwciałem pierwszorzędowym. Preparaty przygotowywane jako kontrola negatywna były inkubowane tylko z 10x rozcieńczonym buforem blokującym.

Tkankę zobrazowano w przy użyciu mikroskopu odwróconego Zeiss Axio Observer 7 z kamerą monochromatyczną Axiocam 503 mono (Zeiss, Niemcy). Do wizualizacji preparatów użyto układu filtrów ze zwierciadłem dichroicznym przedstawionych w Tabeli 5. Dla poszczególnych filtrów wskazano długość fali wzbudzenia (ang. Emmision wavelenght, EM), długość dzielnika wiązki (ang. Beamsplitter, BP) oraz długości fali emisji (ang. Excitation wavelenght, EX).

**Tabela 5. Opis filtrów wykorzystanych do wizualizacji preparatów fluorescencyjnych.**

Lp	Nazwa układu filtrów (wg. Producenta)	Długość fali wzbudzenia (nm)	Dzielnik wiązki (nm)	Długość fali emisji (nm)
I.	90 HE Led (DAPI)	385±15	405	425±15
II.	DsRed	545.5±12.5	570	605±35

Fluorescencję wybarwionych jąder komórkowych obserwowano przy użyciu filtra i (Tab. 5). Fluorescencję białek badanych obserwowano przy użyciu filtra iJ opisanego w (Tab. 5).

W celu porównania intensywności fluorescencji pomiędzy preparatami, w obrębie tego samego barwienia zastosowano ustawiono takie same czasy emisji i intensywności świecenia. Analizę obrazów mikroskopowych przeprowadzono w programie ZEN Blue ver. 3.6 (Zeiss, Niemcy).

W celu wykonania analizy liczbowej zdjęcia po zaimportowaniu do programu imageJ przekonwertowano z formatu RGB na obraz 8-bitowy. Analizę zdjęć jąder komórkowych i białek badanych wykonano oddzielnie. Do oceny wartości intensywności fluorescencji wykorzystano pomiar średniej wartości szarości (ang. Mean grey value).

Po wykonaniu pomiaru wartości pozyskane dla białka badanego odniesiono do wartości pozyskanych dla jąder komórkowych dla każdego zdjęcia indywidualnie. Takie same analizy zostały także wykonane dla kontroli negatywnej. Od wartości uzyskanych dla białka badanego odjęto średnią wartość uzyskaną dla kontroli negatywnej. Po odjęciu tej wartości od wyników pozyskanych dla poszczególnych zdjęć wyciągnięto średnią wartość, którą następnie przedstawiono na wykresie.

#### **7.2.6. Izolacja białka**

W celu izolacji białka komórki odklejono przy użyciu trypsyny (Gibco, Life Technologies Limited, Wielka Brytania). Trypsynę zneutralizowano pełnym medium hodowlanym. Następnie komórki wirowano 5 minut w RT przy prędkości 1200 rpm. Nadsącz zlano, a komórki zawieszono w PBS (PanReac AppliChem; Darmstadt, Niemcy) i policzono przy użyciu komory Bürkera. Następnie osad komórkowy przeniesiono do probówek typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml i zwirowano w RT przez 5 minut w prędkości 1200rpm. Nadsącz usunięto, a komórki zawieszono w buforze lizującym RIPA (Thermo Scientific, Rockford, iL, USA) wzbogaconym o mieszaninę inhibitorów proteaz (Thermo Scientific, Rockford, iL, USA) rozcieńczoną w stosunku 1:100. Następnie zawiesinę komórek zamrożono w temperaturze -20°C i przechowywano w takich warunkach przez minimum 24 godziny. Lizat komórkowy rozmrożono na lodzie i wirowano w 4°C przez 7 minut przy prędkości 10000 rpm, w celu oddzielenia pozostałości komórkowych od białka zawieszzonego w buforze lizującym. Nadsącz zawierający białko przeniesiono do czystych probówek. Po izolacji

nadsącz mrożono w  $-20^{\circ}\text{C}$  lub procesowano dalej, wcześniej oznaczając w nim stężenie białka.

W celu izolacji białka z guzów, tkanka wcześniej zamrożona w ciekłym azocie i przechowywana w  $-80^{\circ}\text{C}$ , została rozmrożona na lodzie. Następnie do tkanki dodano, w zależności od wielkości fragmentu, 300-500  $\mu\text{l}$  buforu lizującego RIPA (Thermo Scientific, Rockford, iL, USA) wzbogaconego o mieszaninę inhibitorów proteaz (Thermo Scientific, Rockford, iL, USA), rozcieńczoną w stosunku 1:100. Następnie w naczyniu zawierającym tkankę i bufor umieszczono metalową kulkę homogenizacyjną o średnicy 0.5 cm (Qiagen, Hilden, Niemcy). Tkanki poddano homogenizacji przy użyciu homogenizatora Tissue Lyser iL (Qiagen, Hilden, Niemcy). Wykonano trzy cykle homogenizacji (30 sekund/30 Hz). Następnie wstępnie zhomogenizowaną tkankę pozostawiono na minimum 30 minut na lodzie w celu oceny stopnia homogenizacji. W przypadku, kiedy homogenizacja nie była kompletna, do roztworu dodano 100  $\mu\text{l}$  buforu RIPA z inhibitorami proteaz, a homogenaty ponownie zamrożono w  $-80^{\circ}\text{C}$  na 24 godziny. Po tym czasie homogenaty rozmrażano i ponownie poddano trzem cyklom homogenizacji (30 sekund/30 Hz). Homogenaty pozostawiono na minimum 30 minut na lodzie. Z fiolek usunięto kulki homogenizacyjne, a roztwór zwirowano w  $4^{\circ}\text{C}$  przez 7 minut przy prędkości 10000 rpm, w celu oddzielenia pozostałości tkanek od roztworu buforu zawierającego wyizolowane białko. Nadsącz zawierający białko przeniesiono do czystych próbek. Po izolacji nadsącz mrożono w  $-20^{\circ}\text{C}$  lub procesowano dalej, wcześniej oznaczając w nim stężenie białka.

#### **7.2.7. Oznaczenie stężenia białka metodą BCA**

Oznaczenie stężenia białka przeprowadzono metodą z kwasem bis-cynchoninowym (BCA) przy użyciu zestawu Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, iL, USA). W środowisku zasadowym białka redukują jony miedzi  $\text{Cu}^{2+}$  do jonów  $\text{Cu}^{+}$ . W wyniku reakcji BCA z  $\text{Cu}^{+}$  powstaje roztwór o barwie fioletowej, którego intensywność jest wprost proporcjonalna do ilości białka w badanym roztworze.

Lizaty białkowe rozcieńczano w stosunkach od 1:50 do 1:10 w PBS. Reakcję dla każdej próbki przeprowadzono w tryplikatach. Do przygotowania krzywej standardowej w zakresie 0-2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  wykorzystano albuminę surowicy bydlęcej (BSA; Biowest, Nuaille, Francja). W celu przeprowadzenia reakcji do 5  $\mu\text{l}$  próbki dodano 100

$\mu\text{l}$  roztworu BCA, a następnie prowadzono inkubację 15 minutową w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$ . Stężenie białka obliczano na podstawie pomiaru gęstości optycznej przy długości fali 562 nm wykonanego przy użyciu wielodołkowego spektrofotometru skaningowego Varioskan Lux (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

### **7.2.8. Analiza hipertrofii**

Hipertrofię komórek, czyli ilość białka przypadającego na jedną komórkę, obliczono poprzez podzielenie wartości stężenia białka całkowitego oznaczonego na podstawie analizy BCA (stężenia białka w  $1\mu\text{l}$  pomnożono razy objętość uzyskanego lizatu białkowego) przez całkowitą liczbę komórek zebraną w danym eksperymencie.

### **7.2.9. Analiza Western Blot**

W celu analizy ekspresji białek przeprowadzono kilkietapową analizę hybrydyzacji typu western. W pierwszej kolejności przeprowadzono denaturujący rozdział mieszaniny białek wyizolowanych z badanego materiału zgodnie z ich masą cząsteczkową w żelu poliakrylamidowym. Po rozdzieleniu, pod wpływem pola elektrycznego białka przenoszono na membranę nitrocelulozową. Białka wykrywano dwustopniowo przy pomocy specyficznych przeciwciał pierwszorzędowych skierowanych przeciw badanemu białku oraz przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z peroksydazą chrzanową. Następnie białka wizualizowano na kliszy fotograficznej dzięki zajściu reakcji chemiluminescencyjnej między peroksydazą sprzężoną z przeciwciałem drugorzędowym, a z substratem zawartym w odczynniku do wywoływania.

W celu wykonania analizy Western Blot przygotowano odpowiednie rozcieńczenia białka z użyciem 4x stężonego buforu Laemmli SDS (Bio-Rad, Hercules, CA, USA lub EurX, Polska) oraz PBS (PanReac AppliChem; Darmstadt, Niemcy). Rozcieńczone białko poddawano denaturacji w temperaturze  $95^{\circ}\text{C}$  przez 5 min. Następnie roztwory białka w objętości zawierającej odpowiednio od 10 do 50  $\mu\text{g}$  oraz marker wielkości białka (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) umieszczono w studzienkach żelu poliakrylamidowego w celu przeprowadzenia elektroforezy żelowej.

Elektroforeza żelowa miała na celu rozdzielenie białek zgodnie z ich wielkością, gdzie białka o największej masie molekularnej migrowały w żelu najwolniej. Do elektroforezy wykorzystano samodzielnie przygotowane żele składające się z 5% żelu

zagęszczającego oraz żelu rozdzielającego o gęstości 12% lub 15%. Wybór stężenia żelu zależał od masy molekularnej masy najmniejszego badanego białka. Jeżeli masa molekularna białka była  $> 20$  kDa stosowano żel 15%. Proporcje składników wykorzystane do przygotowania żeli przedstawiono w Tabeli 6.

**Tabela 6. Opis składu żeli poliakrylamidowych wykorzystanych do elektroforezy żelowej.**

Składnik	Gęstość żelu		
	5%	12%	15%
30% akrylamid	1.3 ml	4 ml	5 ml
1M Tris-HCl o pH 6,8	1.25 ml	-	-
1M Tris-HCl o pH 8.8	-	3.8 ml	3.8 ml
Woda dejonizowana	7.34 ml	2.2 ml	1.2 ml
10% APS	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
20% SDS	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml
TEMED	0.01 ml	0.01 ml	0.01 ml

Elektroforezę żelową przeprowadzono przy użyciu aparatu Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Reakcję przeprowadzono w obecności buforu TRIS-glicyna-SDS (TGS). TGS przygotowano z 10-krotnie zatężonego roztworu o pH 8.3 zawierającego 25 mM Tris-HCl, 0.2 M glicyny, oraz 0.05% SDS poprzez rozcieńczenie wodą destylowaną. Elektroforezę przeprowadzono w RT przy stałych napięciach: 100 V (kiedy próbki migrowały przez żel zagęszczający), a następnie 150 V (kiedy próbki migrowały przez żel rozdzielający).

Po zakończeniu elektroforezy przeprowadzono transfer białek na membranę nitrocelulozową (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) przy użyciu Mini-Trans Blot Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Kanapkę złożoną z bibuły Whatman'a, membrany i żelu, ułożono pomiędzy elektrodami, tak aby umożliwić migrację białek o ładunku dodatnim na membranę w kierunku elektrody o ładunku ujemnym (katody). Jako bufor do transferu wykorzystano bufor Tris-Glycine (TG; Avantor, Gliwice, Polska) z metanolem (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Transfer prowadzono przy stałym natężeniu 350 mA przez 90 minut w 4°C.

Po transferze membranę wybarwiono w buforze Ponceau-S (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) w celu wizualizacji rozdziału białek. Następnie membrany wypłukano z barwnika przy użyciu buforu TBST (ang. Tris Buffered Saline with Tween) o składzie: 30 mM TrisHCl, 75 mM NaCl, Tween 20 o pH=7,6. Po wypłukaniu barwnika membrany blokowano przez 1 godzinę w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w TBST w RT. Po blokowaniu membrany 3-krotnie płukano w buforze TBST i inkubowano w roztworze przeciwciał pierwszorzędowych w 4°C przez noc. Listę przeciwciał wykorzystanych w analizach przedstawiono w Tabeli 7. Wszystkie przeciwciała, z wyjątkiem GAPDH, rozcieńczono w 5% roztworze BSA z dodatkiem 0.01% azydku sodu w stosunku 1:1000. Przeciwciało wykrywające GAPDH rozcieńczono w stosunku 1:10000. Po zakończeniu inkubacji, membrany 3-krotnie płukano w buforze TBST, a następnie inkubowano w roztworze przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z peroksydazą chrzanową wykrywających odpowiednio przeciwciała mysie (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) lub królicze (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Przeciwciała drugorzędowe rozcieńczono w stosunku 1:10000 w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w TBST. Inkubację prowadzono w RT przez minimum 1 godzinę. Następnie membrany płukano 3-krotnie w buforze TBST. Białka zwizualizowano na błonach RTG Carestream (Kodak, Rochester, NY, USA) przy użyciu substratu chemiluminescencyjnego (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA lub Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Analizę ilościową ekspresji białek przeprowadzono na podstawie densytometrii wykonanej w programie imageJ

**Tabela 7. Spis przeciwciał pierwszorzędowych wykorzystanych do analizy Western Blot i barwień immunofluorescencyjnych.**

Białko wykrywane	Gospodarz zwierzęcy	Klonalność	Miejsce fosforylacji	Producent
ALDH1A1	Królik	Poliklonalne	-	LifeSpan Biosciences, (Seattle, WA, USA)
Cyklina B	Królik	Monoklonalne	-	Cell Signaling Technology, (Danvers, MA, USA)
GAPDH	Mysz	Monoklonalne	-	Millipore, (Temecula, CA, USA)

GPx-1	Królik	Poliklonalne	-	Abcam, (Cambridge, Wielka Brytania)
HIF1 $\alpha$	Mysz	Monoklonalne	-	Santa Cruz Biotechnology, (Dallas, TX, USA)
HO-1	Królik	Poliklonalne	-	Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, USA)
LC3B	Królik	Poliklonalne	-	Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA
Nanog	Królik	Monoklonalne	-	Cell Signaling Technology, (Danvers, MA, USA)
p-cdc2	Królik	Monoklonalne	Tyr15	Cell Signaling Technology, (Danvers, MA, USA)
p-Rb	Królik	Poliklonalne	Ser807/811	Cell Signaling Technology, (Danvers, MA, USA)
p-S6	Królik	Monoklonalne	Ser235/236	Cell Signaling Technology, (Danvers, MA, USA)
p16	Mysz	Monoklonalne	-	Santa Cruz Biotechnology, (Dallas, TX, USA)
p21	Królik	Monoklonalne	-	Cell Signaling Technology, (Danvers, MA, USA)
p21	Mysz	Monoklonalne	-	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
p53	Mysz	Monoklonalne	-	Santa Cruz Biotechnology, (Dallas, TX, USA)
p62	Mysz	Monoklonalne	-	BD Transduction Laboratories™,

				(Lexington, KY, USA)
p62	Mysz	Monoklonalne	-	Santa Cruz Biotechnology, (Dallas, TX, USA)
PARP-1	Mysz	Monoklonalne	-	BD Transduction Laboratories™, (Lexington, KY, USA)
PTEN	Królik	Monoklonalne	-	Cell Signaling Technology, (Danvers, MA, USA)
p-PTEN	Królik	Monoklonalne	Ser380/Thr382/Thr 383	Cell Signaling Technology, (Danvers, MA, USA)

#### 7.2.10. Analiza SASP

Test immunoenzymatyczny (ang. Enzyme-Linked immunosorbent Assay, ELISA) opiera się na wykorzystaniu enzymów do wykrywania reakcji antygenów ze swoistymi przeciwciałami. Studzienki płytki opłaszczą się odpowiednim przeciwciałem, a następnie w celu zapobiegnięcia niespecyficznemu wiązaniu się białek przeprowadza się inkubację np. z albuminą. Reakcję antygen-przeciwciało uwidacznia się wykorzystując reakcję barwną poprzez zastosowanie enzymu np. peroksydazy chrzanowej. Zmianę intensywności barwy mierzy się spektrofotometrycznie. Wyniki kalibruje względem prób kontrolnych tworzących krzywą standardową. Pozwala to na określenie ilości produktu reakcji.

Sekrecję cytokin VEGF, IL-8, katepsyny-S, IGFBP-3 i osteopontyny oznaczono w medium zebranych z hodowli eksperymentalnych. Pożywkę zebraną z hodowli poddano wirowaniu przez 5 min w RT przy prędkości 1200 rpm, w celu pozbycia się zanieczyszczeń komórkowych. Następnie odwirowane medium przeniesiono do czystych probówek. Tak przygotowaną pożywkę mrożono w temperaturze -20°C.

Sekrecję cytokin w medium hodowlanym oceniano na podstawie testu kolorymetrycznego typu ELISA do samodzielnego opłaszczania dołków przeciwciałem typu Duo-Set (R&D Systems, MN, USA). Każdą próbkę analizowano w dwóch powtórzeniach technicznych.



Produkcję cytokin VEGF, IL-8, Katepsyny-S, IGFBP-3, osteopontyny, FGF23 oraz i-CAM1 w tkance guza oznaczono z wykorzystaniem białka wyizolowanego zgodnie z opisem przedstawionym w rozdziale 7.2.6. Do analiz wykorzystano taką samą ilość białka całkowitego dla każdej badanej próbki. Ilości białka całkowitego wykorzystanego do reakcji przedstawiono w tabeli 8.

**Tabela 8. Ilość białka całkowitego wykorzystanego do analizy produkcji czynników SASP w tkance guza.**

Białko wykrywane	Ilość białka całkowitego
VEGF	50 µg
IL-8	50 µg
Katepsyna-S	1 µg
IGFBP-3	10 µg
Osteopontyna	1 µg
FGF23	50 µg
I-CAM1	10 µg

Każdą próbkę analizowano w dwóch powtórzeniach technicznych. Do oceny produkcji VEGF, IL-8, IGFBP-3, osteopontyny, FGF23 oraz i-CAM1 wykorzystano testy kolorymetryczne typu ELISA do samodzielnego opłaszczania dołków przeciwciałem przechwytyjącym typu Duo-Set (R&D Systems, MN, USA). Do oznaczenia produkcji katepsyny-S wykorzystano test kolorymetryczny typu ELISA gdzie dostępna była płytką z dołkami pokrytymi przeciwciałem przechwytyjącym (LS-Bio, Seattle, WA, USA).

Jeżeli niedostępna była płytką opłaszczona przeciwciałem, w pierwszym kroku przygotowywano odpowiedni roztwór specyficznego przeciwciała w PBS. Rozcieńczenie przygotowywano zgodnie z instrukcją producenta. Płytki inkubowane były z przeciwciałem przez noc w RT, w ciemności. Następnie płytki płukano 3-krotnie wskazanym przez producenta buforem płuczającym. Po wypłukaniu płytki inkubowano przez godzinę w RT z odpowiednim roztworem blokującym wskazanym przez producenta. Inkubacja ta miała na celu uniemożliwienie wiązania się niespecyficznych białek. Po zakończeniu inkubacji, płytki płukano 3-krotnie wskazanym przez producenta buforem płuczającym. Następnie przeprowadzono 2-godziną inkubację z próbkami badanymi w RT w ciemności, po której płytki ponownie płukano 3-krotnie odpowiednim roztworem blokującym wskazanym

przez producenta. W kolejnym kroku przeprowadzono inkubację z przeciwciałem wykrywającym rozcieńczonym odpowiednio zgodnie z instrukcją zapewnioną przez producenta. inkubacja trwała godzinę i prowadzono ją w RT w ciemności. Po zakończeniu inkubacji płytki 3-krotnie wypłukano, a następnie przeprowadzono inkubację z roztworem streptawidyny sprzężonej z peroksydazą chrzanową. Rozcieńczenie enzymu przygotowano zgodnie z instrukcją producenta. inkubację prowadzono przez 20 minut w RT w ciemności. Następnie przeprowadzono reakcję barwną z wykorzystaniem odpowiedniego substratu. Rozwój reakcji zahamowano poprzez dodanie 25  $\mu$ l 1M HCl.

W wyniku przeprowadzonych testów otrzymano roztworu o zabarwieniu żółtym. intensywność koloru była wprost proporcjonalna do ilości badanego białka sekrecyjnego w danym dołku. Pomiar gęstości optycznej wykonano przy długości fali 450 nm na wielodołkowym spektrofotometrze skaningowym Varioskan Lux (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Przy analizie wyników uwzględniono zastosowane rozcieńczenie badanej próbki i ilość zebranej pożywki

#### **7.2.11. Analiza morfologii komórek i cyklu komórkowego z wykorzystaniem cytometrii przepływowej**

Cytometria przepływowa jest techniką analityczną pozwalającą na pomiar rozproszenia światła lub sygnału fluorescencji przez odpowiednio naświetlone komórki. Umożliwia ona jakościowy i ilościowy pomiar właściwości fizycznych i biologicznych komórek. Zawiesina komórek, uformowana w cienki strumień, zostaje zaciągnięta do komory pomiarowej, gdzie każda komórka poddawana jest działaniu wiązki lasera. Światło uległo rozproszeniu, a fluorochrom przyłączony do komórek ulega wzbudzeniu. Powstałe sygnały zostają następnie przechwycone przez odpowiednie detektory.

Na układ optyczny składają się: źródło światła (laser), układ kształtujący i ogniskujący wiązkę laserową na komórce oraz optyka zbierająca, której zadaniem jest odfiltrowanie poszczególnych długości fal oraz zogniskowanie promieni świetlnych na fotokatodzie detektorów.

Na podstawie sygnału z detektora FSC (ang. Forward Scatter Characteristics, FSC) rejestrującego rozproszenie światła zgodnie z przepływem wiązki laserowej określa się wielkość komórek. Rozproszenie światła pod kątem 90° przy użyciu detektora SSC (ang. Side Scatter Characteristics, SSC) służy do określenia ziarnistości komórek.

Aby uzyskać dodatkowe informacje (np. określenie fazy cyklu, w której znajduje się komórka) stosuje się odpowiednie znaczniki fluorescencyjne. Do oceny intensywności fluorescencji używa się specjalnych detektorów światła fluorescencyjnego.

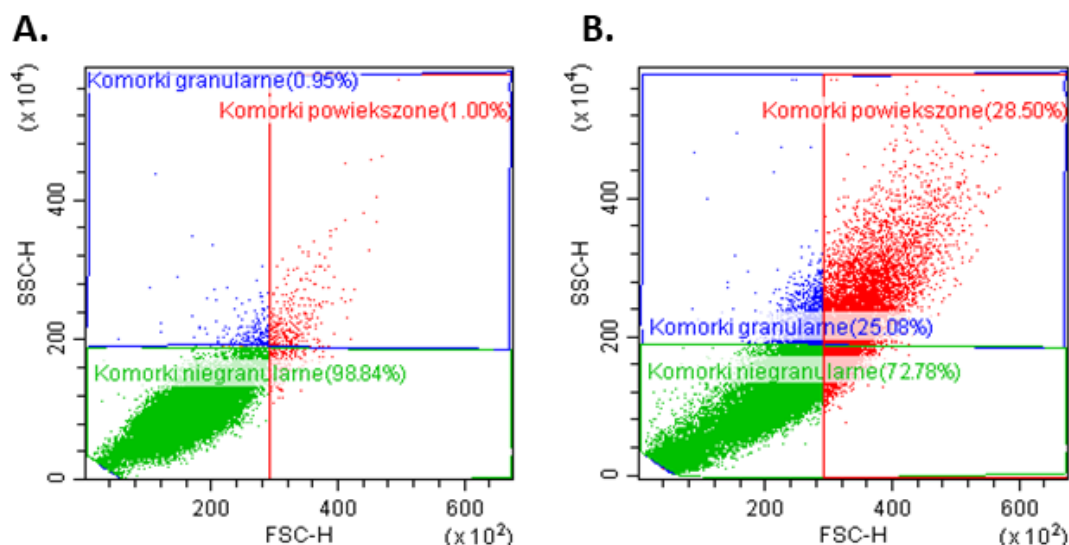
Cytometria przepływowa została wykorzystana do pomiaru ziarnistości i wielkości komórek oraz ich rozkładu w cyklu komórkowym, na podstawie analizy ilości DNA w komórce. W celu przeprowadzenia analiz komórki odklejono przy użyciu trypsyny (Gibco, Life Technologies Limited, Wielka Brytania). Trypsynę zneutralizowano pełnym medium hodowlanego. Następnie komórki wirowano w RT przez 5 minut w prędkości 1200 rpm. Nadsącz zlano, a komórki zawieszono w 500  $\mu$ l PBS (PanReac AppliChem; Darmstadt, Niemcy). W celu utrwalenia komórek do ich zawiesiny dodano 4,5 ml 70% etanolu (etanol był wcześniej przechowywany w  $-20^{\circ}\text{C}$ ). Utrwalone komórki zamrożono w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  i przechowywano tak przez co najmniej 24 godziny.

W celu wybarwienia DNA, utwalone komórki wirowano w RT przez 5 minut w prędkości 1200rpm w celu usunięcia etanolu. Następnie nadsącz zlano, komórki przemyto 2 ml PBS i odwirowano w RT przez 5 minut w prędkości 1200rpm. Po odwirowaniu PBS zlano, a komórki zawieszono w 200  $\mu$ l odczynnika Muse<sup>TM</sup> Cell Cycle Reagent (Millipore, Hayward, CA) zawierającego jodek propidyny (ang. Propidium iodide, PI). PI jest barwnikiem fluorescencyjnym interkalującym pomiędzy dwoma zasadami dwuniciowego DNA. intensywność sygnału fluorescencyjnego jest proporcjonalna do ilości DNA w komórce, na podstawie czego można określić, w której fazie cyklu znajduje się komórka.

Analizę przeprowadzono przy użyciu cytometru przepływowego Beckman Coulter CytoFLEX (Brea, CA, USA) i oprogramowania CytExpert (Brea, CA, USA). Dla każdej analizy próbki zebrano co najmniej 50000 zdarzeń.

#### **7.2.11.1. Strategia bramkowania komórek granularnych i komórek powiększonych**

Do analizy populacji komórek powiększonych i granularnych wykorzystano sygnały wynikające z rozproszenia światła przechwycone przez detektory FSC i SSC.

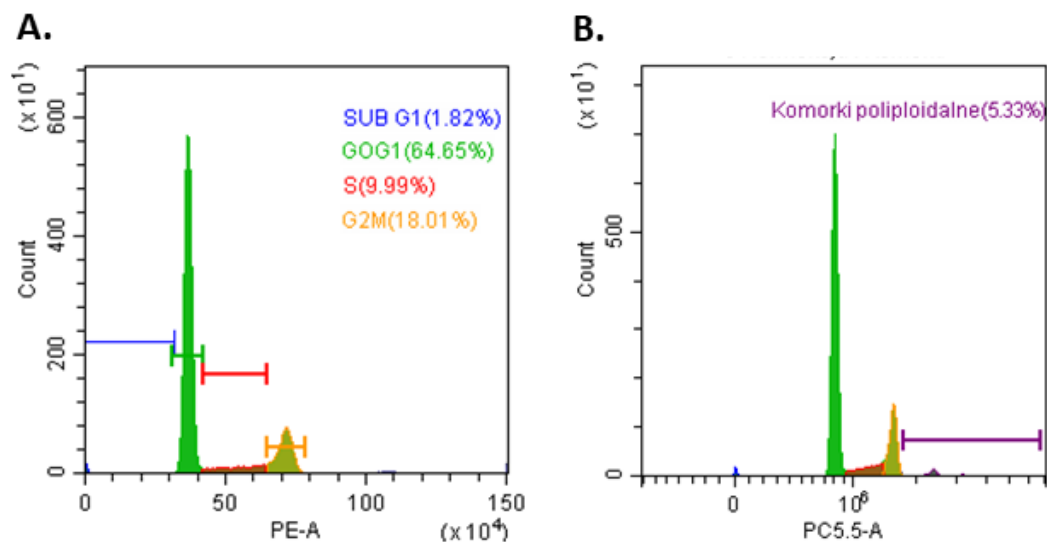


**Figura 7. Strategia bramkowania komórek granularnych i powiększonych.**  
**A.** Komórki nietraktowane; **B.** Komórki traktowane VIN.

W pierwszej kolejności z analizy wyłączono zdarzenia o bardzo niskich wskaźnikach FSC i SSC, zlokalizowane w lewym dolnym rogu wykresu typu Dot-Plot, tuż pod uwidoczną główną populacją komórek. Na podstawie tych samych parametrów, na wykresie przedstawiającym komórki nietraktowane, ustawiono bramki, określające ziarnistość, gdzie oznaczona populacja nie przekroczyła 1% wszystkich zdarzeń. Analogicznie ustawiono bramkę dla komórek powiększonych. Ustalone bramki przekopiowano do wykresów opisujących pozostałe badane próbki. Strategię bramkowania zaprezentowano na figurze 7.

#### 7.2.11.2. Strategia bramkowania faz cyklu komórkowego i poliploidii

Na podstawie intensywności fluorescencji PI (sygnał zarejestrowany po wzbudzeniu laserem niebieskim (488 nm) przy użyciu filtra FL2 o emisji  $585 \pm 21$  nm (nazwa filtra według producenta 585/42 BP) możliwa była ocena ilości DNA w komórce. Na jej podstawie zarejestrowane zdarzenia przypisano do odpowiedniej fazy cyklu komórkowego (Fig. 8A). W pierwszej kolejności oznaczono piki opisujące odpowiednio patrząc od lewej fazę G0/G1 i G2/M. Pomiędzy nimi zaznaczono komórki w fazie S. Przed pikiem G0/G1 zlokalizowany był sygnał dla komórek w fazie sub-G1. Za pikiem G2/M, na oddzielnym histogramie, oznaczono komórki poliploidalne (Fig. 8B). Wyniki przedstawiono jako odsetek komórek ziarnistych, odsetek komórek powiększonych oraz odsetek komórek w odpowiadającej fazie cyklu komórkowego w stosunku do wszystkich niewykluczonych z analizy zdarzeń.



**Figura 8. Strategia bramkowania komórek w fazach cyklu komórkowego i komórek poliploidalnych.**

**A.** Bramkowanie komórek w fazach cyklu komórkowego; **B.** Startegia bramkowania komórek poliploidalnych.

#### 7.2.12. Analiza aktywności lizosomalnej

LysoTracker® Red DND-99 (Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad CA, USA), dalej nazywany LysoTrackerem jest hydrofobowym barwnikiem fluorescencyjnym, który selektywnie gromadzi się w pęcherzykach o pH kwaśnym, głównie w endosomach i lizosomach. Barwnik ten najczęściej stosowany jest do wykrywania lizosomów w żywych komórkach. LysoTracker wchodzi do komórki w wyniku prostej dyfuzji. Po wejściu do lizosomu, ze względu na jego kwaśne pH barwnik zostaje protonowany, dlatego jest wyraźnie sekwestrowany w lizosomach [201].

Komórki hodowane zgodnie ze schematem opisanym w rozdziale 7.1.2.2. 24 godziny i 72 godziny po podaniu HCQ inkubowano przyżyciowo przez 60 minut z 1  $\mu$ M roztworem LysoTrackera rozpuszczonym w medium hodowlanym w warunkach normoksji i hipoksji. 5 minut przed końcem barwienia z LysoTrackerem do pożywki dodano barwnik Hoechst 33342 (ThermoFisher, Eugene, OR, USA) o końcowym stężeniu 1  $\mu$ g/ml w celu wybarwienia jąder komórkowych. W celu przygotowania kontroli niebarwionych w połowie hodowli wykonano tylko barwienie jąder komórkowych z użyciem Hoechst 33342.

Efekt barwienia, w pierwszej kolejności zobrazowano za pomocą Zeiss Axio Observer 5 z kamerą AxioCam 506 color (Zeiss, Niemcy) i oprogramowania ZEN Blue v 3.1 (Zeiss, Niemcy). Do wizualizacji preparatów użyto układu filtrów ze

zwierciadłem dichroicznym przedstawionych w Tabeli 5 w Rozdziale 7.2.5. Fluorescencję wybarwionych jąder komórkowych obserwowano przy użyciu filtra i opisanego w tabeli 5 (Roz. 7.2.5) Fluorescencję wybarwionych lizosomów obserwowano przy filtra II opisanego w tabeli 5 (Roz. 7.2.5).

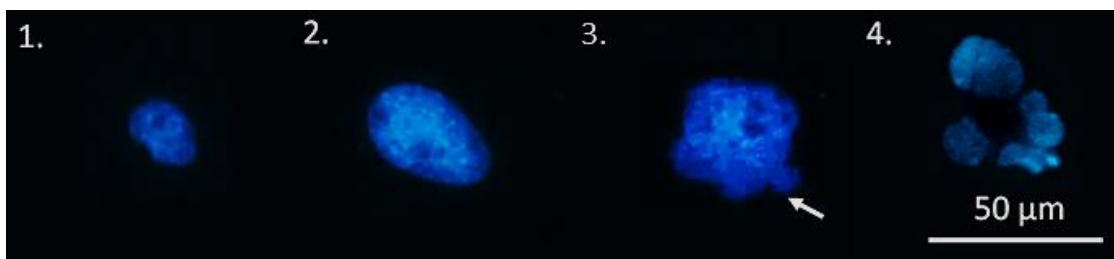
Następnie komórki odklejono przy użyciu trypsyny (Gibco, Life Technologies Limited, Wielka Brytania). Trypsynę zneutralizowano przy użyciu pełnego medium hodowlanego. Komórki wirowano przez 5 minut w RT przy prędkości 1200 rpm. Nadsącz zlano a komórki zawieszono w 100  $\mu$ l PBS. Następnie komórki analizowano przy użyciu cytometru przepływowego Beckman Coulter CytoFLEX (Brea, CA, USA). Analizę intensywności fluorescencji przeprowadzono za pomocą programu CytExpert (Brea, CA, USA). Analizę przeprowadzono na podstawie sygnału zarejestrowanego po wzbudzeniu fluorescencji laserem niebieskim (488 nm) przy użyciu filtra (EM 585 $\pm$ 21) (nazwa filtra według producenta 585/42 BP). W celu eliminacji wpływu autofluorescencji komórek, wyniki przedstawiono jako względną wartość średniej intensywności fluorescencji (ang. Delta Mean Fluorescence intensity,  $\Delta$ MFI) wyrażoną jako różnica między wartościami pozyskanymi dla próbek wybarwionych i niewybarwionych LysoTracker® Red DND-99.

#### **7.2.12.1. Analiza morfologii jąder komórkowych**

Morfologia jąder komórkowych została oceniona na podstawie obrazów mikroskopowych po barwieniu Hoechst 33342 (ThermoFisher, Eugene, OR, USA) opisanym w rozdziale 7.2.13. W celu analizy dla każdego warunku zliczono min 100 komórek. Zidentyfikowano cztery rodzaje komórek:

1. Komórki z jądrami komórkowymi o normalnej wielkości,
2. Komórki z jądrami komórkowymi powiększonymi, gdzie badane organella były minimum 2 razy większe niż w punkcie 1,
3. Komórki z jądrami komórkowymi pączkującymi,
4. Komórki wielojądrzaste.

Przykłady morfologii jąder komórek przedstawiono na figurze 9. Wyniki analiz przedstawiono jako odsetek komórek o danej morfologii jądra komórkowego w stosunku do wszystkich zliczonych komórek.



**Figura 9. Zdjęcia reprezentatywne przedstawiające morfologię jąder komórkowych.**

1. Komórki z normalnej wielkości jądrami komórkowymi; 2. Komórki z powiększonymi jądrami komórkowymi (minimum 2 razy większe niż jądra o normalnej morfologii); 3. Komórki z pączkującymi jądrami komórkowymi, strzałką zaznaczono pączkowanie jądra; 4. Komórki wielojądrzaste. Jądra komórkowe wybarwiono przy użyciu barwnika Hoechst 33342. Zdjęcia wykonano przy użyciu odwróconego mikroskopu fluorescencyjnego o następujących parametrach EX 385±10nm, BP 405 nm, EM 425±15. Wartość skali 50 μm.

### 7.2.13. Izolacja RNA

Komórki hodowane zgodnie ze schematami opisanymi w rozdziałach 7.1.2 i 7.1.2.2. zebrano odpowiednio 5 dni od podania chemioterapii lub 24 godziny po podaniu HCQ. W tym celu komórki zalano 650 μl buforu do lizy komórek RLT (Qiagen, Hilden, Niemcy) po wcześniejszym usunięciu pożywki. Lizat komórkowy przeniesiono do fiolek typu eppendorf o pojemności 2 ml i natychmiast zamrożono w temperaturze -80°C. Lizaty pozostały zamrożone przez minimum 24 godziny. Następnie lizaty rozmrożono na lodzie. RNA zostało wyizolowane przy użyciu zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy) zgodnie z instrukcją producenta. Bezpośrednio po izolacji stężenie RNA zmierzono metodą spektrofotometryczną przy użyciu skaningowego spektrofotometru Varioskan Lux (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Pomiar wykonano przy długościach fali 230, 260 i 280 nm. Stopień degradacji RNA oceniono przy użyciu Fluorometru Qubit (Invitrogen, Waltham, MA, USA). RNA wybarwiono przy użyciu zestawu Qubit™ RNA High Sensitivity (HS), Broad Range (BR), and Extended Range (XR) Assay Kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA). Próbkę o wskaźniku RNA iQ > 7 zostały poddane analizie NGS i analizie ekspresji genów metodą RT-PCR. Po izolacji RNA przechowywano w -80°C.

### 7.2.14. Odwrotna transkrypcja

W celu syntezy cDNA przeprowadzono proces odwrotnej transkrypcji. Po wykonaniu pomiaru stężenia RNA, próbki rozcieńczono wodą wolną od nukleaz tak aby w 10 μl znalazło się od 1 μg-1.5μg RNA. Następnie do roztworu RNA dodano 10 μl miksu reakcyjnego (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Baltics, UAB,

Litwa). Skład miksu reakcyjnego na jedną reakcję przedstawiono w Tabeli 13. Końcowa objętość próbki wynosiła 20  $\mu$ l. Mieszaniny reakcyjne oraz próbki przygotowano na bloku chłodzącym w komorze o ograniczonym przepływie powietrza (Biosan, Warren, MI).

**Tabela 9 Skład mieszaniny reakcyjnego stosowany do odwrotnej transkrypcji.**

Składnik	Objętość
<b>Bufor RT 10X</b>	2 $\mu$ l
<b>Miks dNTP (100 mM) 25X</b>	0.8 $\mu$ l
<b>Przypadkowe startery RT 10X</b>	2 $\mu$ l
<b>Odwrotna transkryptaza MultiScribe™</b>	1 $\mu$ l
<b>Woda wolna od nukleaz</b>	4.2 $\mu$ l
<b>Całkowita objętość na reakcję</b>	10 $\mu$ l

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono w termobloku zgodnie z protokołem przedstawionym w Tabeli 14. Po zakończeniu reakcji próbki rozcieńczono 5x i zamrożono w  $-20^{\circ}\text{C}$  do czasu przeprowadzenia reakcji RT-PCR.

**Tabela 10 Protokół przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji.**

Ustawienie	Etap 1	Etap 2	Etap 3	Etap 4
<b>Temperatura</b>	25°C	37°C	85°C	4°C
<b>Czas</b>	10 minut	120 minut	5 minut	$\infty$

### 7.2.15. Ilościowa reakcja łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym – RT-PCR

W celu oceny ekspresji genów przeprowadzono reakcję RT-PCR. Reakcje przeprowadzono w płytkach 384-dołkowych przeznaczonych do reakcji RT-PCR (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) przy użyciu termocyklera CFX Touch 414-well (Bio-Rad, Hercules, CA). Do reakcji wykorzystano cDNA przygotowane zgodnie z opisem przedstawionym w rozdziale CC. Do przeprowadzenia reakcji wykorzystano SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Objętość końcowa mieszaniny reakcyjnej wynosiła 10  $\mu$ l. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w Tabeli 11. Sekwencje primerów wykorzystanych w reakcji RT-PCR



przedstawiono w Tabeli 12. Każda próbka analizowana była w dwóch powtórzeniach technicznych. Protokół reakcji RT-PCR przedstawiono w tabeli 13.

**Tabela 11. Skład mieszaniny reakcyjnej do przeprowadzenia reakcji RT-PCR.**

<b>Składnik</b>	<b>Objętość</b>
<b>SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix 2X</b>	5 $\mu$ l
<b>Primer F</b>	0.5 $\mu$ l
<b>Primer R</b>	0.5 $\mu$ l
<b>Woda wolna od nukleaz</b>	3 $\mu$ l
<b>cDNA</b>	1 $\mu$ l
<b>Całkowita objętość na reakcję</b>	10 $\mu$ l

**Tabela 12. Sekwencje primerów wykorzystane do przeprowadzenia reakcji RT-PCR.**

<b>Gen</b>	<b>Rodzaj Primera</b>	<b>Sekwencja</b>
GAPDH	R	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG
	F	GGAGCGATCCCTCCAAAAT
PLK-1	R	GGGGGTTCTCCAAGCCTTTA
	F	CCATCACCTGCCTGACCATT
CDC20	R	ACCATGCTACGGCCTTGAC
	F	ATGGACGACATTTGGCCAGT
GTSE1	R	TCATCCATGTTACGTCCCC
	F	GTCTGCCGCTTTGGTGACT
NEK2	R	CAGGTCCTTGCACTTGGACT
	F	TCTCTGGCAAGTAATCCAGAACT
IGFBP3	R	CCGACTCACTAGCATTTCCTGG
	F	CTGCGTCAACGCTAGTGCC
BMP2	R	CACCATGGTCGACCTTTAGGA
	F	GGAACGGACATTCGGTCCTT
C3	R	CCTGAGTGCAAGATGACGGT
	F	CAAGCGCATTCCGATTGAGG
ROBO1	R	CTGACTCCCTTCTCTCCTCCA
	F	CAAGTTGGGTCTGAACCTCCA
VEGFC	R	TTCTTTGTGGGGTCCACAGC
	F	CTCGGATGCTGGAGATGACTC
HMOX1	R	CAGCTCCTGCAACTCCTCAA
	F	TTCTTACCTTCCCAACATTG

**Tabela 13. Protokół reakcji RT-PCR.**

Parametr	Etap reakcji			
	Aktywacja polimerazy i denaturacja DNA	Denaturacja	Hybrydyzacja i Elongacja	Liczba cykli
Temperatura	95°C	95°C	60°C	40
Czas	30 sekund	15 sekund	30 sekund	

### 7.2.16. Analiza sekwencjonowania następnej generacji (NGS)

RNA do analiz sekwencjonowania następnej generacji (ang. Next Generation Sequencing, NGS) wyizolowano zgodnie z opisem przedstawionym w rozdziale 7.2.13. Za przygotowanie bibliotek NGS i przeprowadzenie sekwencjonowania metodą NGS odpowiedzialna była firma zewnętrzna Novogene (Cambridge, Wielka Brytania). Przygotowanie bibliotek i proces sekwencjonowania zostały przygotowane zgodnie z wewnętrznymi protokołami firmy. Dane otrzymane w wyniku sekwencjonowania zostały poddane analizie bioinformatycznej. Analiza bioinformatyczna, jako usługa komercyjna, została przeprowadzona przez firmę zewnętrzną Inteliseq (Kraków, Polska). Jakość odczytów, na podstawie analizy FastQC (v. 0.11.9), została oceniona jako dobra. FastQC jest narzędziem zapewniającym prosty sposób przeprowadzania kontroli jakości surowych danych sekwencjonowania o wysokiej przepustowości. Zapewnia modułowy zestaw analiz, których można użyć, aby szybko zorientować się, czy w danych występują jakieś problemy, o których należy wiedzieć przed przystąpieniem do dalszej analizy.

Surowe odczyty zostały porównane do genomu referencyjnego GRCh38.p13 pochodzącego z bazy Ensembl (v. 104) z wykorzystaniem oprogramowania STAR (v. 2.1.0). Do ustalenia poziomu ekspresji genów wykorzystano oprogramowanie featureCounts (v. 2.0.3), gdzie jako referencję użyto pliku GTF pobranego z bazy Ensembl (v. 104). Dla każdego genu obliczono następujące wartości:

- liczba zliczeń - ilość par odczytów, która została zmapowana do danego genu
- CPM (Counts Per Million) - liczba par odczytów zmapowanych do danego genu podzielona przez wielkość biblioteki (liczbę wszystkich par odczytów zmapowanych w danej próbce) pomnożona przez milion;

- wartości CPM poddane logarytmizacji.

Ekspresja genów została poddana analizie w środowisku statystycznym R (v. 4.1.1). Geny o najniższym poziomie ekspresji zostały odrzucone z analizy po wcześniejszej filtracji danych. Analizę tą przeprowadzono przy użyciu funkcji `filterByExpr` z pakietu `edgeR` (v. 3.34.0) z parametrami o ustawieniach domyślnych. Następnie wykonano analizę porównawczą z wykorzystaniem funkcji `glmQLFTest`. Geny o przynajmniej dwukrotnie zmienionej ekspresji ( $\text{abs}(\log\text{FC}) > 1$ ) gdzie wskaźnik fałszywych wykryć (FDR, ang. False discovery Rate) wynosił  $< 0.1$  uznano za geny o zmienionej ekspresji DEGs. Szlaki biologiczne reprezentowane przez DEGs, które uległy zmianie zostały zidentyfikowane poprzez analizę nadreprezentacji genów związanymi z terminami w bazie KEGG.

Wyniki analiz NGS zwalidowano poprzez ocenę ekspresji genów metodą RT-PCR opisaną w rozdziale 7.2.14.2.

#### **7.2.17. Analiza statystyczna**

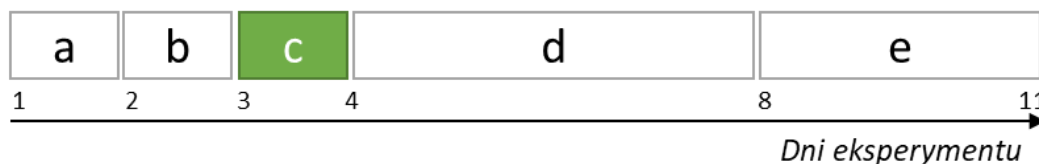
Wszystkie doświadczenia przeprowadzono w co najmniej trzech powtórzeniach biologicznych i dwóch powtórzeniach technicznych. Wyniki przedstawiono jako średnią wartość  $\pm$  SEM.

Normalność rozkładów danych liczbowych analizowano testem Shapiro-Wilka. W przypadku rozkładów normalnych grupy porównano za pomocą dwustronnego parametrycznego testu T z poprawką Welcha. Dla grup z nienormalnym rozkładem zastosowano nieparametryczny dwustronny test Manna-Whitneya. Za statystycznie istotne uznano wartości  $P < 0.05$ . Za nieistotne statystycznie tendencje przyjęto wartości  $P < 0.2$ . Oznaczenia istotności statystycznej przedstawiono jako \* -  $P < 0.05$ ; \*\* -  $P < 0.01$ ; \*\*\* -  $P < 0.001$ . Wszystkie obliczenia przeprowadzono w programie GraphPad PRISM v.9.2 (CA, USA).

## 8. Wyniki

### 8.1. Indukcja starzenia w liniach komórkowych raka nerki

Celem pierwszego etapu doświadczeń było określenie, czy komórki raka nerki mogą ulegać procesowi starzenia indukowanego chemioterapią. W tym celu wykorzystano linie RCC, ludzką RCC4 i mysią RenCa. W linii RCC4 gen *VHL* i nie powstaje w niej funkcjonalne białko [202]. Linia RenCa posiada funkcjonalną kopię genu kodującego pVHL [203]. Ponieważ starzenie może być indukowane *in vitro* przy użyciu chemoterapeutyków, zbadano 3 leki cytotoksyczne, które w przeszłości stosowane były w terapii raka nerki: winblastynę (VIN) 5-Fluorouracyl (5-FU) i gemcytabinę (GEM) [26]. W celu odwzorowania schematu pojedynczego cyklu chemioterapii stosowanego u pacjentów, komórki poddano 24-godzinnej inkubacji wybranymi dawkami chemoterapeutyków (Fig. 10). Leczenie rozpoczęto 2 dni po wysianiu komórek. W celu zakończenia inkubacji z lekami podłoże zmieniono na wolne od chemoterapeutyków. Hodowlę kontynuowano przez kolejne 7 dni. Cały eksperyment trwał w sumie 11 dni. Eksperymenty prowadzono w warunkach normoksji (~19% O<sub>2</sub>) oraz, w celu odwzorowania naturalnego mikrośrodowiska guza, w hipoksji (1% O<sub>2</sub>) (Fig. 10).

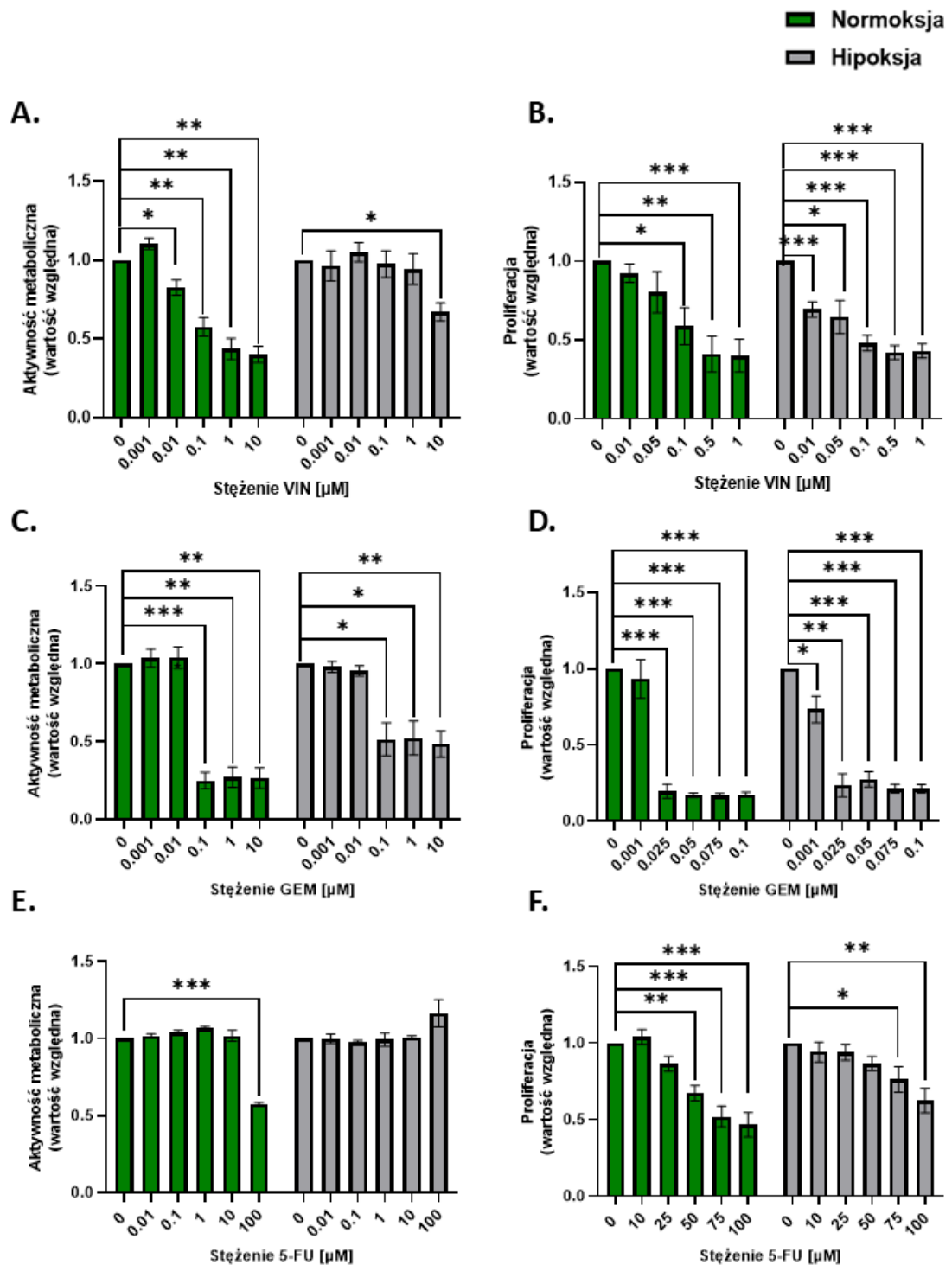


**Figura 10. Główny schemat eksperymentu.**

Komórki hodowano w warunkach normoksji i hipoksji zgodnie z następującym schematem: a – dzień 1 – wysianie komórek; b – dzień 2 – przeniesienie połowy naczyń hodowlanych do hipoksji; c- dzień 3 – inkubacja z lekami badanymi przez okres 24 h; d- dni 4-8 – w dniu 4 zmiana medium na pożywkę bez leków; e- dni 8-11 – w dniu 8 medium zostało wymienione na świeże, po czym eksperymenty kontynuowano do dnia 11.

#### 8.1.1. Wybór stężeń leków powodujących starzenie

Pierwsze eksperymenty polegały na ustaleniu dawek chemoterapeutyków indukujących starzenie w ludzkiej linii raka nerki. Na podstawie analizy aktywności metabolicznej z wykorzystaniem metody MTT, oszacowano zakresy dawek o działaniu subtoksycznym (Fig. 11A,C,E). Zahamowanie proliferacji jest jedną z cech charakterystycznych starych komórek. Dlatego, po zawężeniu zakresu badanych dawek leków, zbadano jakie stężenia chemoterapeutyków wpływają na zahamowanie proliferacji używając testu inkorporacji BrdU (Fig. 11B,D,F).



**Figura 11. Chemioterapeutyki w sposób dawko-zależny obniżają aktywność metaboliczną i proliferację ludzkich komórek RCC w normoksji i hipoksji.**

Ocena działania VIN na **A.** aktywność metaboliczną i **B.** proliferację; Ocena działania GEM na **C.** aktywność metaboliczną i **D.** proliferację; Ocena działania 5-FU na **E.** aktywność metaboliczną i **F.** proliferację. Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 3 \pm \text{SEM}$  wyrażoną jako odsetek wartości otrzymanej dla komórek nietraktowanych lekiem odpowiednio dla normoksji i hipoksji. \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ .

Zastosowanie VIN i GEM w sposób dawko-zależny obniżyło aktywność metaboliczną (Fig. 11A,C) oraz proliferację (Fig. 11B,D) ludzkiej linii raka nerki. W przypadku VIN w hipoksji zaobserwowano wyższą oporność komórek na zahamowanie aktywności metabolicznej, ale niższą na zahamowanie proliferacji (Fig. 11A,B). W przypadku GEM nie zaobserwowano różnic w obu badanych parametrach pomiędzy normoksją i hipoksją (Fig. 11C,D).

Po traktowaniu 5-FU istotnie statystycznie obniżenie aktywności metabolicznej i proliferacji zaobserwowano po inkubacji komórek z 1000x wyższymi stężeniami leku niż w przypadku VIN i GEM (Fig. 11E,F). Podobnie jak w przypadku VIN, komórki okazały się bardziej wrażliwe na działanie leku w warunkach normoksyjnych (Fig. 11E,F).

Analogiczne analizy przeprowadzono dla mysiej linii komórkowej. VIN, podobnie jak w ludzkiej linii, w sposób dawko-zależny obniżyła aktywność metaboliczną i proliferację. W hipoksji zaobserwowano mniejszy wpływ na zmiany metaboliczne, a wyższy na proliferację (Fig. 12A,B). Mysia linia wykazała się niższą wrażliwością na działanie GEM niż linia ludzka, jednak nadal zaobserwowano dawko-zależne spadki dla obu badanych parametrach (Fig. 12C,D). Linia RenCa wykazała się też niższą opornością na działanie 5-FU, niż linia RCC4. Zmiany obserwowano przy 10x niższych stężeniach niż w linii ludzkiej (Fig. 12E,F). Co więcej, w odróżnieniu od komórek ludzkich, mysie komórki były bardziej wrażliwe na inhibicję proliferacji w hipoksji (Fig. 12F).

Podsumowując, obie linie komórkowe były najbardziej wrażliwe na działanie VIN oraz GEM, a najmniej na 5-FU. Mysia linia okazała się bardziej wrażliwa na działanie 5-FU niż ludzkie komórki RCC4. Komórki mysie, o normalnym pVHL, i komórki ludzkie, o zmutowanym pVHL, w większości przypadków były wrażliwe na działanie leków w normoksji i w hipoksji.

Na podstawie przeprowadzonych analiz do dalszych eksperymentów wybrano po dwa stężenia leków, gdzie zaobserwowano zarówno spadek aktywności metabolicznej jak i proliferacji przynajmniej w jednym z badanych warunków tlenowych. Wybrane dawki zaprezentowano w tabeli 14.

Tabela 14. Dawki leków wybrane do analizy fenotypu i zmian molekularnych w starych komórkach nowotworowych.

Lek	RCC4		RenCa	
	Stężenie [ $\mu\text{M}$ ]			
VIN	0.1	0.5	0.01	0.05
GEM	0.01	0.025	0,1	0.25
5-FU	75	100	1	5

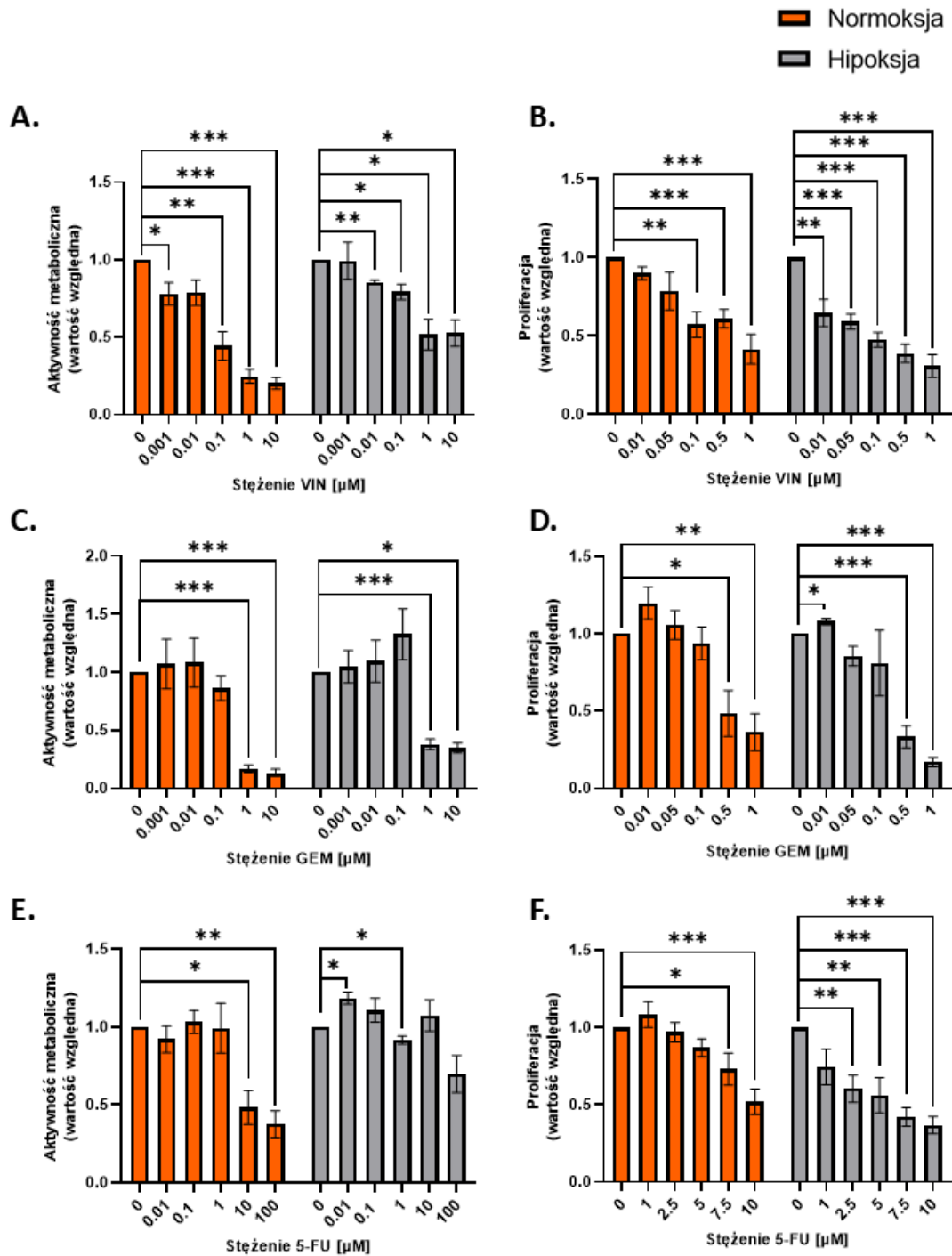


Figura 12. Chemoterapeutyki w sposób dawko-zależny obniżają aktywność metaboliczną i proliferację mysich komórek RenCa w normoksji i hipoksji.

Ocena działania VIN na **A.** aktywność metaboliczną i **B.** proliferację; Ocena działania GEM na **C.** aktywność metaboliczną i **D.** proliferację; Ocena działania 5-FU na **E.** aktywność metaboliczną i **F.** proliferację. Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 3 \pm \text{SEM}$  wyrażoną jako odsetek wartości otrzymanej dla komórek nietraktowanych lekiem odpowiednio dla normoksji i hipoksji \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ .

### 8.1.2. Ocena wpływu chemoterapeutyków na markery starzenia komórkowego w normoksji i w hipoksji

Starzeniem komórkowym określa się stan nieodwracalnej blokady cyklu komórkowego. W wyniku tego procesu komórki nowotworowe ulegają zmianom morfologicznym i biochemicznym, takim jak aktywność  $\beta$ -galaktozydazy związanej ze starzeniem komórkowym (SA- $\beta$ -Gal), granularność, powiększenie oraz hipertrofię, poprzez analizę ilości białka przypadającego na komórkę [204]. W celu potwierdzenia, czy wybrane dawki leków wpływają na indukcję starzenia przeprowadzono analizy oceniające wymienione wcześniej zmiany morfologiczne i biochemiczne. Zmiany oceniono w dniu 11 (Fig. 9).

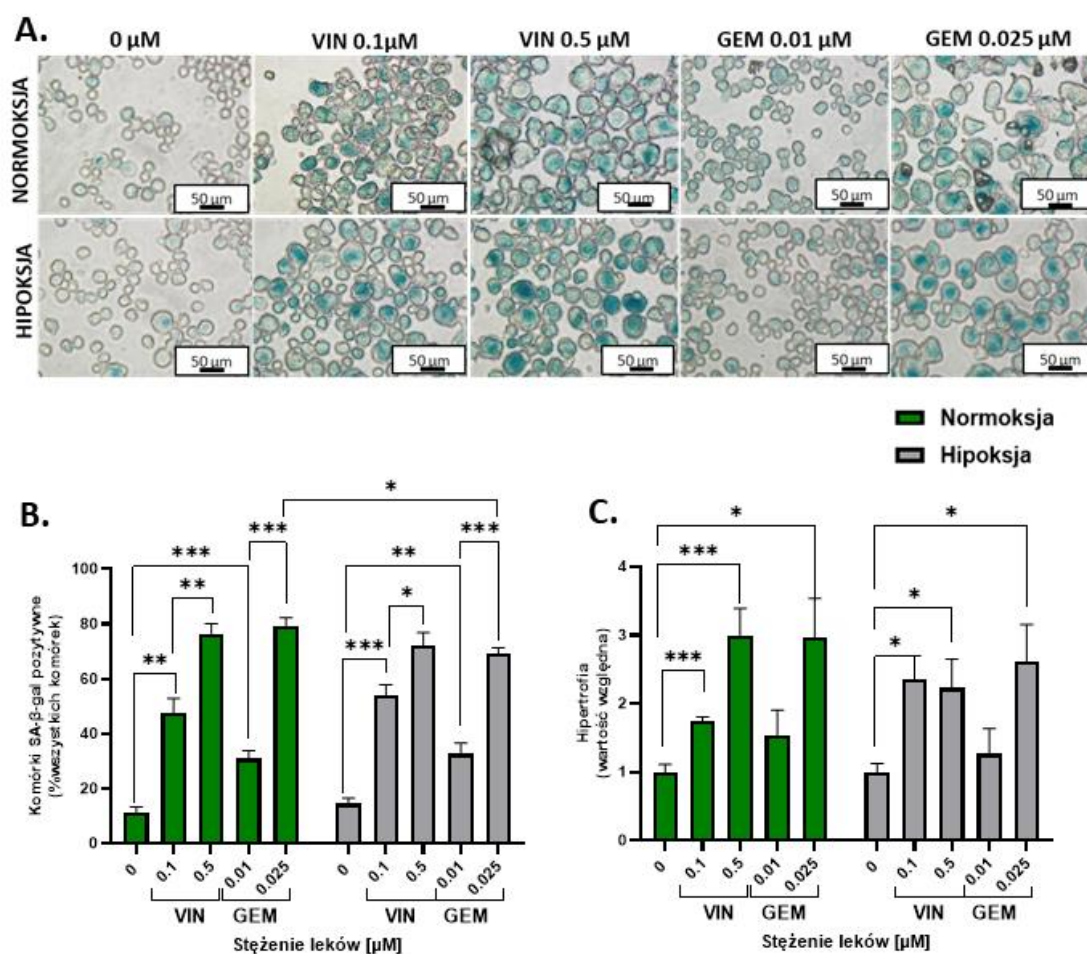
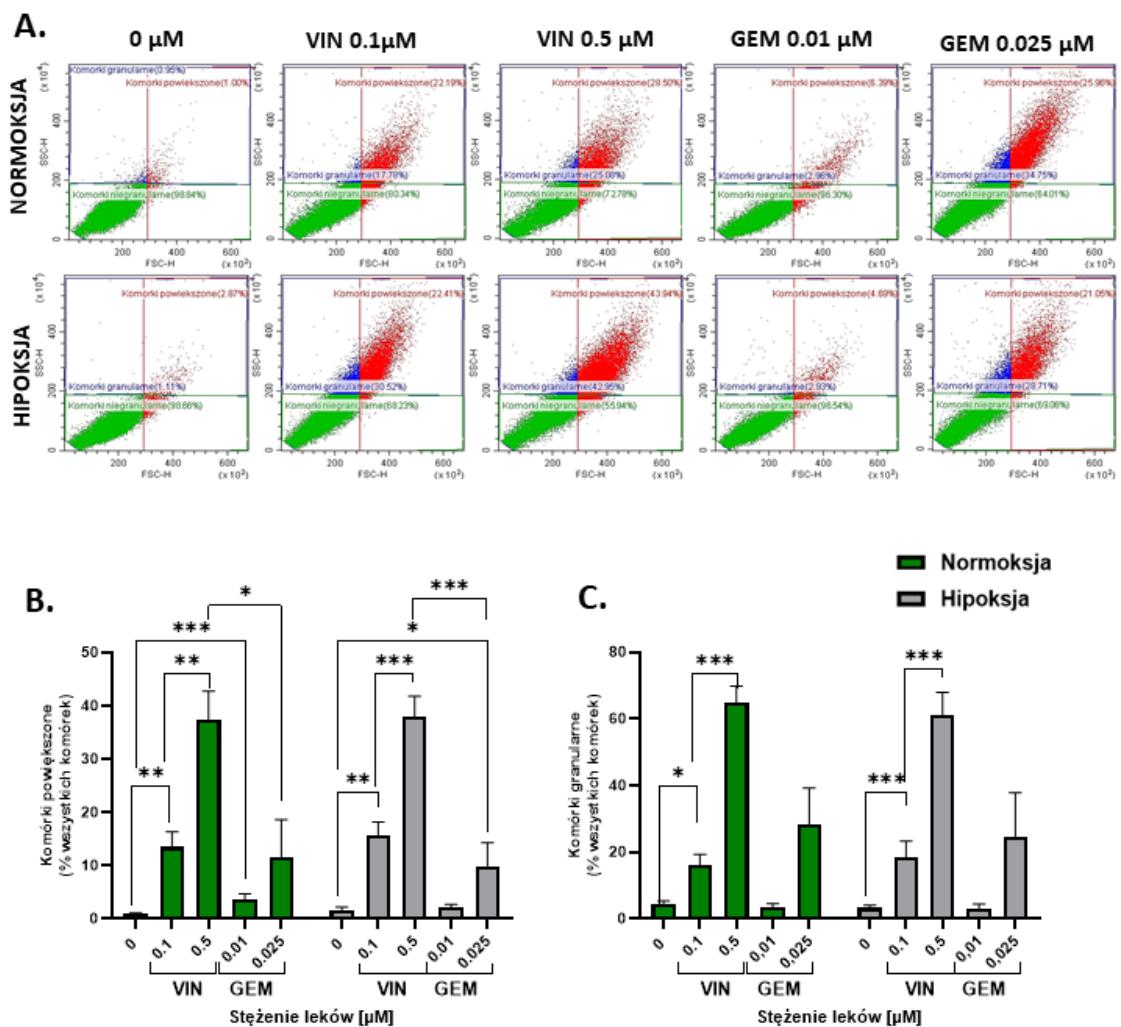


Figura 13. VIN i GEM w dawko-zależny sposób promują aktywność SA- $\beta$ -Gal oraz hipertrofię.



**A.** Zdjęcia reprezentacyjne przedstawiające komórki wybarwione metodą cytochemiczną na aktywność SA- $\beta$ -Gal. Zdjęcia wykonano w świetle przechodzącym. Skala 50  $\mu\text{m}$ . **B.** Analiza odsetka komórek SA- $\beta$ -Gal wykonana na podstawie barwienia cytochemicznego. **C.** Analiza hipertrofii wyrażająca ilość białka, oznaczoną metodą BCA, na jedną komórkę. Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 3 \pm \text{SEM}$ . \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ .

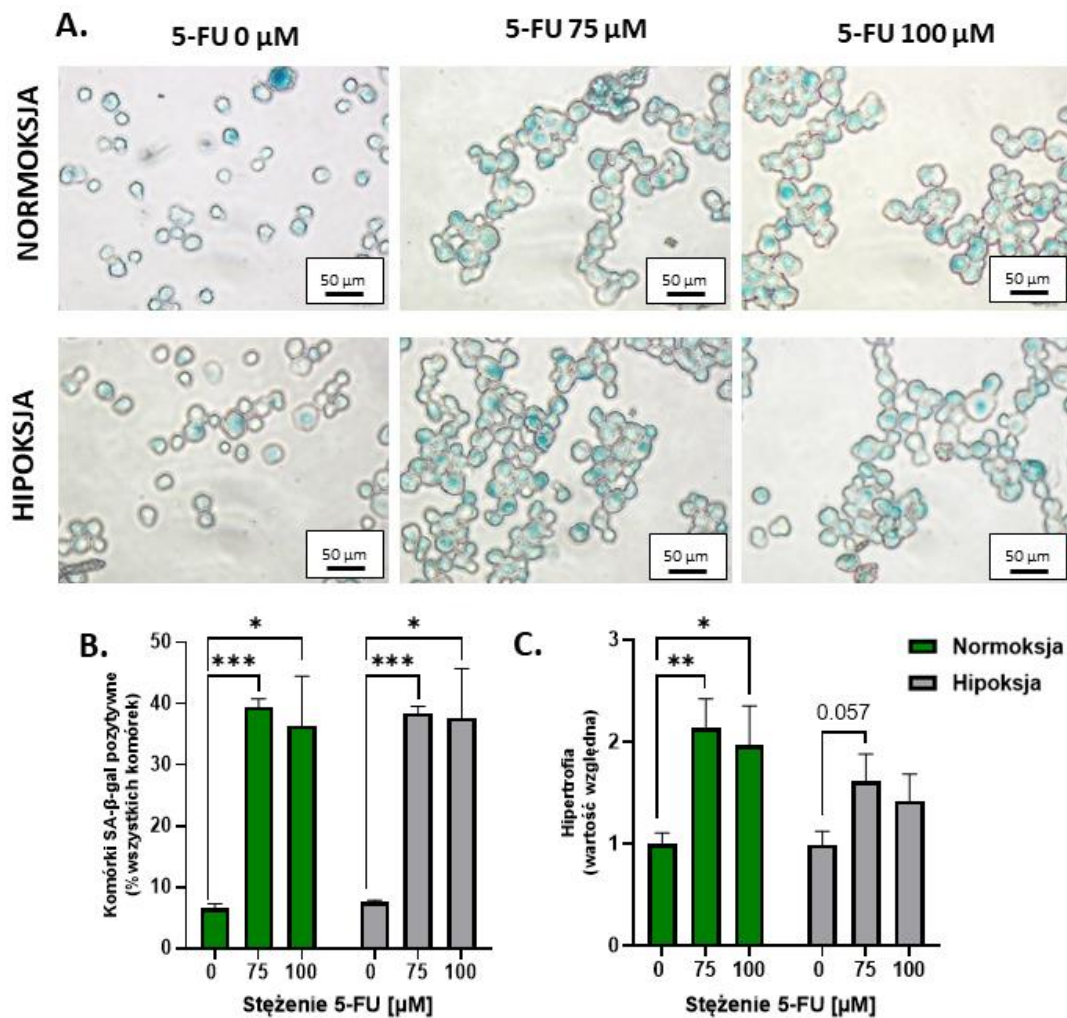
W ludzkiej linii komórkowej VIN oraz GEM w dawko-zależny sposób wpłynęła na wzrost liczby komórek SA- $\beta$ -Gal pozytywnych (Fig. 13A, B). Analiza hipertrofii wykazała, że oba leki promują też wzrost komórek (Fig. 13C). Wyniki te potwierdziła analiza cytometryczna, która dodatkowo wykazała że komórki po leczeniu GEM są mniejsze niż po leczeniu VIN (Fig. 14A,B). GEM nie wpłynęła też na akumulację odsetka komórek granularnych, w odróżnieniu od VIN, gdzie zaobserwowany efekt był dawko-zależny (Fig. 14A,C).



**Figura 14. VIN w większym stopniu niż GEM powoduje akumulację komórek powiększonych i granularnych.**

**A.** Reprezentacyjne wykresy typu Dot-Plot przedstawiające sposób analizy odsetka populacji komórek powiększonych (czerwona bramka) i populacji komórek granularnych (niebieska bramka). **B.** Analiza odsetka komórek granularnych wykonana przy użyciu cytometrii

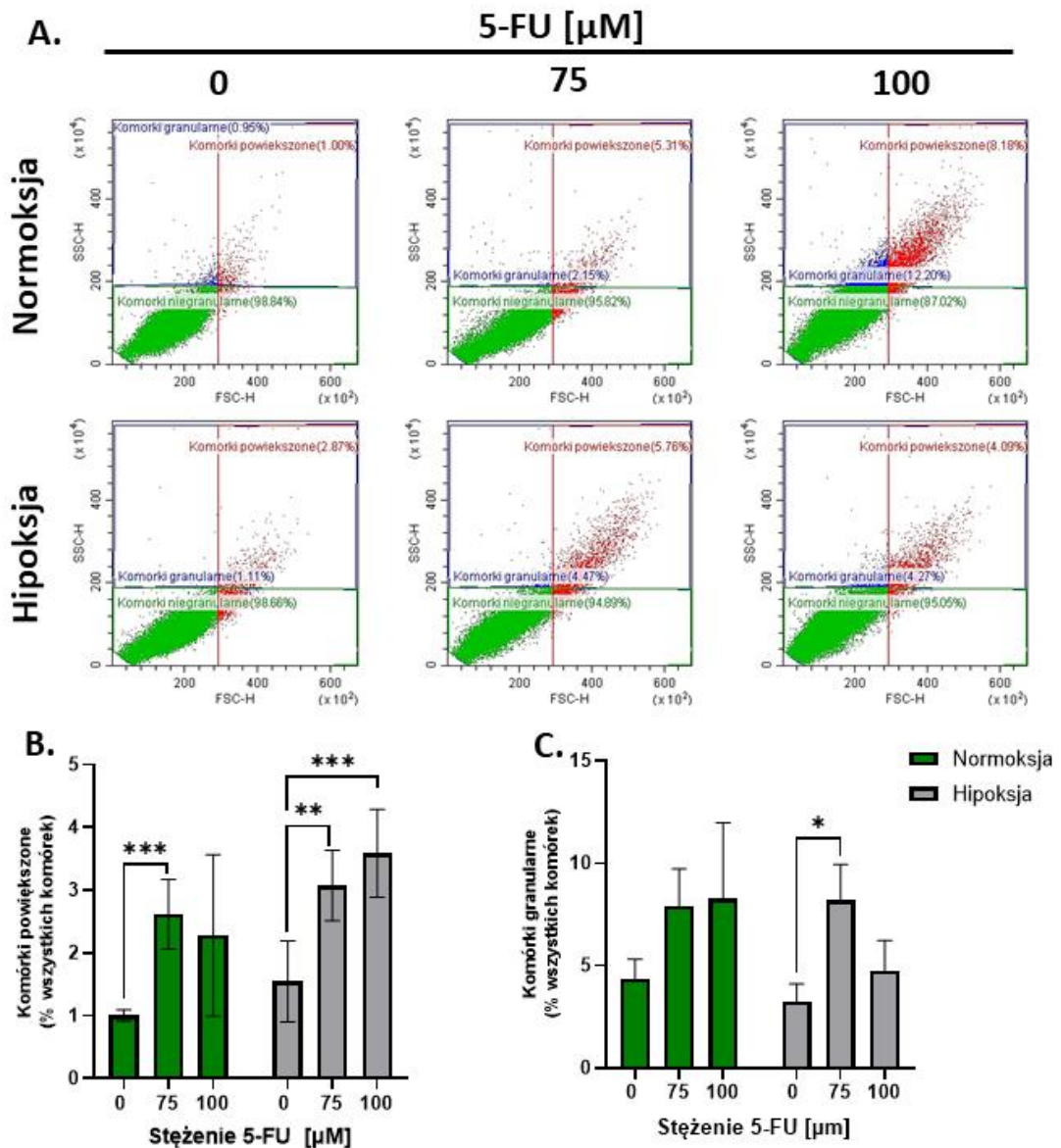
przepływowej. C. Analiza odsetka komórek powiększonych wykonana przy użyciu cytometrii przepływowej. Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 3 \pm \text{SEM}$ . \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ .



**Figura 15. 5-FU indukuje markery starzenia w niższym stopniu niż VIN.**

**A.** Zdjęcia reprezentatywne przedstawiające komórki wybarwione metodą cytochemiczną na aktywność SA- $\beta$ -Gal. Zdjęcia wykonane w świetle przechodzącym. Skala 50  $\mu\text{m}$ . **B.** Analiza odsetka komórek SA- $\beta$ -Gal wykonana na podstawie barwienia cytochemicznego. **C.** Analiza hipertrofii wyrażająca ilość białka, oznaczona metodą BCA, na komórkę. Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 3 \pm \text{SEM}$ . \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ .

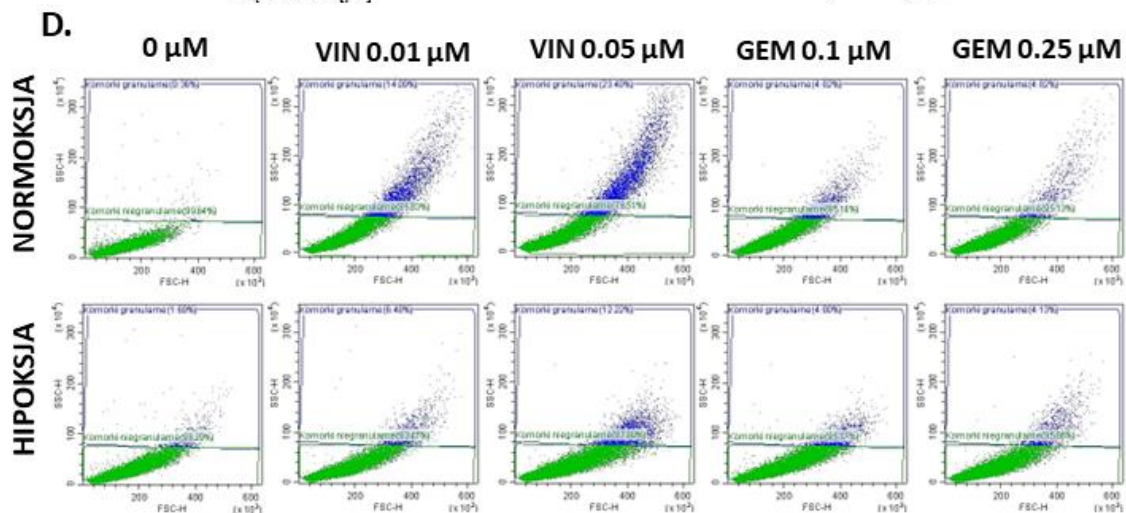
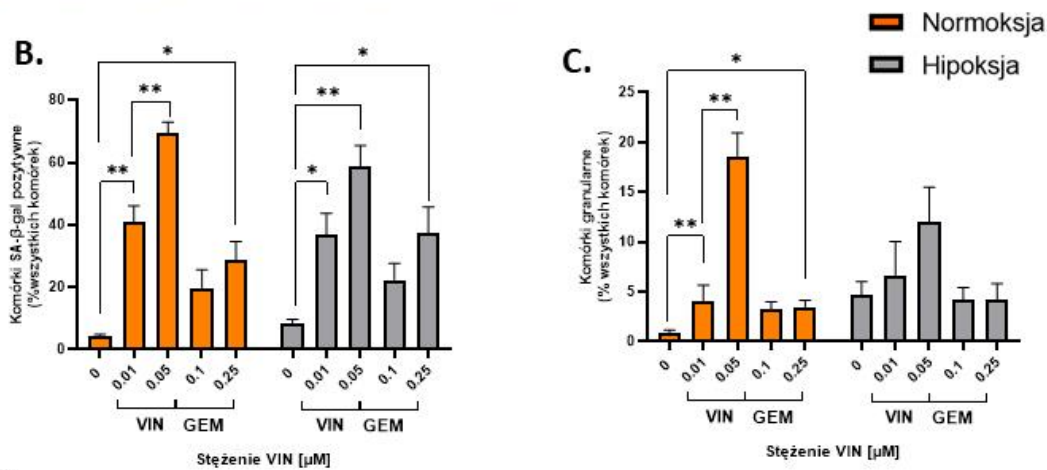
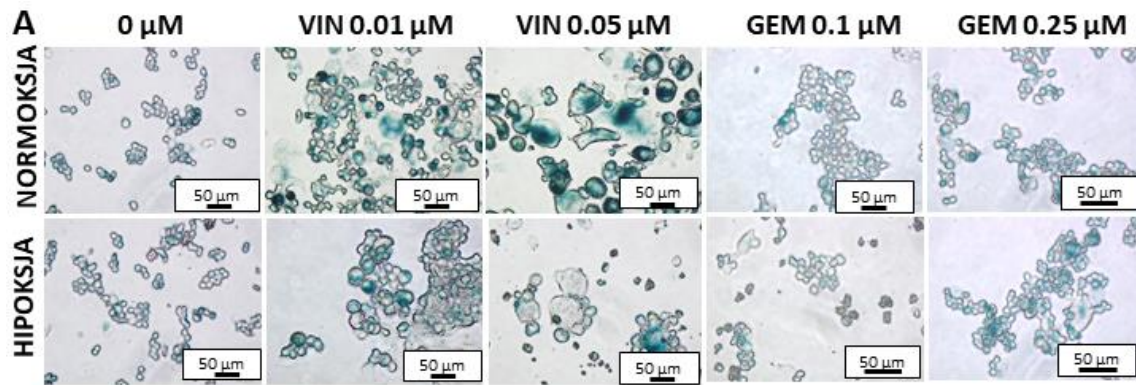
Po traktowaniu 5-FU odsetek komórek SA- $\beta$ -Gal pozytywnych był blisko 2 razy niższy niż tych traktowanych VIN i GEM. Efekt nie był też dawko-zależny (Fig. 15A,B). W odróżnieniu od dwóch wcześniej opisanych leków zaobserwowano też niższy efekt 5-FU na hipertrofię (Fig. 15C). Analiza cytometryczna wykazała, że komórki leczone 5-FU były mniejsze i mniej ziarniste niż komórki traktowane VIN i GEM (Fig. 16A-C).



**Figura 16. 5-FU wpływa w mniejszym stopniu niż VIN na akumulację komórek powiększonych i ziarnistych.**

**A.** Reprezentacyjne wykresy typu Dot-Plot przedstawiające sposób analizy odsetka populacji komórek powiększonych (czerwona bramka) i populacji komórek granularnych (niebieska bramka). **B.** Analiza odsetka komórek granularnych wykonana przy użyciu cytometrii przepływowej. **C.** Analiza odsetka komórek powiększonych wykonana przy użyciu cytometrii przepływowej. Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 3 \pm$  SEM. \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ .





**Figura 17. VIN i GEM w niższym stopniu promują rozwój fenotypu starzeniowego komórek mysich w hipoksji niż w normoksji.**

**A.** Zdjęcia reprezentacyjne przedstawiające komórki wybarwione metodą cytochemiczną na aktywność SA-β-Gal. Zdjęcia wykonano w świetle przechodzącym. Skala 50 μm **B.** Analiza odsetka komórek SA-β-Gal wykonana na podstawie barwienia cytochemicznego. **C.** Analiza odsetka komórek granularnych wykonana przy użyciu cytometrii przepływowej. Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 3 \pm \text{SEM}$ . \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ . **D.** Reprezentacyjne wykresy typu Dot-Plot przedstawiające sposób analizy odsetka populacji komórek granularnych.

W odróżnieniu od komórek ludzkich, mysie komórki wykazały się zdecydowanie wyższą opornością na indukcję fenotypu starzeniowego w hipoksji w efekcie działania VIN i GEM (Fig. 17A-D). Tylko odsetek komórek SA- $\beta$ -Gal pozytywnych wzrastał zarówno w normoksji i w hipoksji (Fig. 17A,B). Akumulacja komórek granularnych widoczna tylko w normoksji była zdecydowanie wyższa w komórkach leczonych VIN niż GEM (Fig. 17C,D).

5-FU w odróżnieniu do dwóch wcześniej opisanych leków wpłynął zarówno na generację komórek SA- $\beta$ -Gal pozytywnych jak i granularnych w obu warunkach tlenowych. Zaobserwowane zmiany były jednak niższe w porównaniu do VIN (Fig. 18A-D).

Podsumowując, wszystkie badane chemoterapeutyki wpłynęły na indukcję starzenia komórek raka nerki, a efekt ten zależy od rodzaju i dawki stosowanego leku. Najbardziej istotne zmiany zaobserwowano po zastosowaniu leku toksycznego dla mikrotubul, VIN. Obie linie wykazały się też wysoką opornością na działanie 5-FU. Z kolei komórki ludzkie wykazały się większą wrażliwością na GEM. W ludzkiej linii niedotlenienie nie wpływa w istotny sposób na ekspresję markerów starzenia w odróżnieniu od linii mysiej, gdzie różnice odnotowano po zastosowaniu VIN i GEM (Tab.15). Może to wskazywać na istotną rolę pVHL w odpowiedzi na indukcję starzenia w warunkach niedotlenienia.

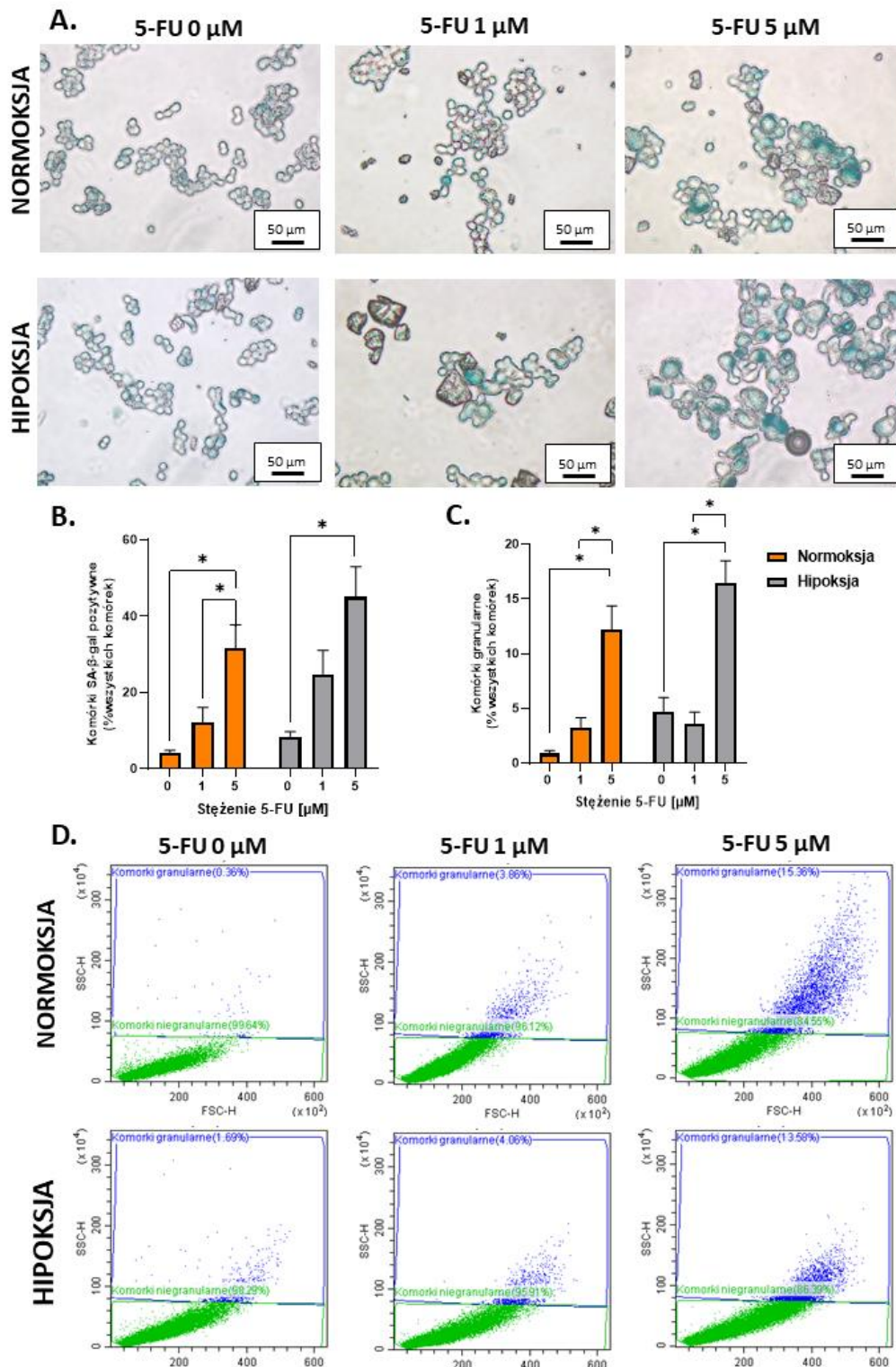
**Tabela 15. Podsumowanie zmian w markerach fenotypowych starzenia komórkowego w komórkach ludzkiej i mysiej linii raka nerki.**

Stężenia leków przedstawiono w wartościach  $\mu$ M. Skróty: N- normoksja; H – hipoksja; T- tendencja; NT – nie testowane;  $\uparrow$  - wzrost w porównaniu do komórek nietraktowanych.

Marker fenotypowy	Lek																							
	VIN								5-FU				GEM											
	RCC4				RenCa				RCC4		RenCa		RCC4		RenCa									
	0.1		0.5		0.01		0.05		75	100	1	5	0.01		0.02		0.1	0.25						
N	H	N	H	N	H	N	H	N	H	N	H	N	H	N	H	N	H	N	H					
SA- $\beta$ -Gal	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	-	-	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	-	-	$\uparrow$	$\uparrow$
Komórki granularne	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	-	-	$\uparrow$	-	-	$\uparrow$	-	-	-	-	$\uparrow$	$\uparrow$	-	-	-	-	-	-	$\uparrow$	-
Komórki powiększone	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	N	N	N	N	$\uparrow$	$\uparrow$	-	$\uparrow$	N	N	N	N	$\uparrow$	-	-	$\uparrow$	N	N	N	N
Hipertrofia	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	N	N	N	N	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	-	N	N	N	N	-	$\uparrow$	-	$\uparrow$	N	N	N	N
					T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T

W celu lepszego zrozumienia jakie mechanizmy molekularne warunkują indukcję starzenia, w dalszej części badań skupiono się na analizach ludzkiej linii komórkowej poddanej działaniu VIN, gdzie zaobserwowano największe

nagromadzenie komórek o fenotypie starzeniowym i komórek traktowanych 5-FU które wykazały oporność na indukcję TIS.



**Figura 18. Niedotlenienie nie wpływa na indukcję starzenia pod wpływem 5-FU w komórkach mysich.**

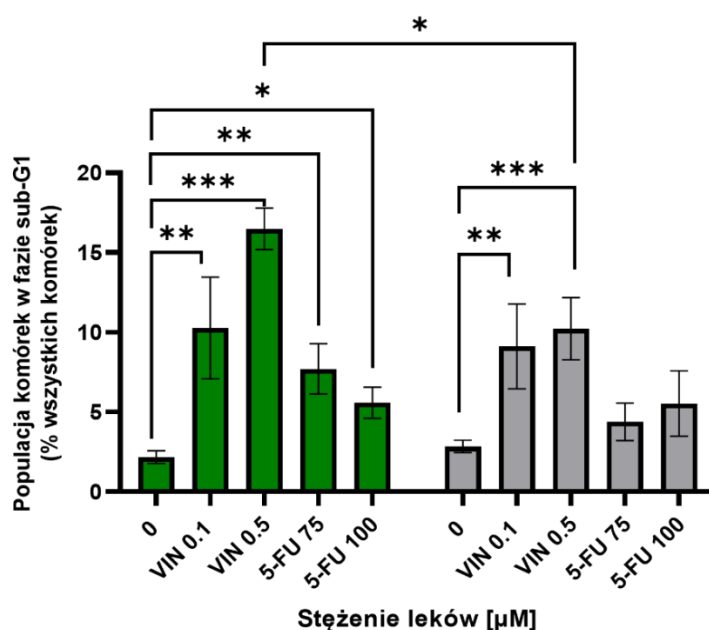
**A.** Zdjęcia reprezentacyjne przedstawiające komórki wybarwione metodą cytochemiczną na aktywność SA- $\beta$ -Gal. Zdjęcia wykonano w świetle przechodzącym. Skala 50  $\mu$ m **B.** Analiza odsetka komórek SA- $\beta$ -Gal wykonana na podstawie barwienia cytochemicznego. **C.** Analiza

odsetka komórek granularnych wykonana przy użyciu cytometrii przepływowej. Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 3 \pm \text{SEM}$ . \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ . **D.** Reprezentacyjne wykresy typu Dot-Plot przedstawiające sposób analizy odsetka populacji komórek granularnych.

### 8.1.3. VIN blokuje progresję cyklu komórkowego

Starzenie komórkowe jest jednym z mechanizmów hamujących nowotworzenie, poprzez nieodwracalne zahamowanie proliferacji komórek o uszkodzonym DNA. Blokada cyklu komórkowego jest jedną z głównych zmian charakteryzujących komórki TIS [92]. Z tego powodu przeprowadzono analizę cyklu komórkowego przy użyciu cytometrii przepływowej. Analizy przeprowadzono w 11 dniu eksperymentu (Fig. 9).

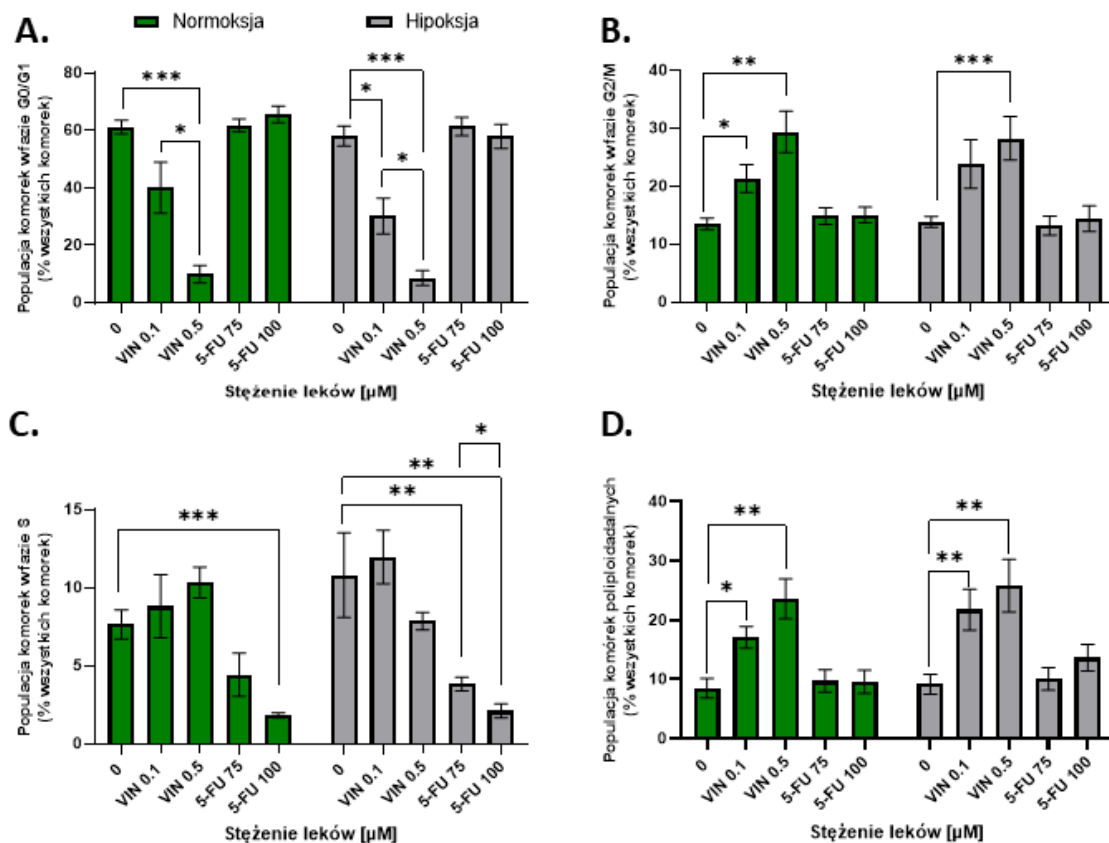
W pierwszej kolejności wykonano analizę odsetka komórek apoptotycznych w fazie sub-G1, wskazujących na indukcję śmierci komórkowej. Największy odsetek komórek apoptotycznych zaobserwowano po traktowaniu VIN. Populacja ta była istotnie niższa w hipoksji. 5-FU promował akumulację komórek w fazie sub-G1 w niższym stopniu niż VIN. Zmiany po traktowaniu 5-FU widoczne były tylko w normoksji (Fig. 19).



**Figura 19. Traktowanie VIN generuje więcej komórek apoptotycznych niż 5-FU.**

Analizę wielkości populacji komórek w fazie sub-G1 wykonano przy użyciu cytometrii przepływowej po interkalacji jodku propidyny do DNA. Wartości na wykresach wyrażają stosunek komórek w fazie sub-G1 w stosunku do wszystkich komórek. Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 3 \pm \text{SEM}$ . \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ .

Inkubacja z VIN spowodowała dawko-zależny spadek populacji komórek w fazie G0/G1 (Fig. 20A) przy równoczesnym wzroście populacji komórek w fazie G2/M (Fig. 18B). inkubacji z VIN nie wpłynęła na wielkość populacji komórek w fazie S (Fig. 20C). W odróżnieniu od VIN, traktowanie 5-FU zmniejszyło jedynie wielkość populacji komórek w fazie S, gdzie w hipoksji zaobserwowano efekt dawko-zależny (Fig. 20C).



**Figura 20. VIN promuje blokadę komórek w fazie G2/M oraz poliploidię.**

Analizę dystrybucji komórek w fazach cyklu komórkowego wykonano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej po interkalacji jodku propidyny do DNA. Wartości na wykresach wyrażają stosunek komórek w danej fazie cyklu w stosunku do wszystkich komórek. Na wykresach przedstawiono analizy ilościowe faz: **A.** G0/G1; **B.** G2/M; **C.** S oraz **D.** komórek poliploidalnych. Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 3 \pm \text{SEM}$ . \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ .



Zaobserwowano także, że VIN promowała generację komórek poliploidalnych. 5-FU nie wpłynęło na ich generację (Fig. 20D). W przypadku obu leków nie zaobserwowano różnic w dystrybucji komórek w fazach cyklu komórkowego między normoksją, a hipoksją.

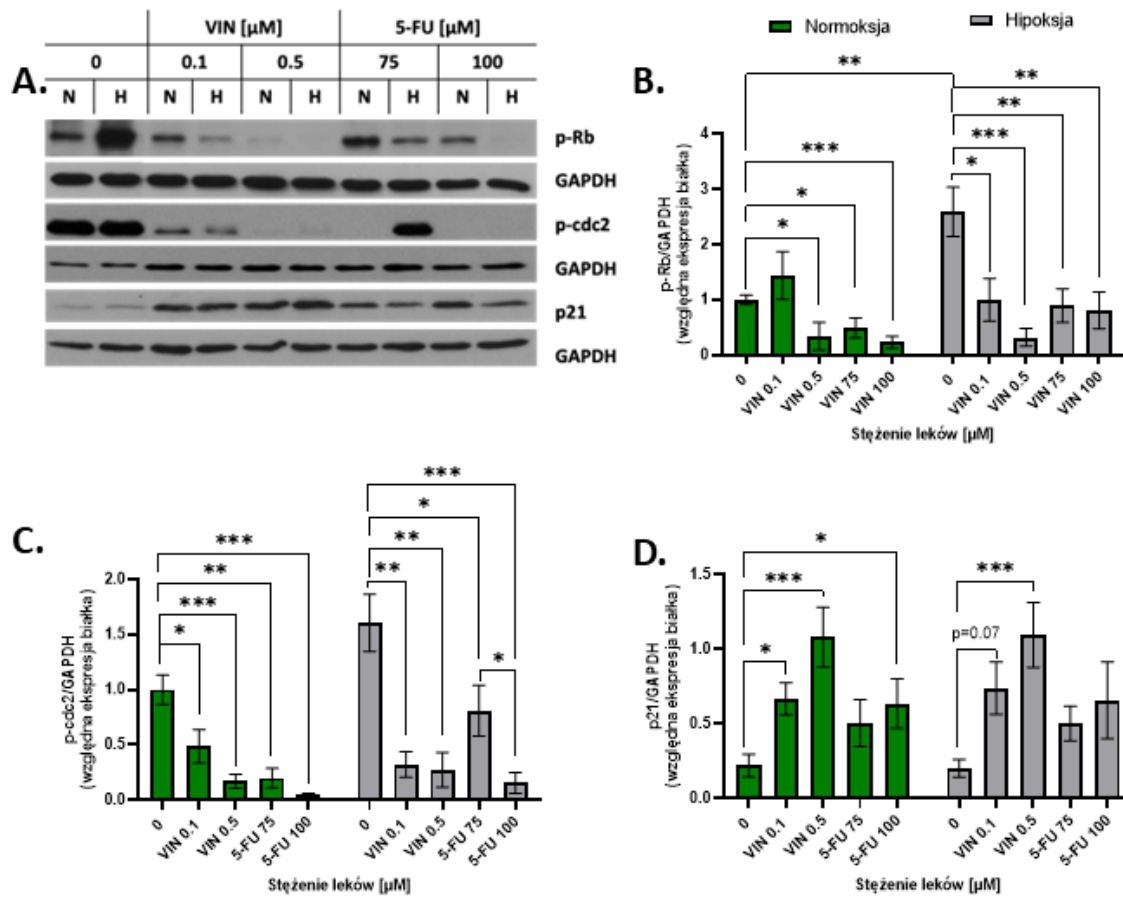
W celu potwierdzenia blokady cyklu komórkowego wykonano analizę ekspresji białek związanych z cyklem komórkowym: p-Rb, p-cdc2 oraz p21 metodą Western-Blot.

Do fosforylacji białka p-Rb dochodzi w momencie, kiedy cykl komórkowy przechodzi z fazy G1 do fazy S i głównym regulatorem ekspresji genów regulujących proces proliferacji, takich jak E2F [205]. Kinaza CDK1 (and. Cyklin Dependent Kinase 1) znana też jako cdc2 reguluje tranzycję z fazy G1 do S, syntezę DNA w fazie S oraz wejście komórek w fazę mitozy (M). Aktywność kinazy determinuje jej fosforylacja [206].

Inkubacja z VIN oraz 5-FU spowodowała istotny spadek ekspresji p-Rb (Fig. 19A,B) oraz p-cdc2 zarówno w normoksji jak i w hipoksji (Fig. 19A,C). Spadek ekspresji obu białek świadczy o zahamowaniu progresji cyklu komórkowego zarówno po traktowaniu VIN jak i 5-FU.

Białko p21, poprzez tworzenie kompleksów z kinazami, w tym z CDK1, hamuje progresję cyklu komórkowego [207]. Jego ekspresja istotnie wzrosła po inkubacji komórek z VIN, zarówno w normoksji jak i w hipoksji. (Fig. 21A,D). W przypadku komórek leczonych 5-FU istotny statystycznie wzrost ekspresji p21 zaobserwowano tylko w normoksji po zastosowaniu tylko wyższej dawki leku (Fig. 21A,D).

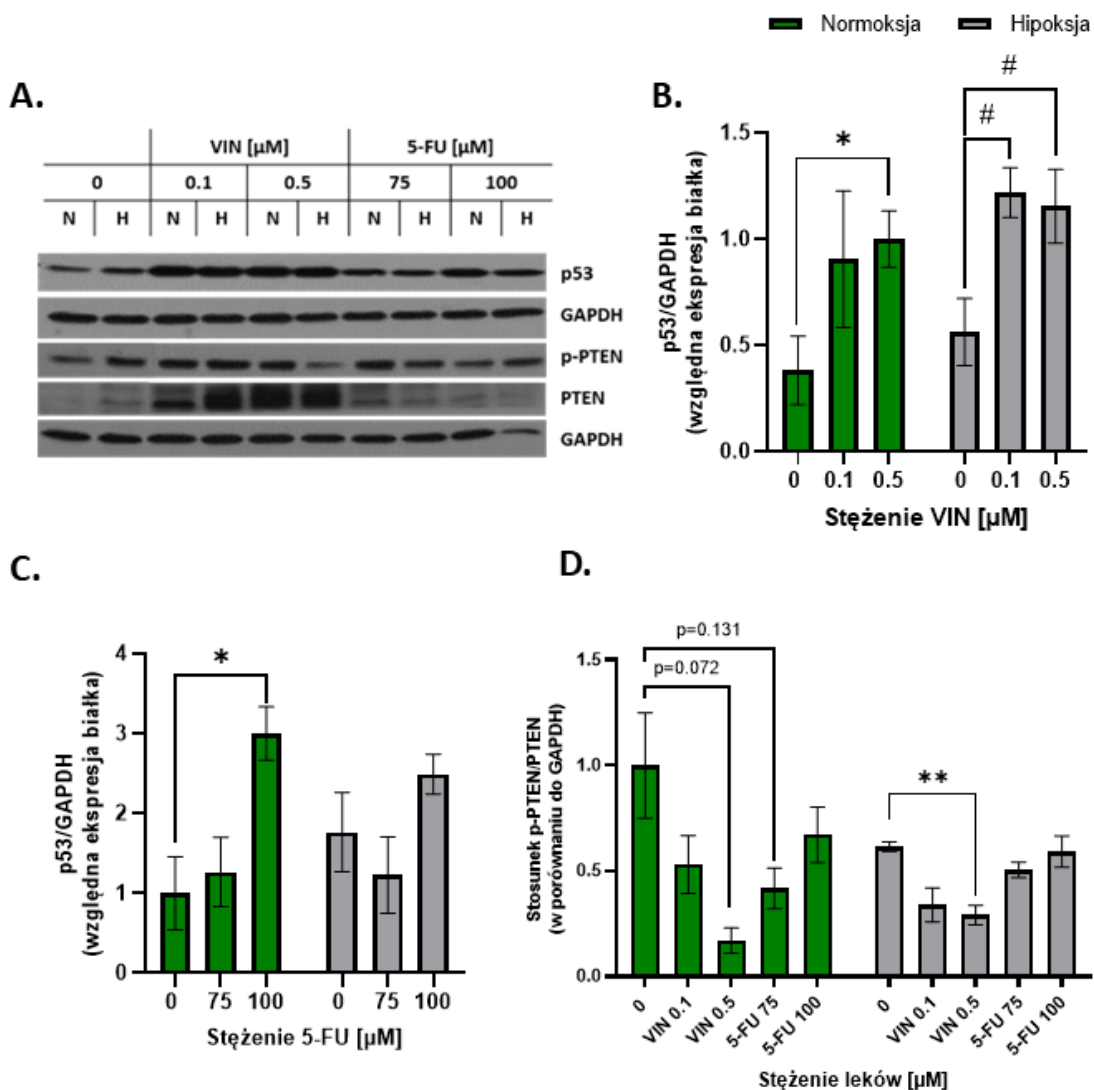
Do rozwoju starzenia w komórce muszą zostać aktywowane dwa zjawiska: zahamowanie cyklu komórkowego oraz konwersja gerogeniczna, zwana także gerokonwersją. Gerokonwersja jest napędzana poprzez aktywację ścieżki mTOR, odpowiedzialną za aktywację wzrostu komórki. Komórka rośnie, ale przez blokadę cyklu komórkowego nie ulega cytokinezie. Prowadzi to do powiększenia komórki oraz hipertrofii [107]. Analiza ekspresji efektora szlaku sygnałowego mTOR, fosforylowanej formy rybosomalnego białka S6 (p-S6), wykazała że w wyniku traktowania VIN aktywność mTOR nie rośnie, ale spada (Fig. 24A,D). Sugeruje to, że zaobserwowane zmiany w cyklu komórkowym mogą być odwracalne.



**Figura 21. Leczenie VIN i 5-hamuje ekspresję białek związanych regulacją cyklu komórkowego.**

**A.** Reprezentacyjne wyniki analizy Western Blot przedstawiające ekspresję białek p-Rb, p-cdc2 oraz p21. GAPDH użyto jako białka referencyjnego. N - normoksja, H - hipoksja. **B.** Względna ekspresja białka pRb **C.** Względna ekspresja białka p-cdc2. **D.** Wartości względnych ekspresji badanych białek wyrażają stosunek wartości uzyskanych dla odpowiedniego białka do GAPDH. Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 3 \pm \text{SEM}$  \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ .

Regulacja cyklu komórkowego jest ściśle kontrolowana przez białka supresorowe onkogenezy, takie jak p53 czy PTEN. Białko p53 jest jednym z głównych czynników regulujących aktywność inhibitora cyklu komórkowego p21 [207]. Traktowanie VIN wpłynęło na istotny wzrost ekspresji p53 w obu warunkach tlenowych (Fig. 22A,B). Ekspresja p53 wzrosła też po inkubacji z 5-FU w wyższym stężeniu w normoksji (Fig. 22A,C). W obu przypadkach wzrost ekspresji p53 korelował z wyższą ekspresją p21.



**Figura 22. Traktowanie komórek VIN powoduje nadekspresję p53 i aktywację białka PTEN.**

**A.** Reprezentacyjne wyniki analizy Western Blot przedstawiające ekspresję białek p-Rb, p-cdc2 oraz p21. GAPDH użyto jako białka referencyjnego. N - normoksja, H - hipoksja **B.** Względna ekspresja białka pRb **C.** Względna ekspresja białka p-cdc2. **D.** Wartości względnych ekspresji badanych białek wyrażają stosunek wartości uzyskanych dla odpowiedniego białka do GAPDH. Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 3 \pm \text{SEM}$ . \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ .

Jedną z głównych funkcji formy cytoplazmatycznej PTEN jest inhibicja szlaku kinazy Akt, a także regulacja aktywności p53. Aktywacja PTEN prowadzi też do zahamowania progresji cyklu komórkowego z fazy G1 do S, oraz z fazy G2 do M [208]. Na podstawie analizy densytometrycznej formy fosforylowanej i niefosforylowanej, oszacowano aktywność PTEN po traktowaniu VIN i 5-FU. Fosforylacja PTEN hamuje jego aktywność, dlatego obniżenie stosunku formy niefosforylowanej do fosforylowanej, świadczy o zwiększeniu aktywności tego białka. W badanych modelach zaobserwowano, że aktywność PTEN wzrasta tylko w komórkach poddanych

inkubacji z wyższym stężeniem VIN, zarówno w normoksji jak i w hipoksji (Fig. 22A,D).

**Tabela 16. Podsumowanie zmian w cyklu komórkowym oraz w ekspresji białek regulujących jego funkcjonowanie.**

Stężenia leków przedstawiono w wartościach  $\mu\text{M}$ . Skróty: N- normoksja; H – hipoksja; T- tendencja;  $\uparrow$  - wzrost w porównaniu do komórek nietraktowanych;  $\downarrow$  - spadek w porównaniu do komórek nietraktowanych; ( $\downarrow$ ) - spadek wartości w hipoksji w porównaniu do normoksji

Markery	Lek							
	VIN				5-FU			
	0.1		0.5		75		100	
	N	H	N	H	N	H	N	H
Sub-G1	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow(\downarrow)$	$\uparrow$	-	$\uparrow$	-
G0/G1	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	-	-	-	-
S	-	-	-	-	-	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$
G2/M	$\uparrow$	-	$\uparrow$	$\uparrow$	-	-	-	-
Poliploidia	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	-	-	-	-
pRb	-	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$
p-cdc2	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$
p21	$\uparrow$	$\uparrow$ T	$\uparrow$	$\uparrow$	-	-	$\uparrow$	-
p-S6	-	-	$\downarrow$	$\downarrow$ T	-	-	$\downarrow$ T	$\downarrow$ T
p53	-	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	-	-	$\uparrow$	-
p-PTEN/PTEN	-	-	$\downarrow$ T	$\downarrow$	$\downarrow$ T	-	-	-

Podsumowując, traktowanie komórek RCC4 VIN prowadzi do blokady cyklu komórkowego. Blokowane są one w fazie G2/M oraz ulegają poliploidyacji, szczególnie po zastosowaniu wyższej dawki leku. Zmiany te korelowały z nadekspresją p53 i aktywacją PTEN. Obniżona ekspresja p-S6, wskazująca na zahamowanie szlaku mTOR, świadczy o tym, że zmiany te mogą być odwracalne. W odróżnieniu od VIN inkubacja z 5-FU obniża jedynie populację komórek w fazie S. W komórkach traktowanych 5-FU dochodzi jednak do blokady cyklu komórkowego, na co wskazuje analiza ekspresji białek p-cdc2 i p-Rb. Nie zaobserwowano jednak zmian w ekspresji p21 i p53. Analizy wykazały też, że niedotlenienie nie wpływa na hamowanie progresji cyklu komórkowego (Tab. 16).

#### 8.1.4. VIN promuje sekrecję czynników SASP

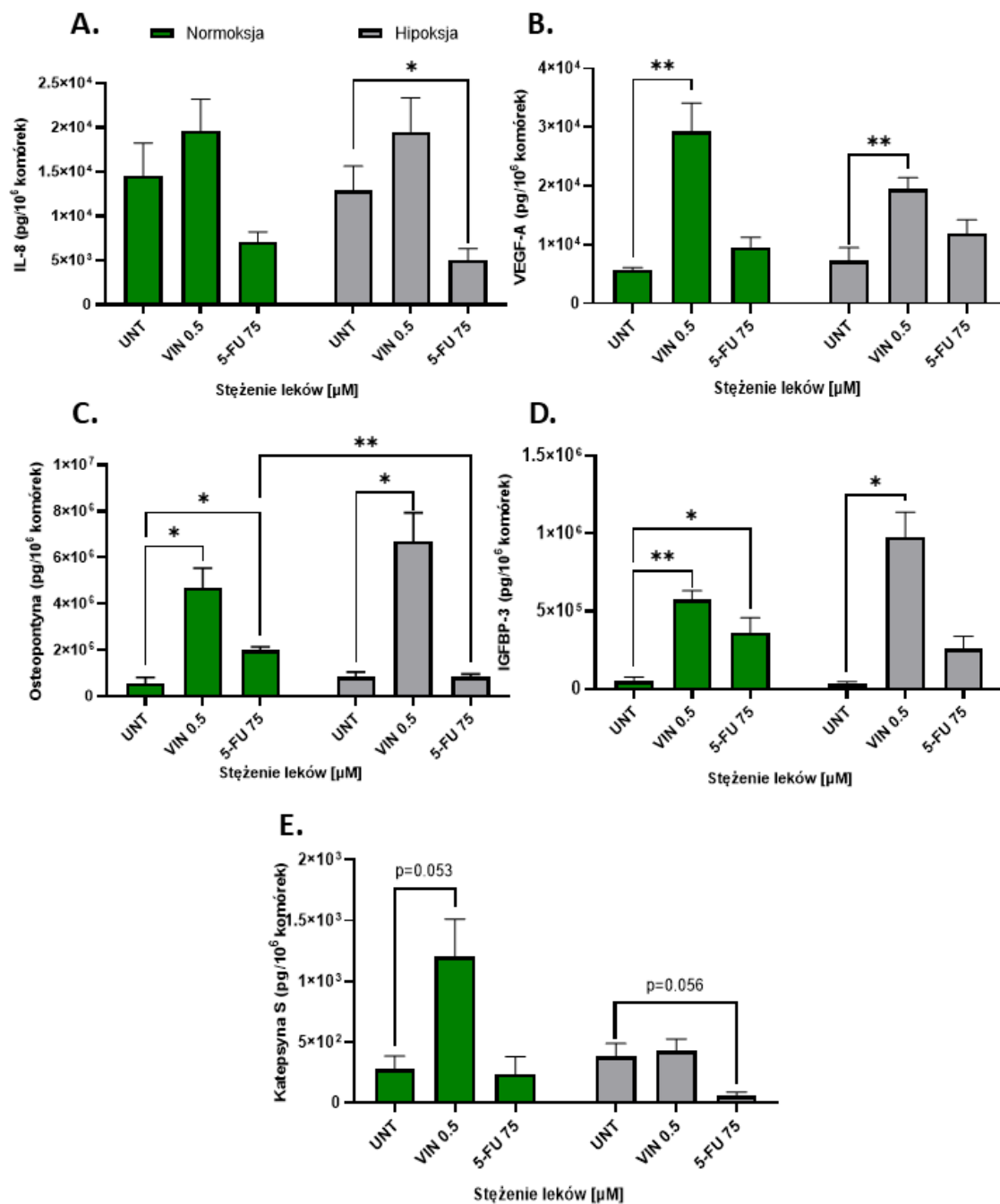
Jednym z markerów charakterystycznych dla komórek TIS jest SASP [109]. W celu zbadania czy leczenie wybranymi chemoterapeutykami może wpływać na

sekretom komórek wykonano analizy wybranych czynników klasyfikowanych do SASP przy użyciu metody ELISA. Zbadano sekrecję IL-8, VEGF-A, osteopontyny, białka wiążącego insulinopodobny czynnik wzrostu (ang. Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 3, IGFBP-3) oraz katepsyny-S. Czynniki wybrano na podstawie wcześniejszych badań z użyciem membran białkowych dla raka nerki (dane nieprzedstawione) i raka jelita grubego [134]. Eksperymenty przeprowadzono w dniu 11 (Fig. 9).

Jedyną cytokiną, której zmian sekrecji nie zaobserwowano po leczeniu VIN była IL-8. (Fig. 23A). W odróżnieniu od IL-8 sekrecja VEGF, osteopontyny oraz IGFBP-3, wzrosła po leczeniu VIN, zarówno w normoksji jak i w hipoksji (Fig. 23B-D). W przypadku katepsyny-S zaobserwowano tendencję wzrostową w normoksji.

W hipoksji poziom IL-8 (Fig. 23A) oraz katepsyny-S (Fig. 23 E) spadł na skutek działania 5-FU. Z kolei w normoksji to samo leczenie wpłynęło na wzrost sekrecji osteopontyny (Fig. 23 C) i IGFBP-3 (Fig. 23 D).

Podsumowując, wzrost czterech z pięciu badanych czynników SASP po leczeniu VIN potwierdza indukcję starzenia niezależnie od warunków tlenowych. Co więcej, zwiększenie sekrecji katepsyny-S, która jest enzymem lizosomalnym należącym do grupy peptydaz cysteinowych i odgrywa ważną rolę w regulacji procesu autofagii może wskazywać, że w komórkach TIS dochodzi do aktywacji tego procesu [209].



**Figura 23. VIN promuje sekrecję czynników SASP niezależnie od warunków tlenowych.** Wyniki analizy sekrecji wybranych czynników SASP wykonana metodą ELISA: **A.** IL-8; **B.** VEGF-A; **C.** Osteopontyna; **D.** IGFBP-3; **E.** Katepsyna-S. Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 3 \pm \text{SEM}$ . \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ .

### 8.1.5. VIN aktywuje autofagię

W celu zbadania czy w komórkach raka nerki dochodzi do aktywacji autofagii w wyniku indukcji starzenia, przeprowadzono analizę ekspresji białek autofagicznych: dwóch izoform LC3B oraz p62/SQSTM1 (p62) w dniu 11 eksperymentu (Fig. 9). Zwiększona ekspresja drugiej formy białka LC3B o wielkości 16 kDa wskazuje na

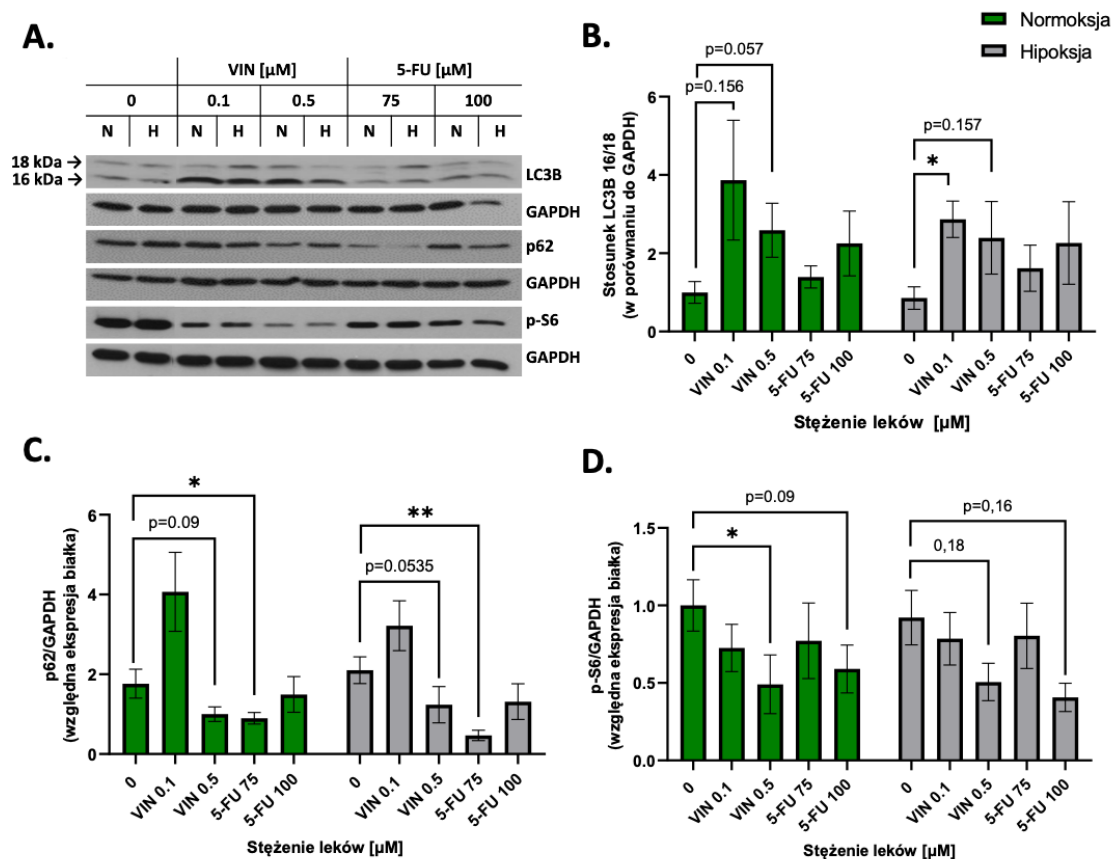
podwyższoną generację autofagosomów i autofagolizosomów w komórce [210]. Podwyższony poziom stosunku LC3B16/18 świadczy o aktywacji autofagii [211]. O wydajności i zakończeniu procesu autofagii świadczy ekspresja p62. Białko to ulega degradacji wraz autofagolizosomami na końcowym etapie autofagii [212]. O aktywacji autofagii świadczyć może również obniżenie fosforylacji rybosomalnego białka S6 (p-S6), wskazująca na zahamowanie aktywności szlaku mTOR [213].

Analiza ekspresji białek autofagicznych, wykazała że w komórkach inkubowanych z VIN stosunek formy 16/18 białka LC3B zwiększa się (Fig. 24 A,B), a ekspresja białek p62 (Fig. 22 A,C) oraz p-S6 (Fig. 22 A,D) maleje. Zmiany te wskazują na aktywację autofagii w komórkach TIS.

W odróżnieniu od komórek traktowanych VIN, w komórkach traktowanych 5-FU stosunek formy 16/18 LC3B nie uległ zmianie (Fig. 24 A,B). Zaobserwowano jednak spadek ekspresji p62 (Fig. 24 A,C) oraz p-S6 (Fig. 24 A,D) wskazujące na aktywność autofagii i prawidłowy przepływ autofagiczny.

W żadnym z badanych układów eksperymentalnych nie zaobserwowano wpływu hipoksji na ekspresję białek związanych z aktywacją autofagii (Fig. 24 A-D).

Podsumowując, w komórkach raka nerki autofagia ulega aktywacji niezależnie od warunków tlenowych po traktowaniu VIN w wyższym stężeniu (Fig. 24 A,C,D), gdzie zaobserwowano największą populację komórek starych oraz poliploidalnych. Z kolei w komórkach traktowanych 5-FU, zaobserwowano mniej zmian wskazujących na istotne zwiększenie aktywacji tego procesu.



**Figura 24. VIN aktywuje autofagię.**

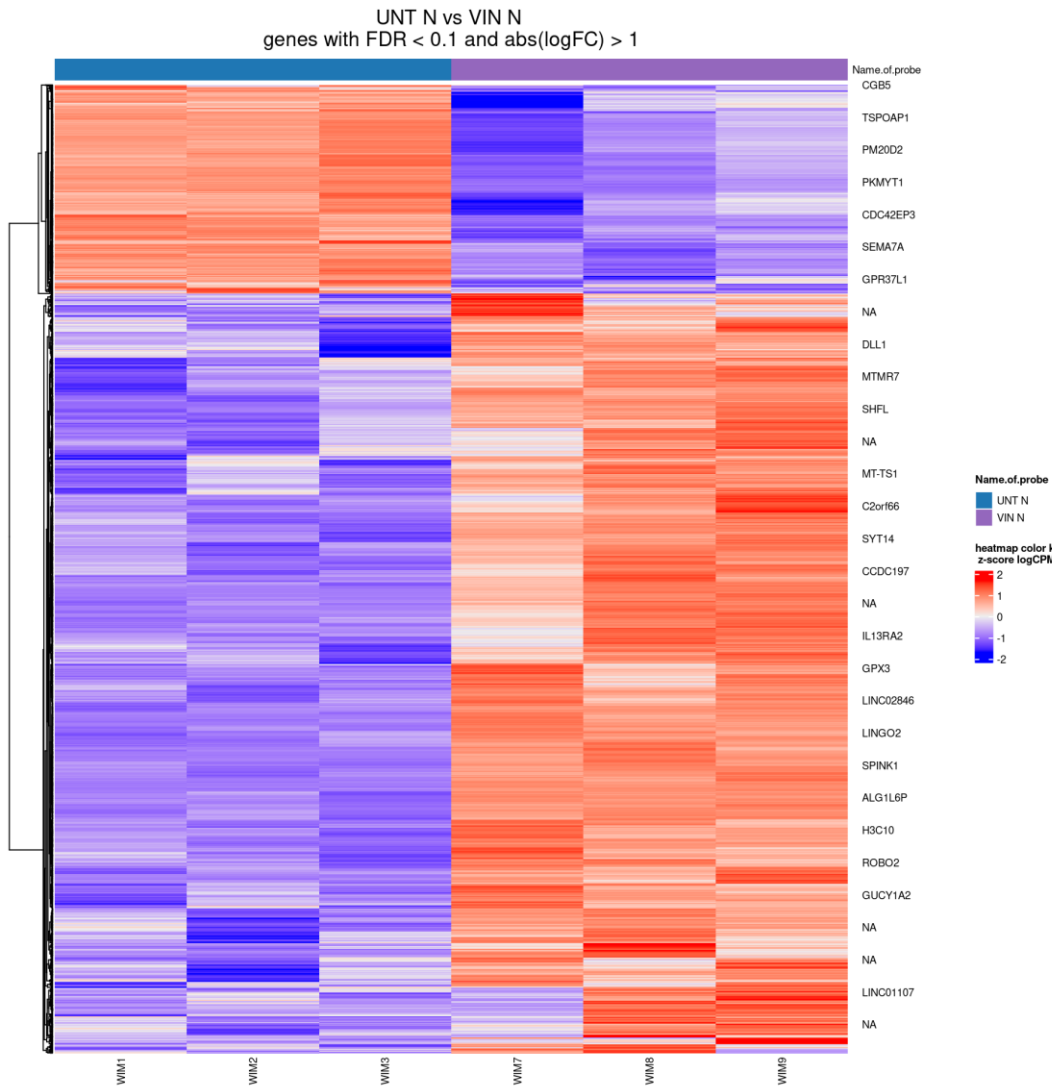
**A.** Reprezentacyjne wyniki analizy Western Blot przedstawiające ekspresję białek LC3B, p62, p-S6. GAPDH użyto jako białka referencyjnego. N - normoksja, H - hipoksja **B.** Stosunek względnych wartości dwóch form białka LC3B (16/18) **C.** Względna ekspresja białka p62. **D.** Względna ekspresja białka p-S6. Wartości względnych ekspresji badanych białek wyrażają stosunek wartości uzyskanych dla odpowiedniego białka do GAPDH. Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 3 \pm \text{SEM}$ . \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ .

### 8.1.6. Analiza zmian ekspresji genów w wyniku indukcji TIS.

Analizy *in vitro* nie wykazały istotnego wpływu niedotlenienia na indukcję starzenia. W celu sprawdzenia czy występują różnice w ekspresji genów i aktywacji szlaków między normoksją, a hipoksją wykonano pogłębione analizy sekwencjonowania następnej generacji (ang. Next Generation Sequencing, NGS). Dodatkowo celem analizy było znalezienie nowych szlaków, które potencjalnie mogłyby odgrywać rolę w indukcji starzenia. Do analiz wykorzystano komórki traktowane VIN 0.5 μM. Analizy przeprowadzono w 9 dniu eksperymentu (Fig. 9). Jako kontrole zastosowano komórki nietraktowane. Do analiz wybrano geny, których parametry FDR (ang. False Discovery Rate)  $< 0.1$ , oraz  $\text{abs}(\log\text{FC}) > 1$  odpowiadającym co najmniej 2-krotnie zmianie ekspresji genów.



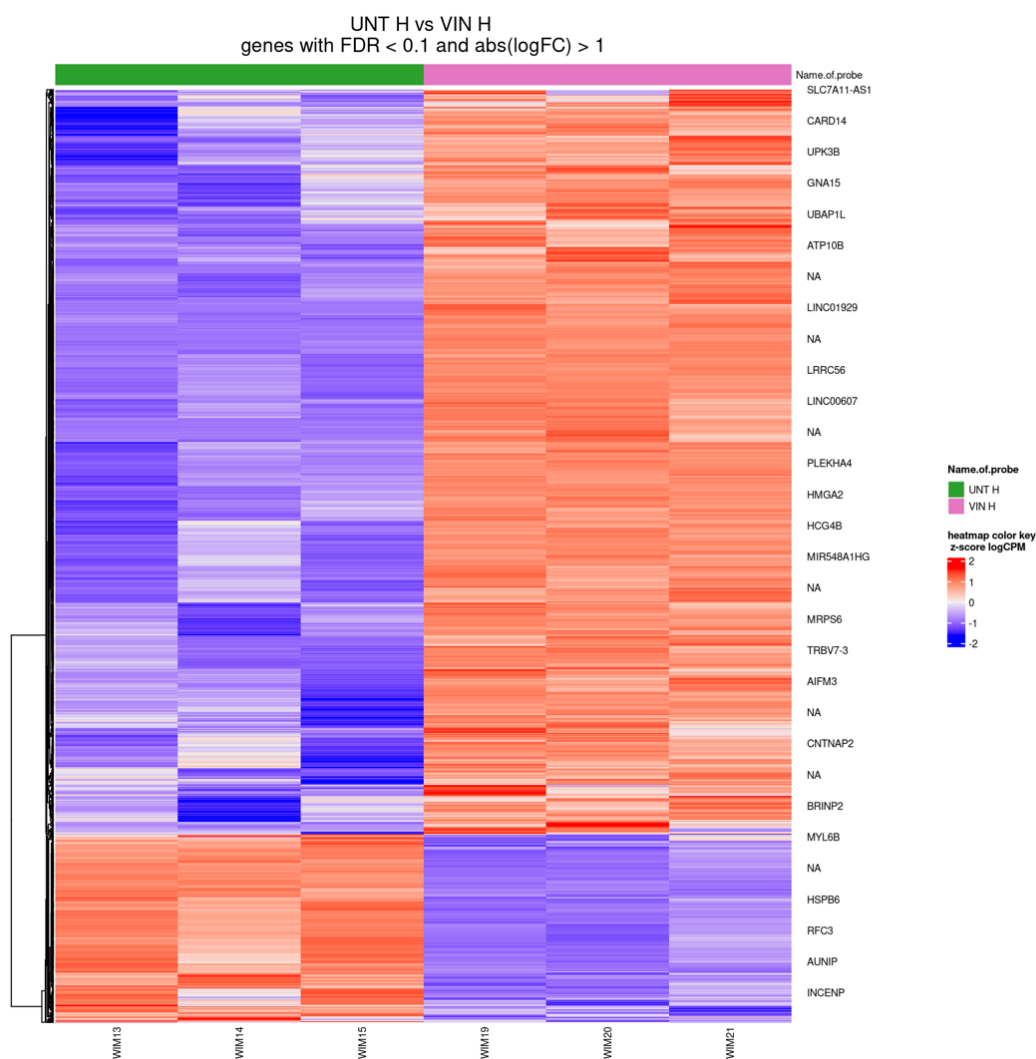
W normoksji w porównaniu między komórkami nietraktowanym, a komórkami leczonymi VIN (UNT N vs VIN N) odnotowano 4145 genów o zmienionej ekspresji (ang. Differentially expressed genes, DEGs). W obrębie tego porównania odnotowano 851 genów o obniżonej ekspresji oraz 3094 geny o podwyższonej ekspresji po traktowaniu VIN VIN (Fig. 25).



**Figura 25. Mapa cieplna przedstawiająca wyniki ekspresji genów istotnie zmienionych w porównaniu UNT N vs VIN N.**

Kolorem czerwonym zaznaczono geny o podwyższonej ekspresji. Kolorem niebieskim oznaczono geny o niższej ekspresji. Po lewej stronie przedstawiono wyniki dla komórek nietraktowanych (UNT N). Po prawej stronie przedstawiono wyniki dla komórek leczonych VIN (VIN N). Dane dotyczą komórek hodowanych w warunkach normoksji.

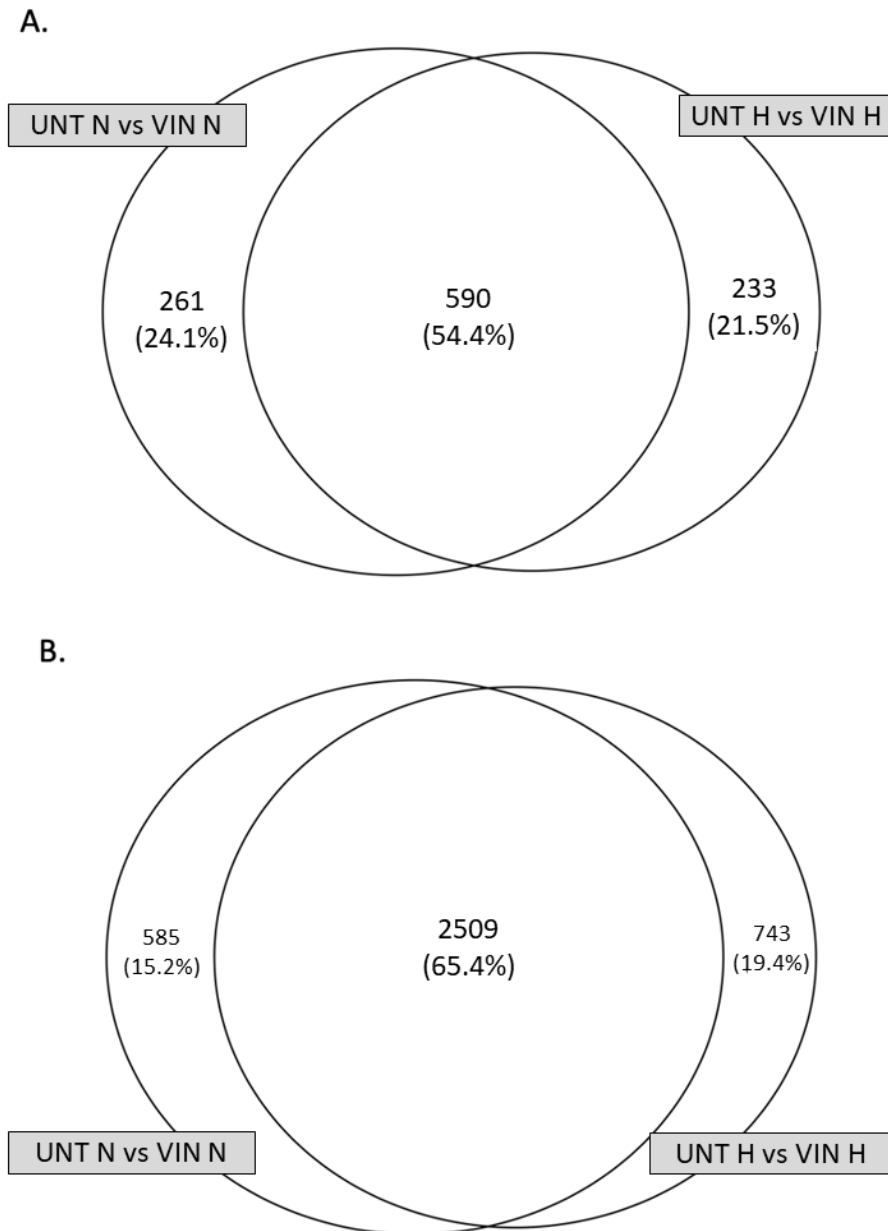
W hipoksji po traktowaniu VIN (UNT H vs VIN H) zaobserwowano zmiany w 4075 DEGs, z czego ekspresja 823 genów była obniżona, a 3252 genów była podwyższona (Fig. 26).



**Figura 26. Mapa cieplna przedstawiająca wyniki ekspresji genów istotnie zmienionych w porównaniu UNT H vs VIN H.**

Kolorem czerwonym zaznaczono geny o podwyższonej ekspresji. Kolorem niebieskim oznaczono geny o niższej ekspresji. Po lewej stronie przedstawiono wyniki dla komórek nietraktowanych (UNT H). Po prawej stronie przedstawiono wyniki dla komórek leczonych VIN (VIN H). Dane dotyczą komórek hodowanych w warunkach hipoksji.

Na podstawie analizy porównawczej par UNT N vs VIN N oraz UNT H vs VIN H odnotowano obniżoną ekspresję 590 genów w komórkach traktowanych VIN wspólnych dla normoksji i hipoksji, co stanowi 54.4% DEG. W normoksji odnotowano 261 (24.1% DEGs) charakterystycznych genów. W hipoksji liczba genów charakterystycznych o obniżonej ekspresji wyniosła 233 (21.5% DEGs) (Fig. 27A). W przypadku genów o podwyższonej ekspresji wspólnych dla normoksji i hipoksji odnotowano ich 2509 (65,4% DEGs), charakterystycznych dla normoksji 585 (15.2% DEGs), a dla hipoksji 743 (19.4% DEGs) (Fig. 27B).

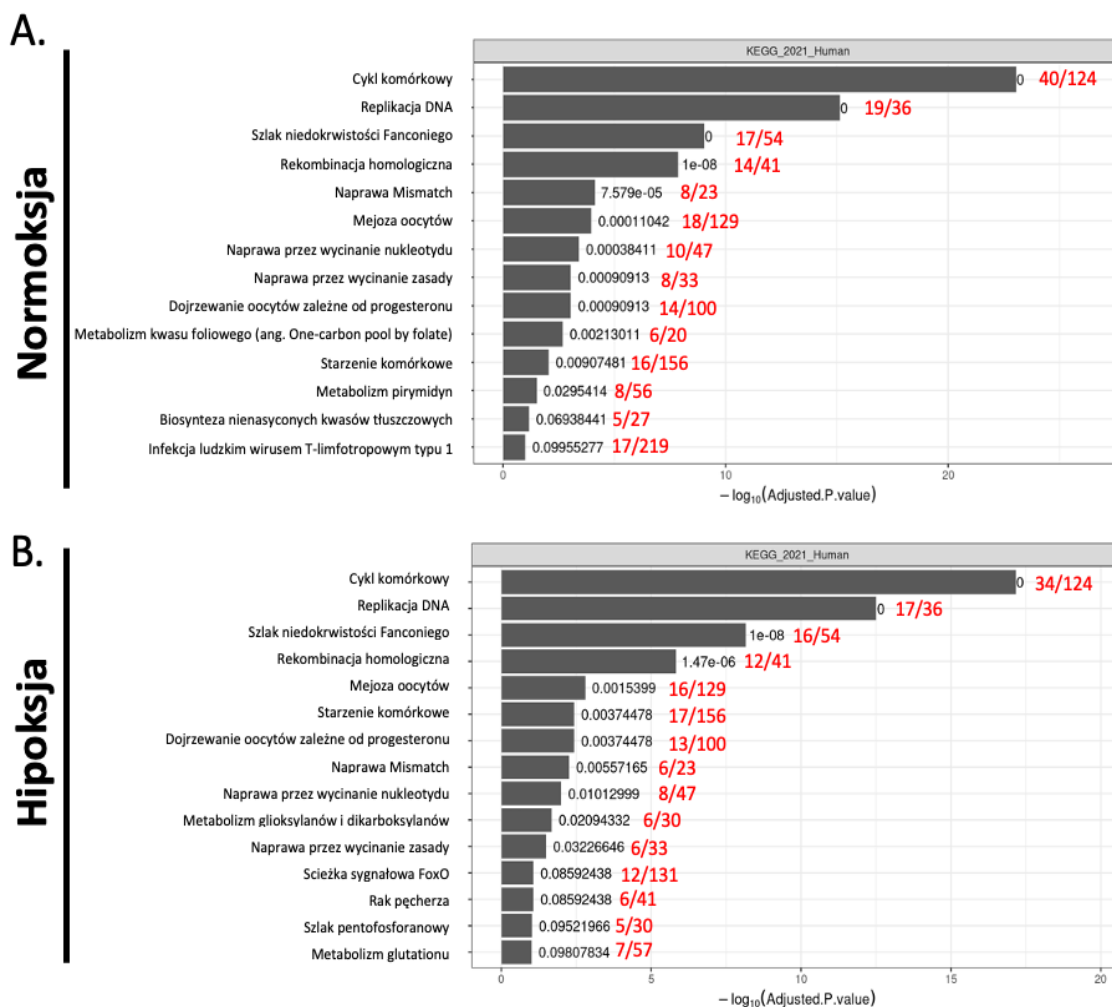


**Figura 27. Diagramy Venna przedstawiający geny zmienionej ekspresji komórek nietraktowanych (UNT) względem komórek traktowanych VIN (VIN) w normoksji i w hipoksji.**

**A.** Diagram Venna dla genów o obniżonej ekspresji w komórkach traktowanych VIN. **B.** Diagram Venna dla genów o podwyższonej ekspresji w komórkach traktowanych VIN.

W celu wytypowania szlaków ulegających zmianie w wyniku indukcji starzenia przeprowadzono analizy porównawcze z bazą KEGG (ang. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Jako wyniki istotne o wartości adjusted P-value <0.1. Wyniki analiz przedstawione na figurze 26 wykazały, że geny o obniżonej ekspresji po traktowaniu VIN, zarówno w normoksji jak i w hipoksji przypisano do szlaków odpowiedzialnych za proliferację oraz naprawę DNA. W przypadku

procesów związanych z proliferacją geny o podwyższonej ekspresji odpowiadały szlakom: cykl komórkowy, replikacja DNA, mejoza oocytów oraz dojrzewanie oocytów zależne od progesteronu. Zidentyfikowane szlaki odpowiadające za naprawę DNA to: szlak niedokrwistości Fanconiego (ang. Fanconi anemia pathway), rekombinacja homologiczna, naprawa mismatch (ang. mismatch repair), naprawa przez wycinanie zasady (ang. base excision repair), naprawa przez wycinanie nukelotydu (ang. nucleotide excision repair). Ponadto w normoksji istotne zmiany zaobserwowano też w szlakach związanych z metabolizmem kwasu foliowego (ang. one-carbon pool by folate), metabolizmu pirymidyn, biosyntezy nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz infekcją ludzkim wirusem T-limfotropowym typu 1 (Fig. 26A). W hipoksji zaobserwowano istotne zmiany w szlakach regulujących progresję raka pęcherza, szlakach metabolicznych takich jak szlak pentofosforanowy, metabolizmu glutationu oraz metabolizm glikoksylianów i dikarboksylianów. Zaobserwowano też istotne zmiany w szlaku sygnałowym FoxO (ang. forkhead box O) (Fig. 26B).



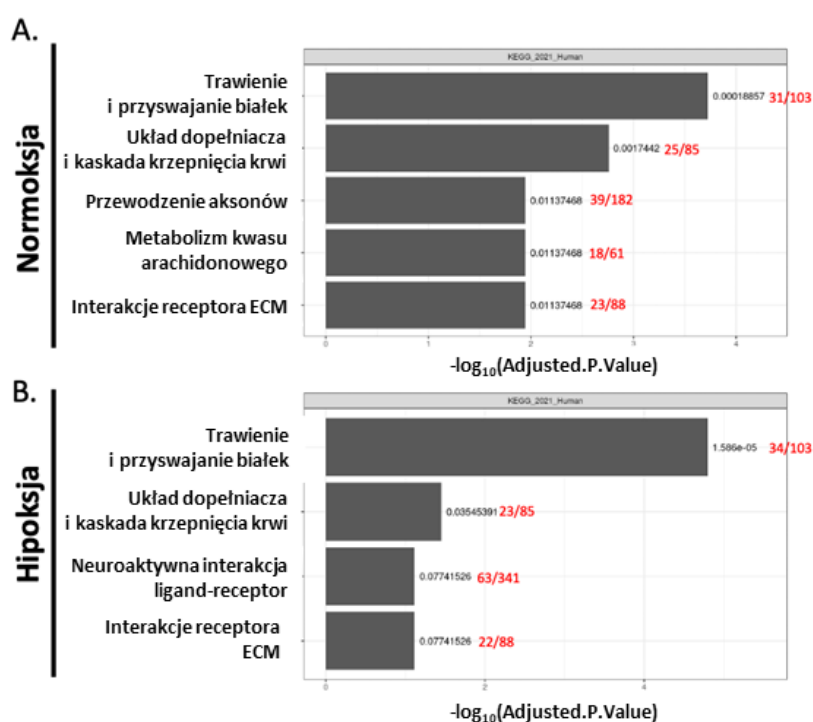
**Figura 28. Analiza szlaków najbardziej zmienionych dla genów o obniżonej ekspresji po traktowaniu VIN w normoksji i hipoksji w odniesieniu do bazy danych KEGG.**

Na wykresach przedstawiono wyniki analiz terminów KEGG dla porównań UNT vs VIN w **A.** normoksji; **B.** hipoksji. Po prawej stronie słupka przedstawiono wartości adjusted P-value oraz zaznaczone kolorem czerwonym liczbę DEGs zmienionych w badanych porównaniach w stosunku do liczby terminów przypisanych do szlaków w bazie KEGG.

W obu warunkach tlenowych zaobserwowano także zmiany w ścieżce starzenia komórkowego. W normoksji zmianie uległo 16/156 DEGs, a w hipoksji 17/156 DEGs (Fig. 28). Większość zmienionych genów (13), przypisanych do tego szlaku była taka sama zarówno w normoksji jak i w hipoksji. Geny te odgrywają rolę w regulacji cyklu komórkowego i/lub naprawy DNA. Odnotowano też niższą ekspresję genów kodujących czynniki SASP, CXCL8 (IL-8) w normoksji i hipoksji, oraz IL-6 w hipoksji.

Geny o wyższej ekspresji, zarówno w normoksji jak i w hipoksji, zostały przypisane do szlaku związanego z trawieniem i wchłanianiem białek (ang. protein digestion and absorption), szlaku układu dopełniacza i kaskady krzepnięcia krwi (ang.

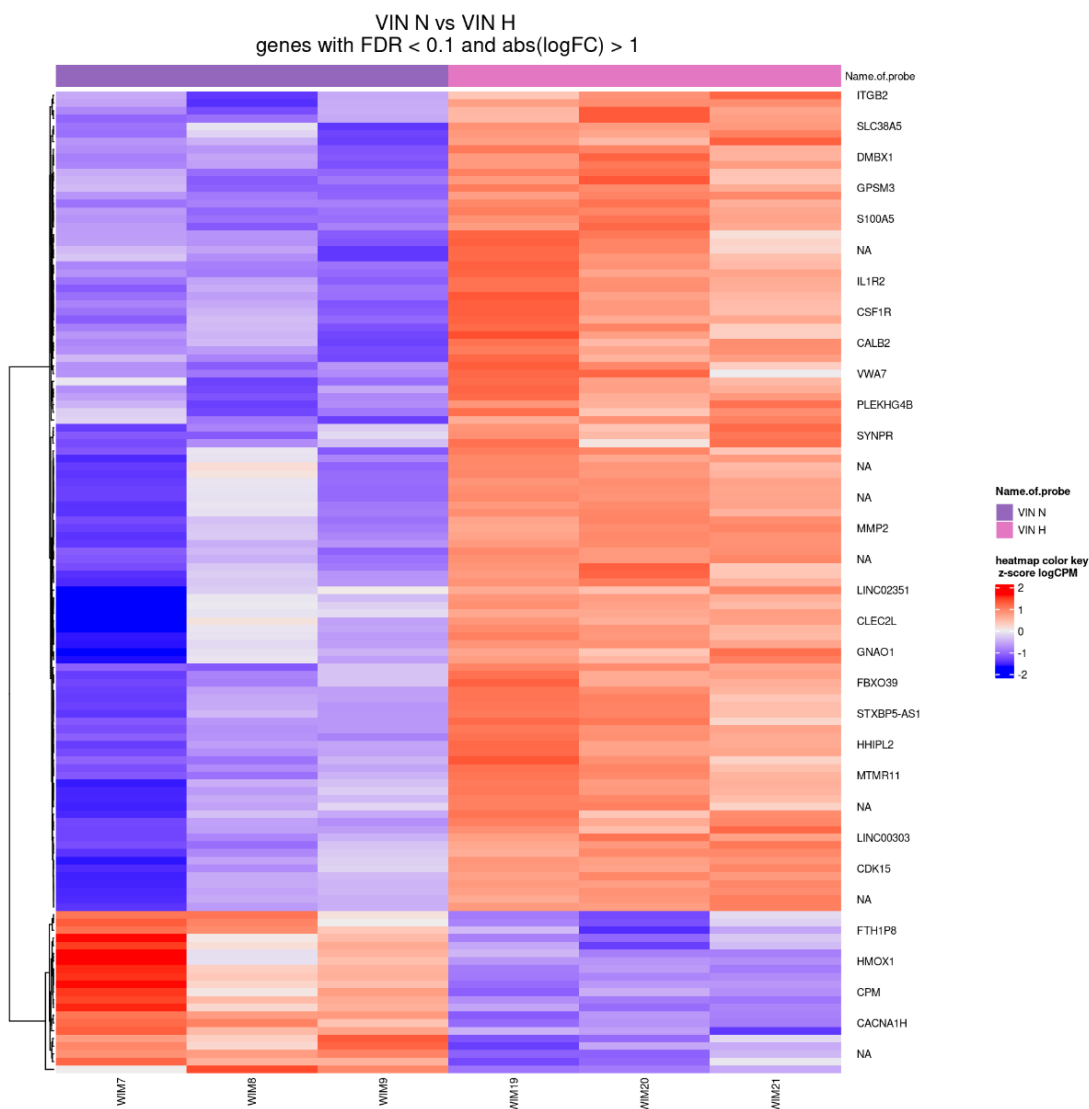
complement and coagulation cascades) oraz szlaku interakcji receptorów macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. extracellularmatrix-receptor interaction, ECM-receptor interaction) (Fig. 29A,B). Tylko w normoksji odnotowano istotne zmiany w szlaku regulującym metabolizm kwasu arachidonowego (ang. arachidonic acid metabolism) (Fig. 29A). Ponadto w obu warunkach tlenowych odnotowano zmiany w szlakach związanych z sygnalizacją komórek nerwowych: w normoksji szlak związany z przewodzeniem aksonów (ang. axon guidance) (Fig. 29A), a w hipoksji szlak związany z neuroaktywną interakcją ligand-receptor (ang. neuroactive ligand-receptor interaction) (Fig. 29B).



**Figura 29. Analiza szlaków najbardziej zmienionych dla genów o podwyższonej ekspresji po traktowaniu VIN w normoksji i hipoksji w odniesieniu do bazy danych KEGG.**

Na wykresach przedstawiono wyniki analiz terminów KEGG dla porównań UNT vs VIN w **A.** normoksji; **B.** hipoksji. Po prawej stronie słupka przedstawiono wartości adjusted P-value oraz zaznaczone kolorem czerwonym liczbę DEGs zmienionych w badanych porównaniach w stosunku do liczby terminów przypisanych do szlaków w bazie KEGG.

Na podstawie analizy porównawczej transkryptomu komórek leczonych VIN hodowanych normoksji a tych hodowanych w hipoksji (VIN N vs VIN H) odnotowano zmiany ekspresji 127 genów, z czego ekspresja 21 genów była wyższa, a 106 genów była niższa w normoksji niż w hipoksji (Fig. 30).



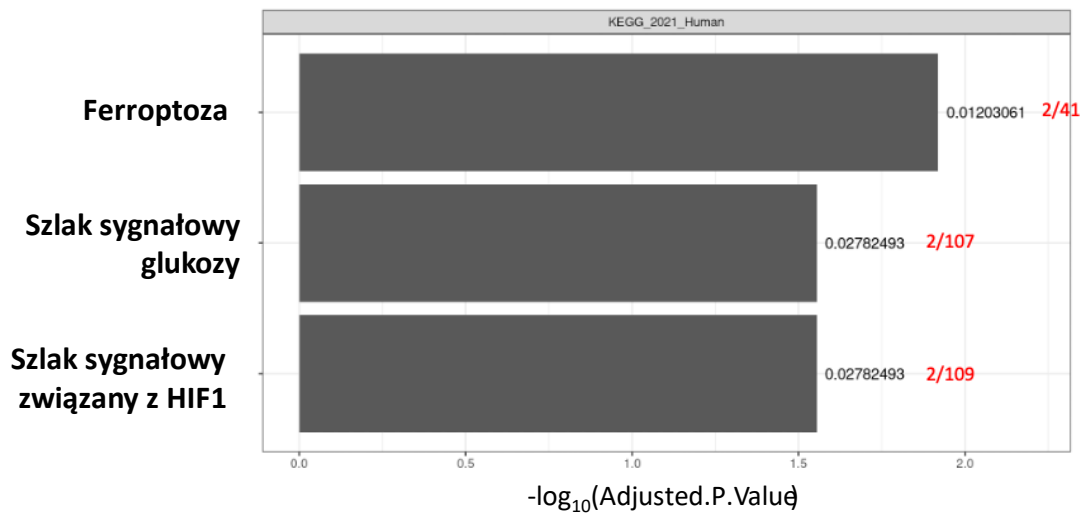
**Figura 30. Mapa cieplna przedstawiająca wyniki ekspresji genów istotnie zmienionych w porównaniu VIN N vs VIN H.**

Kolorem czerwonym zaznaczono geny o podwyższonej ekspresji. Kolorem niebieskim oznaczono geny o niższej ekspresji. Po lewej stronie przedstawiono wyniki dla komórek nietraktowanych (VIN N). Po prawej stronie przedstawiono wyniki dla komórek leczonych VIN (VIN H). Dane dotyczą komórek hodowanych w warunkach hipoksji.

Po porównaniu otrzymanych wyników z bazą KEGG geny o podwyższonej ekspresji w normoksji przypisano do trzech szlaków sygnałowych: ferroptozy (ang. ferroptosis), szlaku sygnałowego glukagonu (ang. glucagon signalling pathway), oraz szlaku sygnałowego związanego z HIF-1 (ang. HIF-1 signalling pathway) (Fig. 31). Dla genów o obniżonej ekspresji nie odnotowano szlaków, które zmanłyby się w sposób istotny statystycznie (Adjusted P-value < 0.1).

Geny przypisane do szlaku ferroptozy oraz szlaku sygnałowego związanego z HIF1 pokrywały się. W obu szlakach odnotowano zmiany w genach TFRC,

kodującego białko receptora transferyny 1 (ang. transferrin receptor protein 1) oraz HMOX1, kodujące białko oksygenazy hemowej 1 (ang. Heme Oxygenase-1, HO-1).



**Figura 31. Analiza szlaków najbardziej zmienionych dla genów o podwyższonej ekspresji w porównaniu VIN N vs VIN H w odniesieniu do bazy danych KEGG**

Na wykresach przedstawiono wyniki analiz terminów KEGG dla porównań VIN N vs VIN H. Po prawej stronie słupka przedstawiono wartości adjusted P-value oraz zaznaczone kolorem czerwonym liczbę DEGs zmienionych w badanych porównaniach w stosunku do liczby terminów przypisanych do szlaków w bazie KEGG.

Przeprowadzone analizy wykazały, że w wyniku indukcji procesu starzenia transkryptomy komórek hodowanych w normoksji oraz w hipoksji są bardzo podobne. W obu warunkach tlenowych większość istotnie zmienionych szlaków dotyczyła regulacji cyklu komórkowego oraz procesów związanych z naprawą DNA, które są jedną z głównych osi w procesie indukcji starzenia. Analizy wykazały jednak, że istnieje grupa genów, która zmienia się tylko w normoksji bądź w hipoksji, mimo braku funkcjonalnego białka pVHL. Na podstawie przeprowadzonych porównań można przypuszczać, że komórki hodowane w odmiennych warunkach tlenowych, wykazują różnice w metabolizmie. W normoksji dochodzi do istotnych zmian szlaków związanych gospodarką tłuszczu w komórce, gdy w hipoksji zmianie uległy szlaki związane z metabolizmem cukrów. Porównanie komórek leczonych VIN hodowanych w normoksji, do tych hodowanych w hipoksji wskazało, że w warunkach obniżenia poziomu tlenu zmianie mogą ulegać też procesy zależne od żelaza.



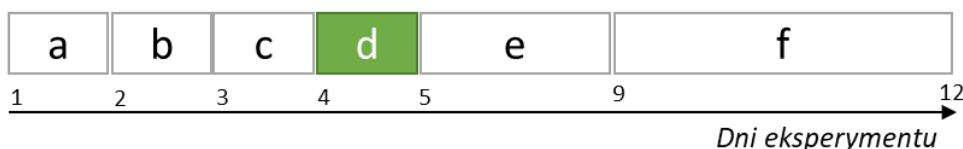
## 8.2. Rola autofagii w starzeniu komórkowym

Przeprowadzone analizy wykazały, że poza wzmożonym SASP, komórki nie wykazują zmian świadczących o ich potencjalnie efekcie na progresję nowotworową, takich jak ucieczka od blokady cyklu komórkowego. Istnieją jednak doniesienia, że stare komórki wywodzące się z innych nowotworów zdolne są do ucieczki od starzenia i generacji komórek potomnych [135, 145, 214]. Analiza ekspresji białka efektorowego mTOR wskazuje, że obserwowane zahamowanie cyklu komórkowego po traktowaniu VIN może być zmianą odwracalną. Dlatego też opracowanie schematów leczenia sprzyjających eliminacji starych komórek nowotworowych, w tym raka nerki, jest kluczowa. Aktywacja autofagii występuje równolegle z indukcją fenotypu starzeniowego [124], co zaobserwowano także w badanym modelu raka nerki. Podejrzewano więc, że modulacja tego procesu, który także jest zależny od aktywacji szlaku mTOR, może wpłynąć na proces starzenia indukowanego chemioterapią, w tym może mieć efekt senolityczny.

Na tym etapie projektu głównym celem doświadczeń było wyjaśnienie roli autofagii w starzeniu komórkowym poprzez: 1) sprawdzenie czy inhibicja autofagii, na jej wczesnym etapie, może wpłynąć na indukcję starzenia oraz 2) sprawdzenie czy zahamowanie autofagii, na jej późnym etapie, w starych komórkach może wpływać na ich przeżycie lub zdolność do reaktywacji proliferacji. W tym celu wykorzystano metody genetyczne i farmakologiczne. Pierwsza z nich opierała się na wyciszeniu genów autofagicznych *ATG5*, *ATG7*, *BECN1* oraz *ULK1*, zaangażowanych w etap inicjacji i formowania fagoforu, z wykorzystaniem małych interferujących cząsteczek RNA (siRNA). Metoda farmakologiczna opierała się na wykorzystaniu inhibitorów autofagii, HCQ i BafA1.

### 8.2.1. Zahamowanie autofagii na jej wczesnych etapach nie wpływa na starzenie komórek raka nerki

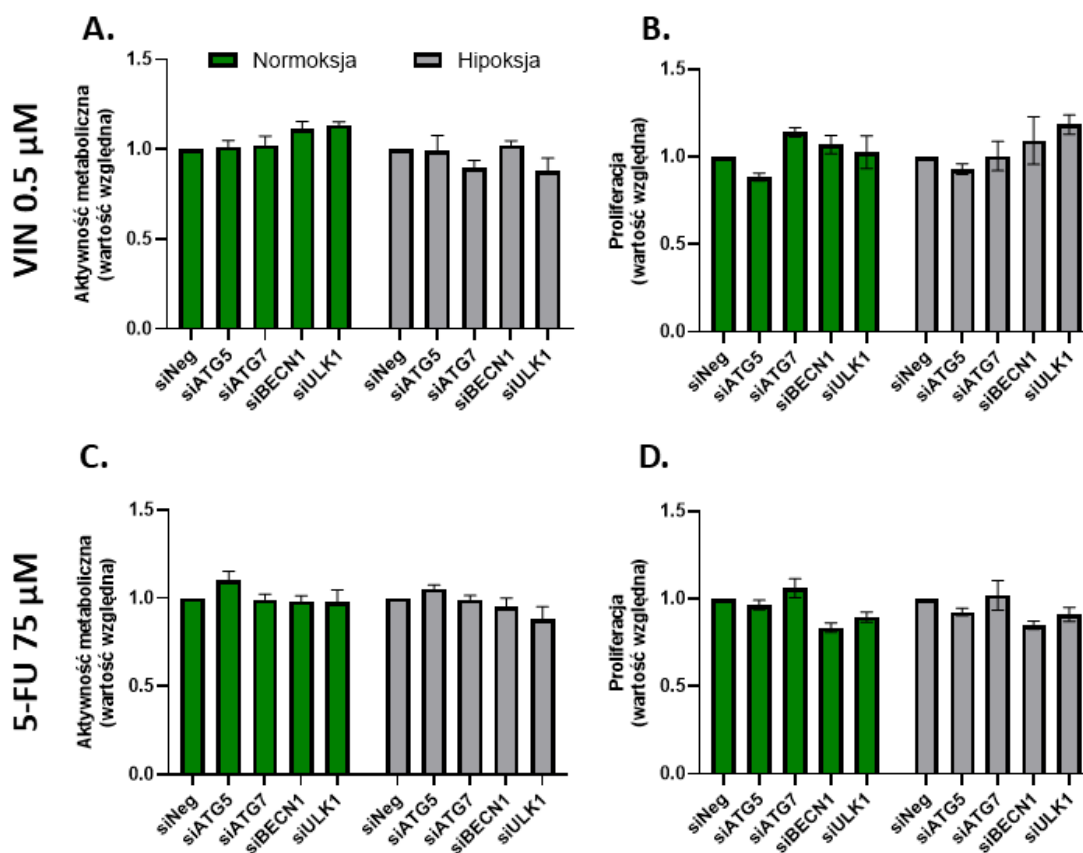
W celu wyciszenia genów, główny schemat eksperymentu wydłużono o jeden dzień. Wyciszenie przeprowadzono 2 dni po wysianiu komórek. Dzień po transfekcji komórki inkubowano przez 24 godziny z VIN w stężeniu 0.5  $\mu\text{M}$  lub 5-FU w stężeniu 75  $\mu\text{M}$ . Eksperymenty zakończono w dniu 12 (Fig. 32).



**Figura 32. Schemat przeprowadzenia eksperymentów, na podstawie których wykonano analizę wpływu modulacji autofagii na indukcję starzenia pod wpływem chemioterapii.**

Legenda: a – dzień 1 – wysianie komórek; b – dzień 2 – zmiana warunków tlenowych; c- dzień 3 – wyciszenie genów ATG5, ATG7, BECN1 oraz ULK1, metodą siRNA; d- dzień 4- inkubacja z lekami badanymi przez okres 24 h; e- dni 5-9 – w dniu 5 zmiana pożywki na wolną od chemoterapeutyków; e- dni 9-12 – w dniu 9 medium zostało wymienione na świeże, po czym eksperymenty kontynuowano do dnia 12.

Wyciszenie pojedynczych genów autofagicznych nie wpłynęło na zmianę aktywności metabolicznej oraz proliferacji w odpowiedzi na żaden z badanych leków (Fig. 33A-D). Podsumowując, genetyczne zahamowanie autofagii na jej wczesnych etapach przed traktowaniem chemoterapeutykami nie odgrywa znaczącej roli na etapie indukcji TIS w komórkach raka nerki.

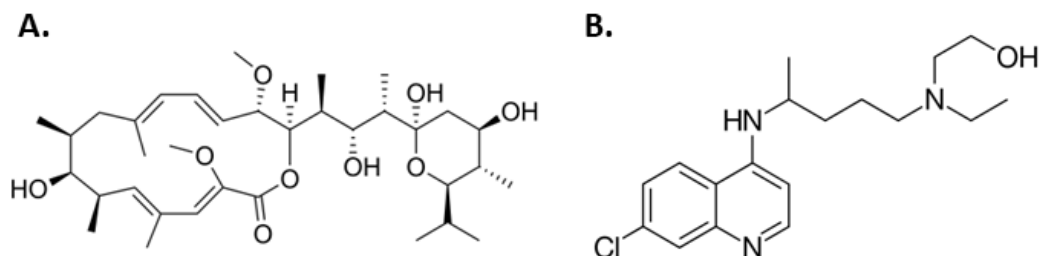


**Figura 33. Wyciszenie genów związanych z regulacją wczesnej autofagii nie wpływa na aktywność metaboliczną i proliferację komórek traktowanych VIN i 5-FU.**

Analiza wpływu wyciszenia genów autofagicznych *ATG5*, *ATG7*, *BECN1*, *ULK1* w komórkach RCC4 na: **A.** Aktywność metaboliczną po traktowaniu VIN 0.5  $\mu\text{M}$ ; **B.** Proliferację komórek po traktowaniu VIN 0.5  $\mu\text{M}$ ; **C.** Aktywność metaboliczną po traktowaniu 5-FU 75  $\mu\text{M}$ ; **D.** Proliferację po traktowaniu 5-FU 75  $\mu\text{M}$ . Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 3 \pm \text{SEM}$ . \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ .

### 8.2.2. Zahamowanie późnych etapów autofagii w starych komórkach nowotworowych hamuje ich aktywność metaboliczną i proliferację.

W związku z tym, że wyciszenie genów autofagicznych nie wpłynęło na efektywność chemioterapii, przeprowadzono analizy gdzie autofagia została zahamowana po podaniu chemioterapii. W tym celu wykorzystano dwa inhibitory farmakologiczne autofagii BafA1 i HCQ. HCQ jest pochodną chlorochiny, która działa poprzez bezpośrednie wejście do lizosomów zgodnie z gradientem pH [215, 216]. BafA1 jest antybiotykiem który hamuje działanie V-ATPazy (ang. vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase, V-ATPase) pompy protonowej odpowiedzialnej za regulację pH zewnątrz- i wewnątrzkomórkowego. Pompy protonowe występują też w błonie lizosomów, dlatego BafA1 podobnie jak HCQ powoduje neutralizację pH w tych organellach [217]. Oba związki hamują fuzję lizosomów z autofagosomami, hamując przy tym autofagię [218, 219].

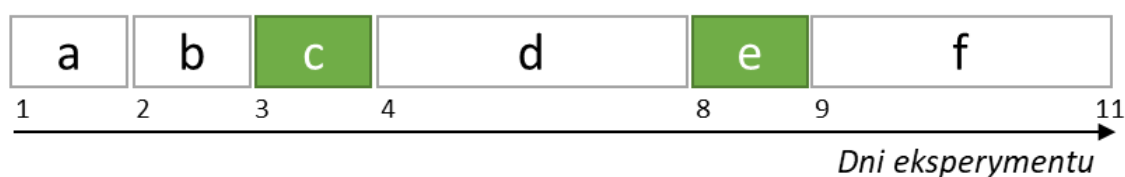


**Figura 34. Wzory strukturalne inhibitorów autofagii.**

**A.** Wzór strukturalny BafA1 (Źródło: <https://en.wikipedia.org/wiki/Bafilomycin>); **B.** Wzór strukturalny HCQ (Źródło: <https://pl.wikipedia.org/wiki/Hydroksychlorochina>).

W celu przeprowadzenia eksperymentów z użyciem farmakologicznych inhibitorów autofagii, zmodyfikowano główny schemat eksperymentu poprzez uwzględnienie inkubacji z HCQ i BafA1 w dniu 8 hodowli, cztery dni po inkubacji z chemioterapeutykami. W tym dniu w hodowlach zaobserwowano zmiany wskazujące na indukcję starzenia po traktowaniu VIN. Zahamowanie autofagii w tym momencie miało za zadanie ocenę jak inhibitory autofagii na komórki traktowane chemioterapeutykami, w tym komórki TIS. Inkubacja z inhibitorami trwała 24 godziny. W zależności od rodzaju analiz, eksperymenty zakończono w dniu 9 lub 11. Do indukcji

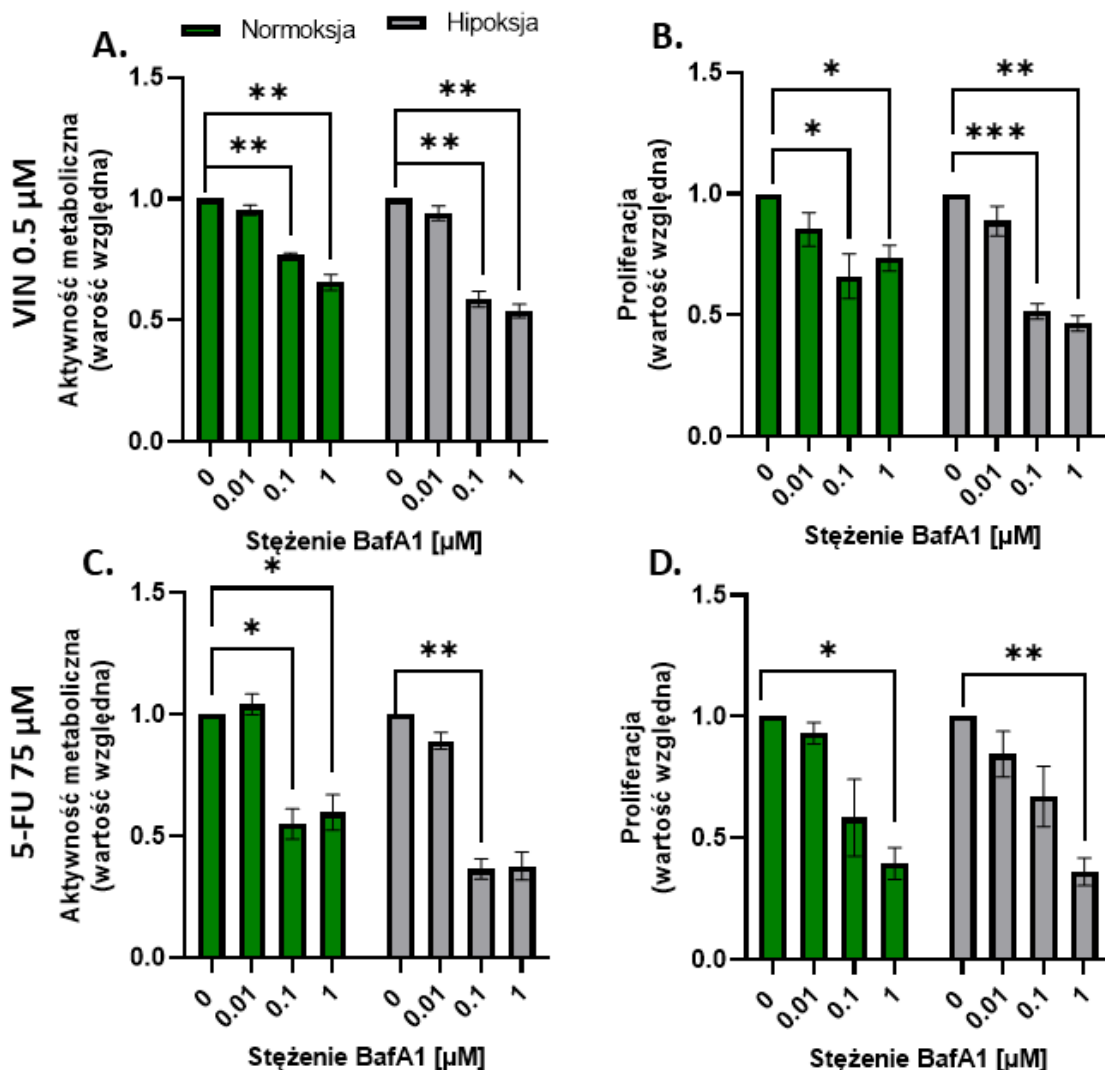
starzenia, tak jak w przypadku genetycznej modyfikacji autofagii, wykorzystano VIN w stężeniu 0.5  $\mu\text{M}$  lub 5-FU w stężeniu 75  $\mu\text{M}$  (Fig. 35).



**Figura 35. Schemat przeprowadzenia eksperymentów, na podstawie których wykonano analizę wpływu inhibicji autofagii na komórki po wcześniejszym leczeniu chemioterapią.**

Legenda: a – dzień 1 – wysianie komórek; b – dzień 2 – zmiana warunków tlenowych; c- dzień 3 - inkubacja z lekami badanymi przez okres 24 h; e- dni 4-9 – w dniu 4 pożywkę zmieniono na wolną od chemoterapeutyków; e- dzień 8 – inkubacja z farmakologicznymi inhibitorami autofagii; f - dni 9-11 – w dniu 9 medium zostało wymienione na wolne od inhibitora autofagii, po czym eksperymenty kontynuowano do dnia 11.

W pierwszej kolejności wykonano analizy aktywności metabolicznej i proliferacji komórek po leczeniu BafA1 (0-1  $\mu\text{M}$ ). BafA1 w stężeniach  $\geq 0.1 \mu\text{M}$  istotnie obniżyła aktywność metaboliczną komórek traktowanych VIN (Fig. 36A), oraz komórek traktowanych 5-FU (Fig. 36C). Komórki traktowane VIN wykazały się większą wrażliwością na zahamowanie proliferacji (Fig. 36B), niż komórki inkubowane wcześniej z 5-FU (Fig. 36D). Nie zaobserwowano żadnych różnic między komórkami hodowanymi w normoksji i w hipoksji (Fig. 36A-D).

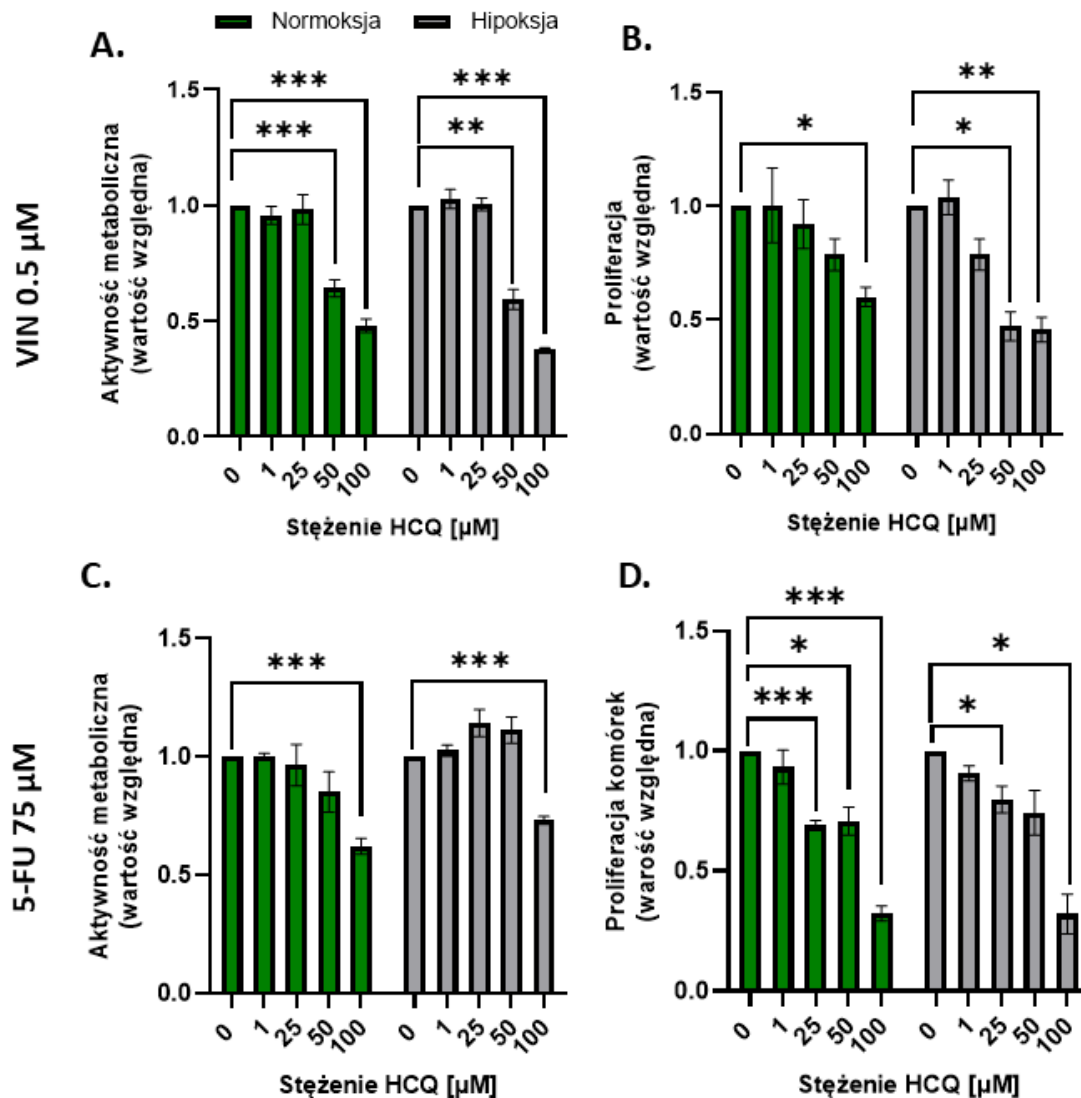


**Figura 36. BafA1 hamuje aktywność metaboliczną i proliferację komórek traktowanych 5-FU i VIN.**

**A.** Aktywność metaboliczna komórek RCC4, leczonych VIN w stężeniu 0.5 μM, w odpowiedzi na różne stężenia BafA1. **B.** Proliferacja komórek RCC4, leczonych VIN w stężeniu 0.5 μM, w odpowiedzi na różne stężenia BafA1. **C.** Aktywność metaboliczna komórek RCC4, leczonych 5-FU w stężeniu 75 μM, w odpowiedzi na różne stężenia BafA1. **D.** Proliferacja komórek RCC4, leczonych 5-FU w stężeniu 75 μM, w odpowiedzi na różne stężenia BafA1. Analiza proliferacji została wykonana przy użyciu testu inkorporacji BrdU. Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 3 \pm \text{SEM}$  wyrażoną jako odsetek wartości dla komórek traktowanych tylko VIN lub 5-FU. Wartości \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ .

Zastosowanie BafA1 wykazało, że farmakologiczna inhibicja autofagii ma działanie cytotoksyczne na komórki raka nerki traktowane VIN i 5-FU. BafA1 nie jest jednak zarejestrowana do użytku klinicznego. Z tego powodu w dalszej części badań sprawdzono, czy inny inhibitor autofagii, HCQ, wykaże się podobnym działaniem. Związek ten jest stosowany w terapii malarii i chorób autoimmunologicznych [220]. W badaniach klinicznych wykazano też, że zastosowanie terapii kombinowej HCQ

z lekami cytotoksycznymi, takimi jak GEM, zwiększa skuteczność leczenia różnych typów nowotworów [221].



**Figura 37. HCQ obniża aktywność metaboliczną i proliferację komórek traktowanych VIN i 5-FU.**

**A.** Aktywność metaboliczna komórek RCC4 traktowanych VIN 0.5  $\mu\text{M}$ , odpowiedzi na różne stężenia HCQ. **B.** Proliferacja komórek RCC4, leczonych VIN 0.5  $\mu\text{M}$ , w odpowiedzi na różne stężenia HCQ. **C.** Aktywność metaboliczna komórek RCC4, leczonych 5-FU w stężeniu 75  $\mu\text{M}$ , odpowiedzi na różne stężenia HCQ. **D.** Proliferacja komórek RCC4, leczonych 5-FU w stężeniu 75  $\mu\text{M}$ , w odpowiedzi na różne stężenia HCQ. Analiza proliferacji została wykonana przy użyciu testu inkorporacji BrdU. Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 3 \pm \text{SEM}$ . \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ .

Spadek aktywności metabolicznej w komórkach traktowanych VIN zaobserwowano po zastosowaniu niższych dawek HCQ (Fig. 37A) niż w komórkach traktowanych 5-FU (Fig. 37B). Odwrotną zależność zaobserwowano w proliferacji. W

komórkach VIN spadek proliferacji odnotowano po zastosowaniu wyższych dawek inhibitora niż w komórkach traktowanych 5-FU (Fig. 37C,D).

W wyniku leczenia VIN otrzymano hodowle heterogenne, w skład których wchodziły komórki stare oraz w zdecydowanie mniejszej ilości komórki niezmiennicze starzeniowo. W celu potwierdzenia której populacji może dotyczyć cytotoksyczny efekt HCQ przeprowadzono analogiczne analizy na komórkach nietraktowanych chemioterapią. Schemat przeprowadzenia eksperymentu przedstawiono na Figurze 38A.

Zastosowanie najwyższych stężeń HCQ w komórkach młodych istotnie zmniejszyło aktywność metaboliczną (Fig. 38B), ale nie miało wpływu na proliferację (Fig. 38C) co miało miejsce w komórkach starych i komórkach leczonych 5-FU. Co więcej, w hipoksji komórki nietraktowane wykazały się większą opornością na działanie HCQ, podobnie do komórek leczonych 5-FU (Fig. 38B,C).

Podsumowując, komórki raka nerki traktowane VIN cechują się największą wrażliwością na działanie inhibitorów autofagii. Komórki traktowane 5-FU i komórki nietraktowane są bardziej odporne na ich działanie. Sugeruje to, że zastosowanie inhibitorów w odpowiednich dawkach może działać selekcyjnie na komórki TIS.

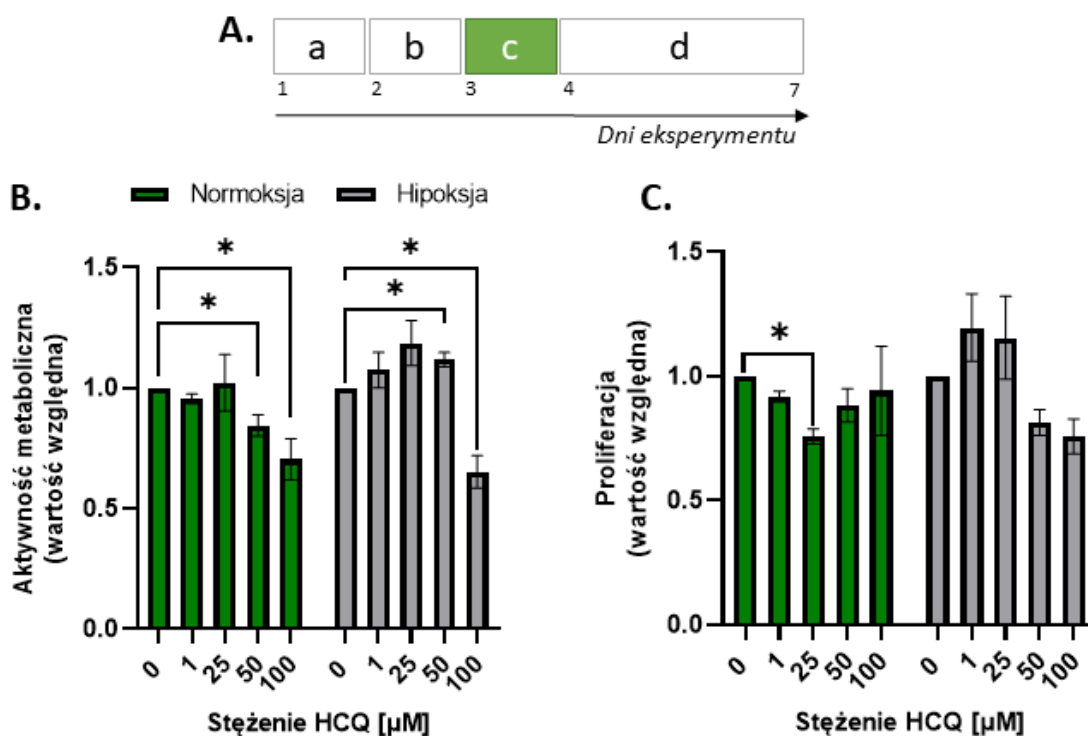


Figura 38. HCQ w mniejszym stopniu hamuje aktywność metaboliczną i proliferację komórek nietraktowanych niż komórek traktowanych chemoterapeutykami.

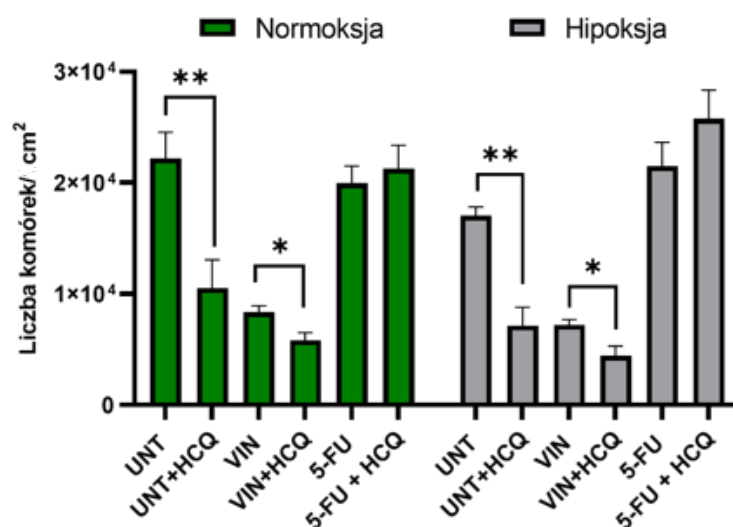
**A.** Schemat traktowanie nietraktowanych komórek raka nerki inhibitorem autofagii HCQ. Legenda: a – dzień 1 – wysianie komórek; b – dzień 2 – zmiana warunków tlenowych; c- dzień 3 –inkubacja z HCQ przez okres 24 h; d- dni 4-7 – w dniu 4 zmiana pożywki na wolną od HCQ. Eksperymenty kontynuowano do dnia 7. **B.** Aktywność metaboliczna komórek RCC4 w odpowiedzi na różne stężenia HCQ. **C.** Proliferacja komórek RCC4 w odpowiedzi na różne stężenia HCQ. Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 3 \pm \text{SEM}$ . \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ .

Bazując na uzyskanych wynikach zdecydowano, że do analiz molekularnych i fenotypowych efektu HCQ na komórki traktowane VIN, komórki nietraktowane i komórki traktowane 5-FU użyte zostanie 50  $\mu\text{M}$  stężenie.

### 8.2.3. HCQ promuje ucieczkę od starzenia w komórkach raka nerki traktowanych VIN

Ponieważ HCQ obniżyło aktywność metaboliczną oraz proliferację głównie komórek starych w dalszych eksperymentach zbadano, czy ma ona wpływ na indukcję śmierci komórkowej oraz blokadę cyklu komórkowego.

Analiza liczebności komórek wykazała, że HCQ istotnie zmniejsza gęstość hodowli komórek traktowanych VIN oraz komórek nietraktowanych zarówno w normoksji jak i w hipoksji. HCQ nie wpłynęło na komórki traktowane 5-FU (Fig. 39).



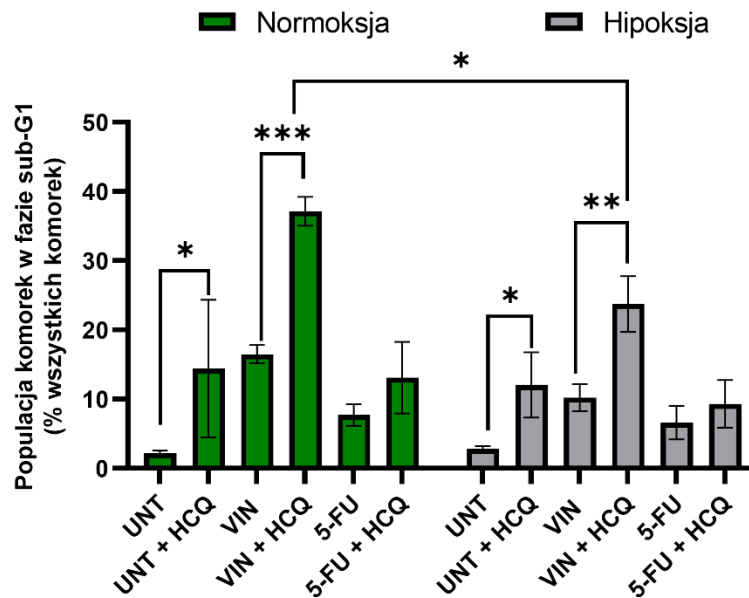
**Figura 39.** HCQ zmniejsza gęstość hodowli komórek nietraktowanych oraz komórek traktowanych VIN.

Liczbę komórek przedstawiono jako liczbę na  $\text{cm}^2$  powierzchni naczynia hodowlanego. Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 3 \pm \text{SEM}$ . \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ .

Spadek liczebności komórek może wynikać z indukcji śmierci komórkowej. Pod wpływem HCQ w hodowlach komórek nietraktowanych i komórek traktowanych VIN zwiększyła się populacja komórek w fazie sub-G1, co wskazuje na akumulację komórek



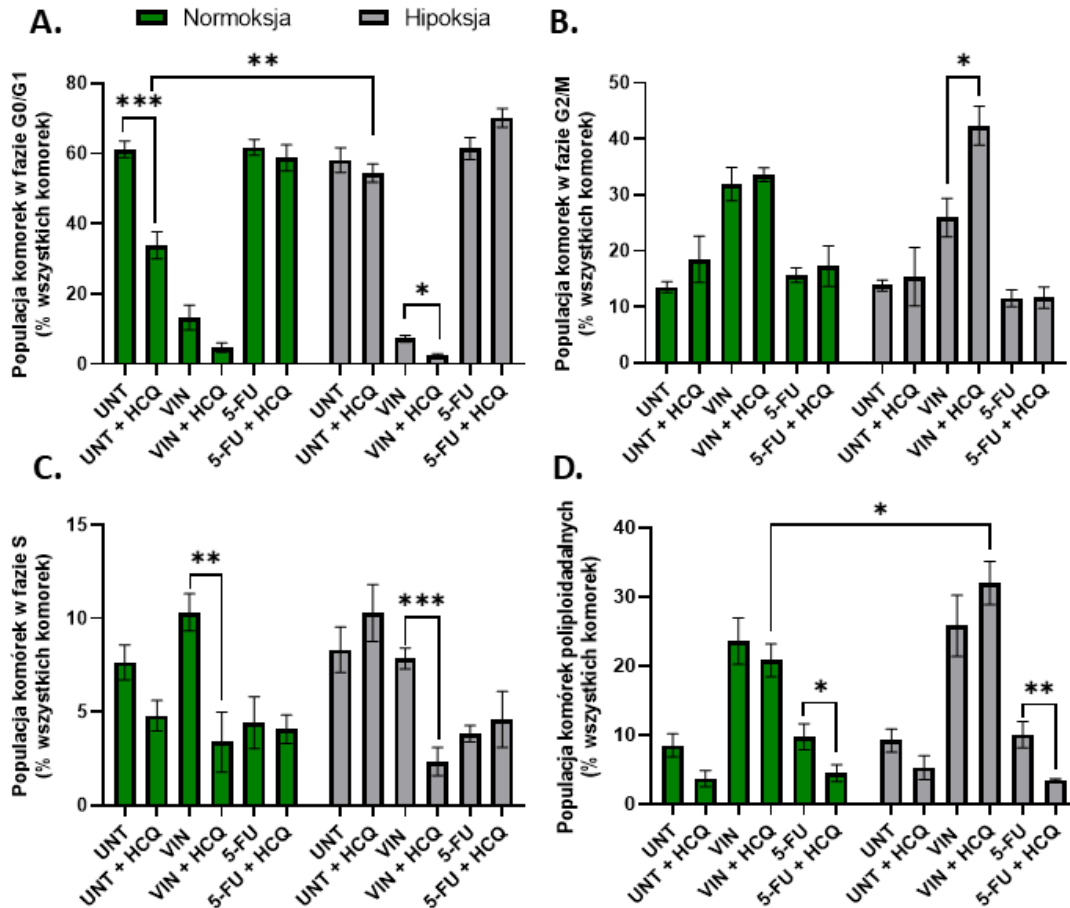
apoptotycznych. W hipoksji komórki traktowane VIN były mniej wrażliwe na indukcję śmierci komórkowej (Fig. 40).



**Figura 40. HCQ promuje akumulację komórek w fazie sub-G1 w hodowlach komórek nietraktowanych i traktowanych VIN.**

Analizę wielkości populacji komórek w fazie sub-G1 wykonano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej po interkalacji jodku propidyny do DNA. Wartości na wykresach wyrażają stosunek komórek w fazie sub-G1 w stosunku do wszystkich komórek. Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 3 \pm \text{SEM}$ : \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ .

Analiza cyklu komórkowego wykazała, że HCQ zmniejsza populację komórek młodych w fazie G0/G1 w normoksji. Taki sam efekt zaobserwowano w komórkach starych w hipoksji (Fig. 41A). HCQ w komórkach starych wpłynęło też na akumulację komórek w fazie G2/M w hipoksji (Fig. 41B) oraz obniżyło populację komórek w fazie S w obu warunkach tlenowych (Fig. 41C). Ponadto w hipoksji populacja poliploidalnych traktowanych VIN i HCQ była wyższa niż ta zaobserwowana w normoksji (Fig. 41D). HCQ nie wpłynęło na dystrybucję komórek traktowanych 5-FU w fazach cyklu (Fig. 41A-C), ale obniżyło odsetek komórek poliploidalnych (Fig. 41D).



**Figura 41. HCQ zmienia rozkład komórek nietraktowanych i komórek traktowanych VIN w cyklu komórkowym.**

Analizę dystrybucji komórek w fazach cyklu komórkowego wykonano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej po interkalacji jodku propidyny do DNA. Wartości na wykresach wyrażają odsetek komórek w danej fazie cyklu w stosunku do wszystkich komórek. Na wykresach przedstawiono analizy ilościowe faz: **A.** G0/1; **B.** G2/M; **C.** S oraz **D.** komórek poliploidalnych. Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 3 \pm \text{SEM}$ . \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ .

W celu potwierdzenia efektu HCQ na zmiany w cyklu komórkowym wykonano analizę ekspresji białek odpowiedzialnych za jego regulację, p-Rb, p-cdc 2, p53 oraz p21, przy użyciu metody Western Blot.

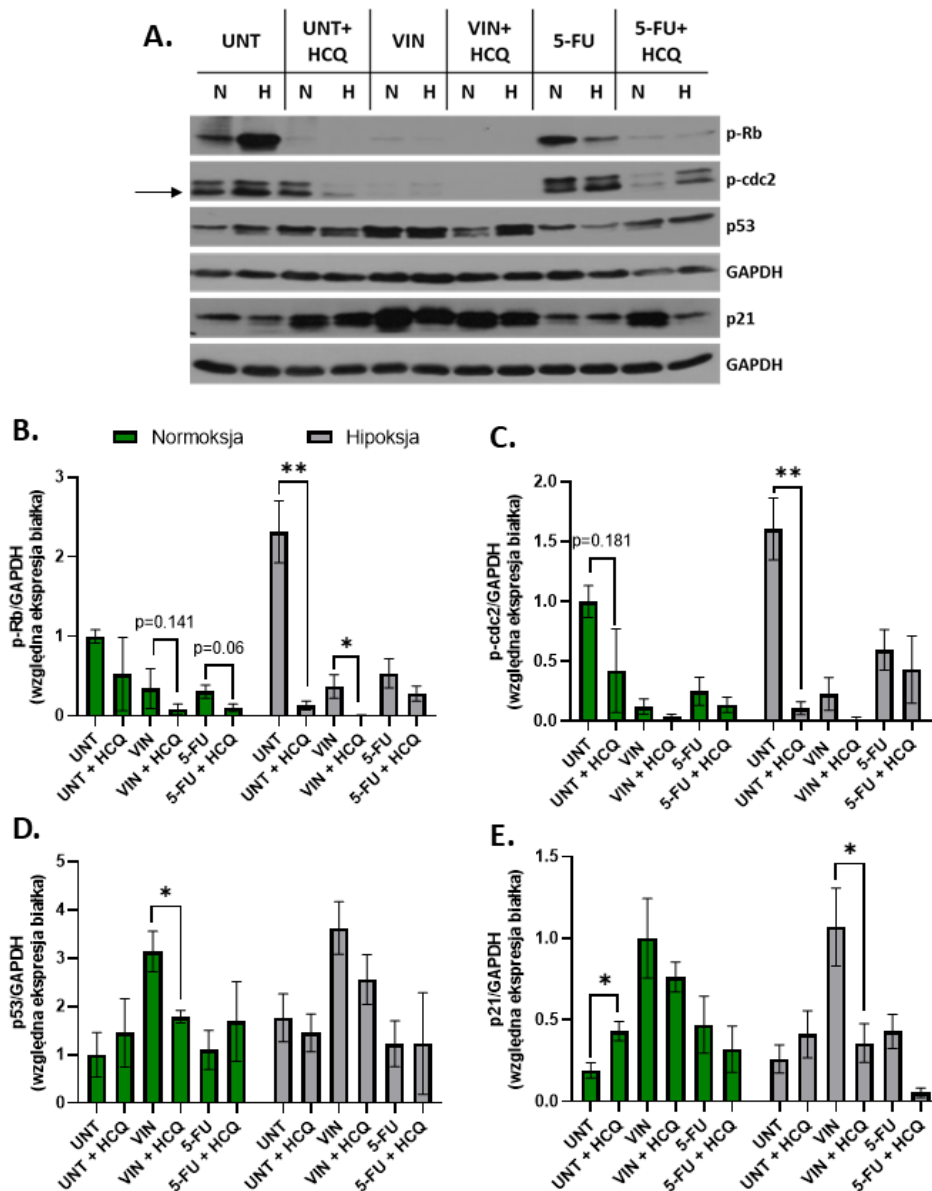
W komórkach traktowanych VIN HCQ obniżyło ekspresję białka p-Rb (Fig. 42A,B), ale nie wpłynęło w sposób istotny na ekspresję p-cdc2 (Fig. 42A,C). W normoksji odnotowano spadek ekspresji p53 (Fig. 42A,D). Z kolei w hipoksji inkubacja z HCQ spowodowała istotny spadek ekspresji p21 (Fig. 42A,E), co sugeruje wyjście z zahamowania cyklu komórkowego.

W komórkach nietraktowanych HCQ obniżyło ekspresję p-Rb (Fig. 42A,B) oraz p-cdc2 (Fig. 42A,C) w hipoksji, nie wpłynęło na ekspresję białka p53 (Fig.

42A,D), ale w normoksji promowało nadekspresję białka p21 (Fig. 42A,D). Wyniki te wskazują na zahamowanie cyklu komórkowego oraz tłumaczą zmniejszenie populacji komórek w fazie G0/G1 w normoksji.

W komórkach traktowanych 5-FU zahamowanie autofagii nie wpłynęło w sposób istotny na ekspresję badanych białek (Fig. 42A-E), co potwierdza brak różnic w dystrybucji komórek w cyklu komórkowym.

Podsumowując, HCQ nie działa selekcyjnie na komórki raka nerki indukowane do starzenia. Zarówno w komórkach nietraktowanych, jak i traktowanych VIN inhibicja autofagii promuje blokadę cyklu komórkowego. Z kolei spadek ekspresji p53 i p21 w poliploidalnych komórkach traktowanych VIN sugerują, że mogą one uciekać od starzenia.



**Figura 42. HCQ hamuje ekspresję białek związanych z regulacją cyklu komórkowego, ale obniża ekspresję inhibitorów cyklu komórkowego w komórkach traktowanych VIN.**

**A.** Reprezentacyjne wyniki analizy Western Blot przedstawiające ekspresję białek p-Rb, p-cdc2, p53 oraz p21. GAPDH użyto jako białka referencyjnego. N - normoksja, H - hipoksja; **B.** Względna ekspresja białka pRb **C.** Względna ekspresja białka p-cdc2. **D.** Względna ekspresja białka p53. **D.** Względna ekspresja białka p21. Wartości względnych ekspresji badanych białek wyrażają stosunek wartości uzyskanych dla odpowiedniego białka do GAPDH. Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 3 \pm \text{SEM}$  \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ .

### 8.2.3.1. Hipoksja przyspiesza generację komórek potomnych w wyniku zahamowania autofagii

Spadek ekspresji p21 i p53 wskazuje na ucieczkę od starzenia, co może wiązać się z generacją komórek potomnych. Udowodniono, że komórki poliploidalne mogą

ulegać podziałom amitotycznym w wyniku depoliploidyacji [222]. Zajście tego procesu można ocenić na podstawie zmian w morfologii jąder komórkowych.

W celu zbadania czy inhibicja autofagii mogła wpłynąć na indukcję depoliploidyacji przeprowadzono analizy morfologii jąder komórkowych. W celu określenia kinetyki zmian, morfologię analizowano w dwóch punktach czasowych, w dniach 9 i 11 eksperymentu, odpowiednio 24 i 72 godziny po podaniu HCQ (Fig. 35). Jądra komórkowe zostały wybarwione przy użyciu barwnika Hoechst 33342. Barwienie przeprowadzono przyżyciowo na komórkach hodowanych w normoksji oraz w hipoksji. Na podstawie obserwacji mikroskopowej scharakteryzowano cztery populacje komórek: 1) komórki z jądrami o normalnej morfologii, 2) komórki z jądrami powiększonymi, 3) komórki z jądrami pączkującymi oraz 4) komórki wielojądrzaste. Zdjęcia obrazujące różnice w morfologii jąder komórkowych przedstawiono na figurze 9.

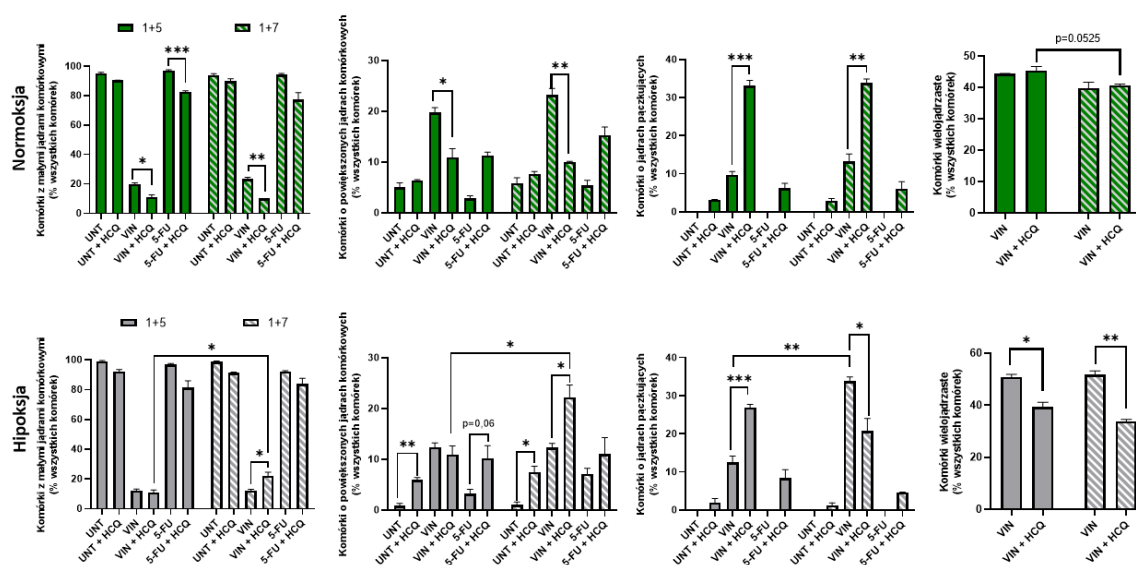
Populacja komórek z normalnymi jądrami komórkowymi była najmniejsza w komórkach traktowanych VIN zarówno w normoksji jak i w hipoksji (Fig. 43A,E). Po zastosowaniu HCQ populacja komórek TIS z normalnymi jądrami komórkowymi spada w normoksji niezależnie od badanego punktu czasowego (Fig. 43A). Z kolei w hipoksji zaobserwowano zwiększenie się wielkości tej populacji w miarę upływu czasu (Fig. 43E).

Po zahamowaniu autofagii w normoksyjnych komórkach traktowanych VIN zaobserwowano też zmniejszenie się populacji komórek o powiększonych jądrach komórkowych (Fig. 43B). W hipoksji zaobserwowano, że w miarę upływu czasu populacja ta rośnie (Fig. 43F). Nagromadzenie się komórek o powiększonych jądrach komórkowych zaobserwowano również w komórkach młodych (Fig. 43F).

Komórki z jądrami pączkującymi były widoczne tylko w komórkach traktowanych VIN, a zahamowanie autofagii istotnie zwiększyło tę populację w normoksji i hipoksji w dniu 9 (Fig. 43C, G). W normoksji populacja ta zwiększyła się w miarę upływu czasu (Fig. 43C). W hipoksji, w dniu 11 zaobserwowano odmienną kinetykę zmian, gdzie populacja ta malała (Fig. 43G). Zahamowanie autofagii doprowadziło też do powstania tego typu komórek w hodowlach komórek nietraktowanych i komórek traktowanych 5-FU (Fig. 43C,G).

Komórki wielojądrzaste obecne były tylko w hodowlach komórek traktowanych VIN (Fig. 42D,H). W hipoksji zahamowanie autofagii doprowadziło do istotnego zmniejszenia się wielkości tej populacji komórek obu punktach czasowych (Fig. 43H).

Podsumowując otrzymane wyniki wskazują, że w miarę upływu czasu od zahamowania autofagii w hipoksji dochodzi do generacji komórek potomnych mimo blokady cyklu komórkowego.



**Figura 43. Analiza kinetyki zmian w odsetkach populacji komórek o różnych typach morfologii jąder komórkowych.**

Analizę kinetyki zmian morfologii jąder komórkowych wykonano w dwóch punktach czasowych. Morfologię jąder oceniano na podstawie zdjęć preparatów immunofluorescencyjnych, gdzie badane organelle wybarwiono Hoechst 33342.

#### 8.2.4. Generacja komórek potomnych może być związana z blokadą przepływu autofagii i reaktywacją aktywności lizosomalnej

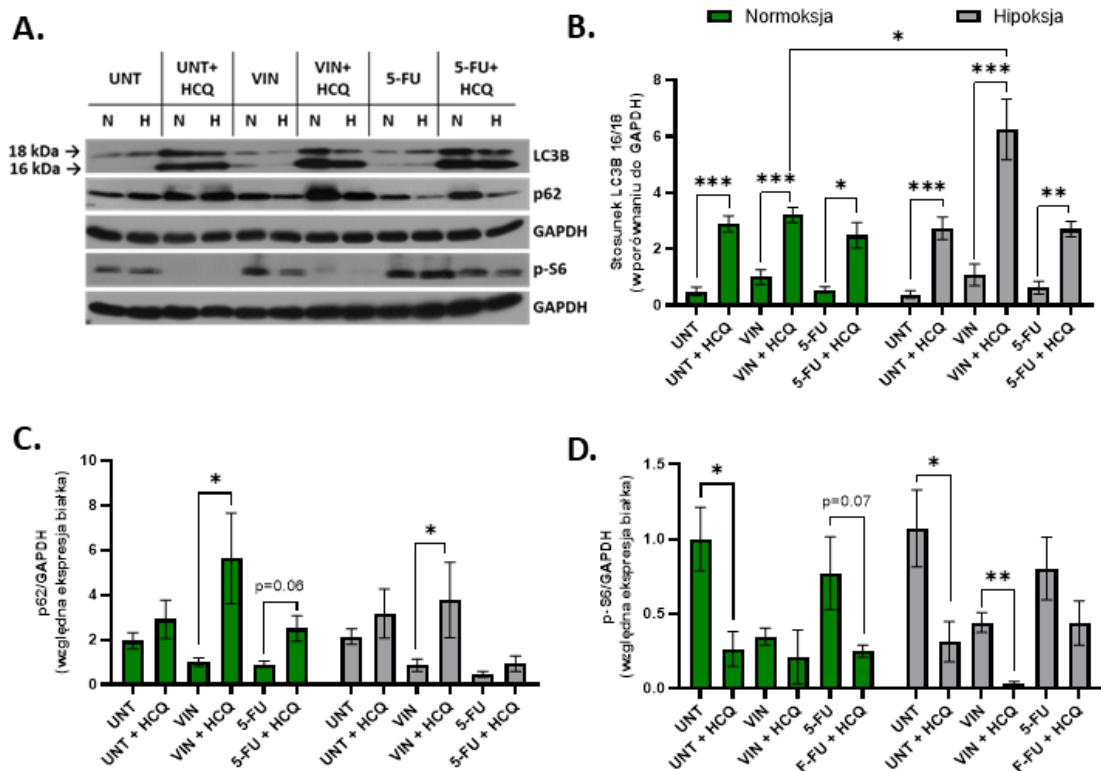
W ludzkich komórkach dochodzi do aktywacji autofagii. Proponuje się, że autofagia może regulować proces depoliploidyzacji i ucieczki od starzenia [157, 223]. Mechanizm działania HCQ opiera się na upośledzeniu zdolności autofagosomów do fuzji z lizoamami, hamując przy tym przepływ autofagiczny [224]. Z tego powodu w dalszej części pracy zbadano, czy zastosowanie HCQ wpłynęło na proces autofagii w komórkach traktowanych VIN oraz w komórkach traktowanych 5-FU i nietraktowanych.

W celu zbadania czy HCQ wpływa na proces autofagii wykonano analizy ekspresji białek LC3B, p62 oraz p-S6 metodą Western Blot w dniu 11 eksperymentu (Fig. 35).

HCQ istotnie zwiększyło stosunek form 16 do 18 białka LC3B we wszystkich badanych próbkach (Fig. 43A,B) co wskazuje na aktywację autofagii. Najbardziej istotne zmiany HCQ wywołało w starych hodowanych w hipoksji (Fig. 44A,B). W hipoksji HCQ obniżyło też ekspresję p-S6, w komórkach traktowanych VIN i

nietraktowanych. W normoksji takie zmiany zaobserwowano w komórkach nietraktowanych (Fig. 44A,D). Zmiany te wskazują, że w komórkach do aktywacji autofagii.

W tym samym czasie HCQ w komórkach starych zwiększyło ekspresję p62 niezależnie od warunków tlenowych. Tendencję wzrostową zaobserwowano także po podaniu HCQ do komórek traktowanych 5-FU (Fig. 44 A,C). Brak degradacji p62 wskazuje, że w komórkach nie doszło do lizy autofagolizosomów, mimo aktywacji autofagii. Zmiany te sygnalizują, że zastosowanie HCQ blokuje przepływ autofagiczny, szczególnie w komórkach traktowanych VIN.



**Figura 44. HCQ blokuje przepływ autofagiczny w komórkach raka nerki.**

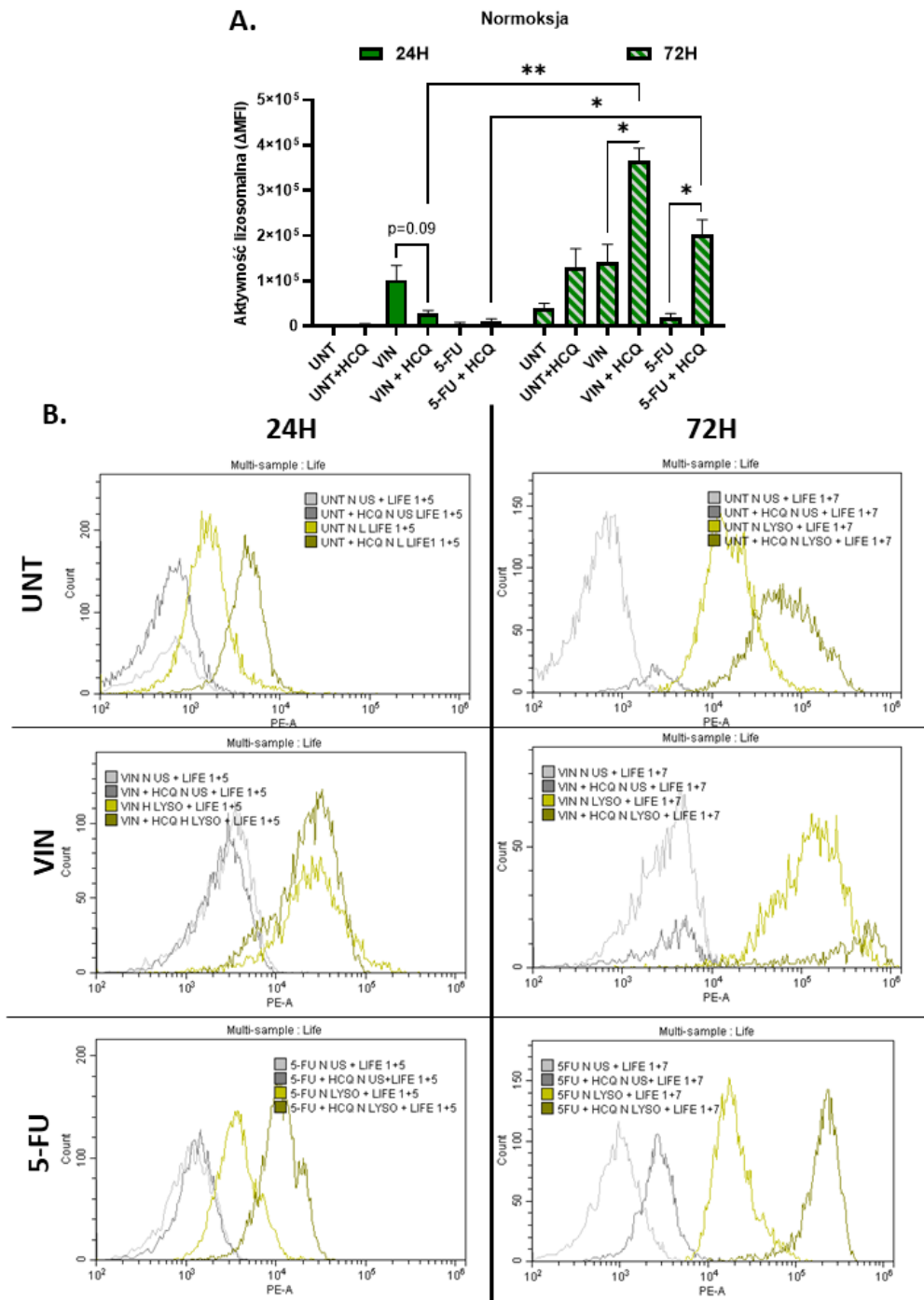
**A.** Reprezentacyjne wyniki analizy Western Blot przedstawiające ekspresję białek LC3B, p62, p-S6. GAPDH użyto jako białka referencyjnego. N - normoksja, H - hipoksja **B.** Stosunek względnych wartości dwóch form białka LC3B (16/18) **C.** Względna ekspresja białka p62. **D.** Względna ekspresja białka p-S6. Wartości względnych ekspresji badanych białek wyrażają stosunek wartości uzyskanych dla odpowiedniego białka do GAPDH. Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 3 \pm SEM$ . \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ .

Autofagia jest zależna od aktywności lizosomów [224]. W celu sprawdzenia czy modulacja autofagii z użyciem HCQ wiąże się ze zmianą aktywności lizosomalnej wykonano analizy cytometryczne, w których lizosomy zostały wybarwione przy użyciu barwnika fluorescencyjnego, LysoTrackera™. LysoTracker™ specyficznie wybarwia

organella o niskim pH, takie jak lizosomy. W celu zbadania kinetyki zmian aktywność lizosomalną oznaczono w dniu 9 (24H po podaniu HCQ) oraz w dniu 11 (72H po podaniu HCQ) eksperymentu (Fig. 35).

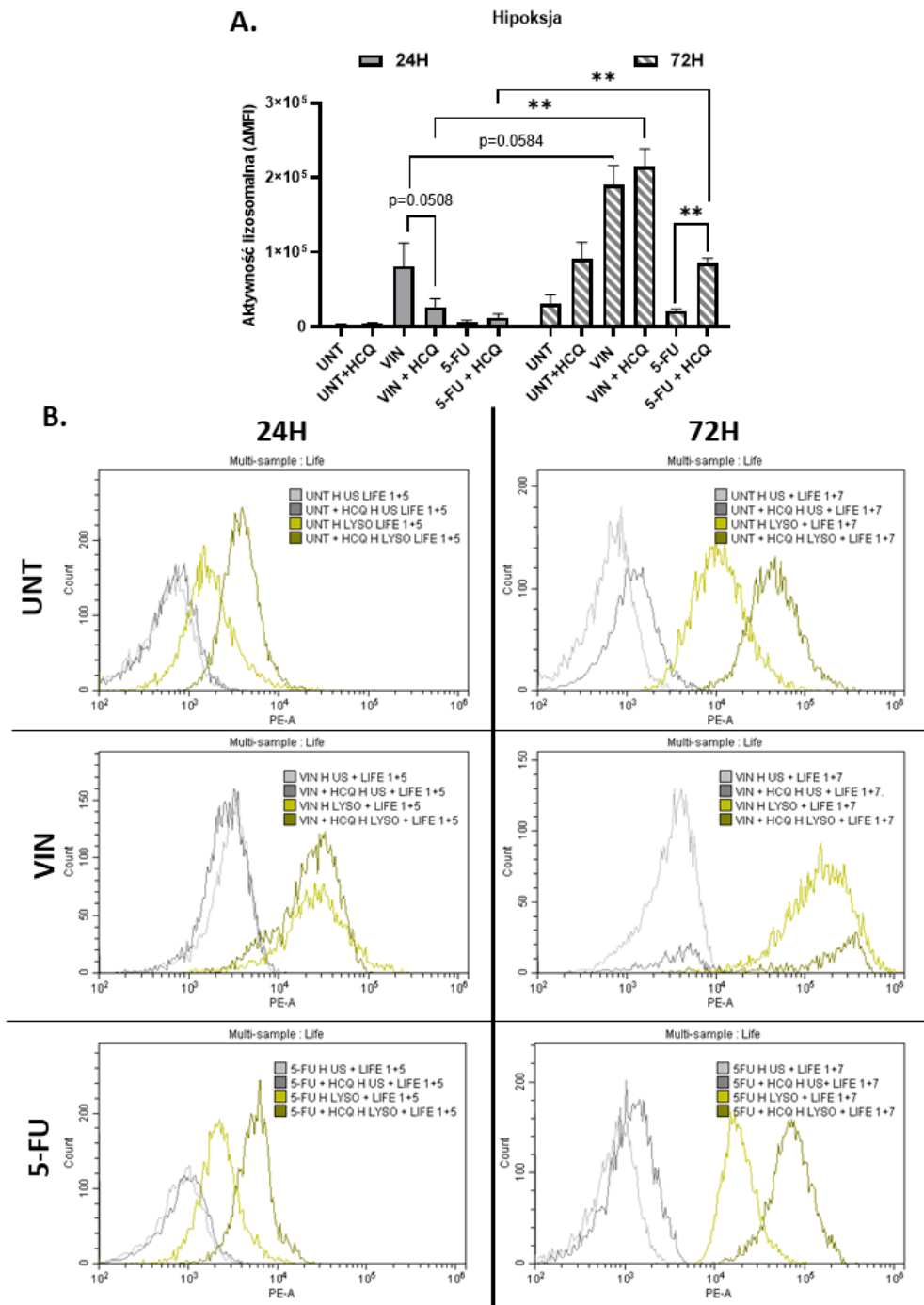
HCQ w dniu 9 zmniejszyło aktywność lizosomalną w starzejących się komórkach w normoksji (Fig. 45) i w hipoksji (Fig. 46). Z kolei w dniu 11 zaobserwowano reaktywację aktywność lizosomalnej (Fig. 45; Fig. 46). W normoksji, po inkubacji z HCQ, aktywność lizosomalna w komórkach traktowanych VIN była prawie 2x wyższa (Fig. 45) niż w hipoksji (Fig. 46). Reaktywację aktywności lizosomalnej zaobserwowano także w komórkach traktowanych 5-FU (Fig. 45; Fig. 46), podczas gdy w komórkach nietraktowanych nie zaobserwowano istotnie statystycznych zmian (Fig. 44; Fig. 45).





**Figura 45. HCQ wzmacnia aktywność lizosomalną komórek w normoksji w komórkach traktowanych VIN i 5-FU w miarę upływu czasu.**

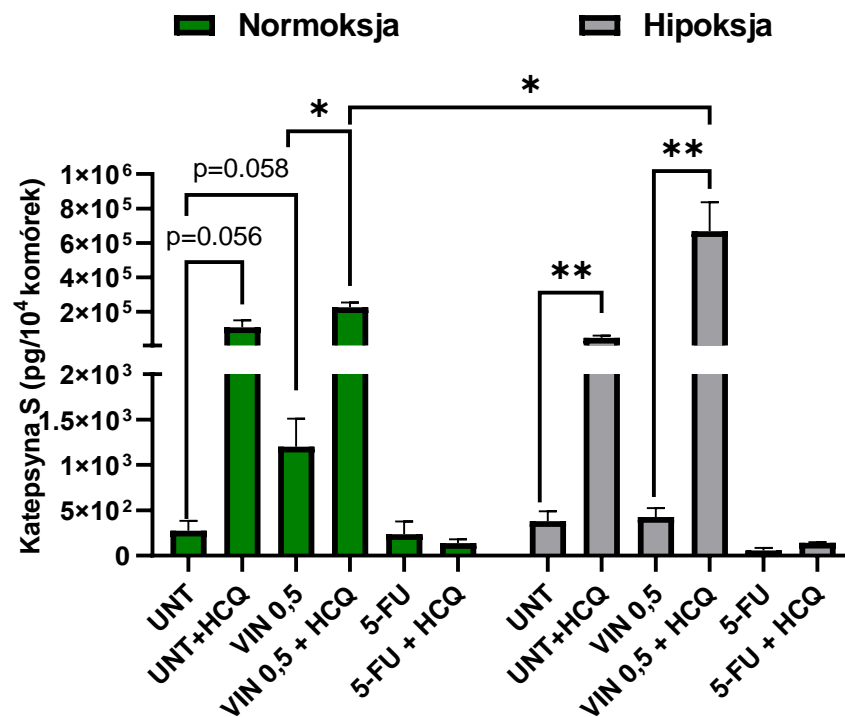
Eksperymenty wykonano przy użyciu cytometrii przepływowej. Komórki wybarwiono przyżyciowo barwnikiem fluorescencyjnym Lysotracker™ Red DND. **A.** Analiza kinetyki zmian w aktywności lizosomalnej komórek hodowanych w normoksji 24H i 72H po podaniu HCQ wyrażona jako średnią wartość fluorescencji -  $\Delta MFI$  (różnica sygnału pozytywnego od sygnału negatywnego). Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 3 \pm SEM$ . \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ . **B.** Reprezentacyjne histogramy przedstawiające wzór intensywności fluorescencji komórek niebarwionych oraz barwionych Lysotracker™ Red DND (PE-A - EM  $585 \pm 21$ ).



**Figura 46.** W hipoksji HCQ promuje aktywność lizosomalną w niższym stopniu niż w normoksji.

Eksperymenty wykonano przy użyciu cytometrii przepływowej. Komórki wybarwiono przyżyciowo barwnikiem fluorescencyjnym Lysotracker™ Red DND. **A.** Analiza kinetyki zmian w aktywności lizosomalnej komórek hodowanych w normoksji 24H i 72H po podaniu HCQ wyrażona jako średnią wartość fluorescencji -  $\Delta$ MFI (różnica sygnału pozytywnego od sygnału negatywnego). Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 3 \pm$  SEM. \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ . **B.** Reprezentacyjne histogramy przedstawiające wzór intensywności fluorescencji komórek niebarwionych oraz barwionych Lysotracker™ Red DND (PE-A - EM 585 $\pm$ 21).

Ponieważ hipoksja może zaburzać pH zewnątrz jak i wewnątrz komórek, w celu weryfikacji wyników z analizy cytometrycznej wykonano dodatkowe oznaczenie na sekrecję Katepsyny-S w 11 dniu eksperymentu. Katepsyna-S jest markerem aktywności lizosomalnej, który odgrywa istotną rolę w regulacji przepływu autofagicznego [225]. Aktywność tego enzymu jest niezależna od pH w komórce [209]. HCQ spowodowało istotny wzrost sekrecji Katepsyny S w komórkach młodych oraz komórkach starych w normoksji jak i w hipoksji, gdzie wzrost był istotnie wyższy w hipoksji. W komórkach leczonych 5-FU nie zaobserwowano żadnych istotnych zmian w stężeniu wydzielanej przez komórki Katepsyny S (Fig. 46). Sugeruje to, że w komórkach traktowanych VIN i nietraktowanych dochodzi do wzrostu aktywności lizosomalnej po zahamowaniu autofagii.



**Figura 47.** Traktowanie HCQ zwiększa sekrecję Katepsyny S w komórkach nietraktowanych i komórkach traktowanych VIN.

Analiza poziomu Katepsyny S w medium zebrany w dniu 1+7 wykonana przy użyciu metody ELISA. Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 3 \pm \text{SEM}$ . \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ .

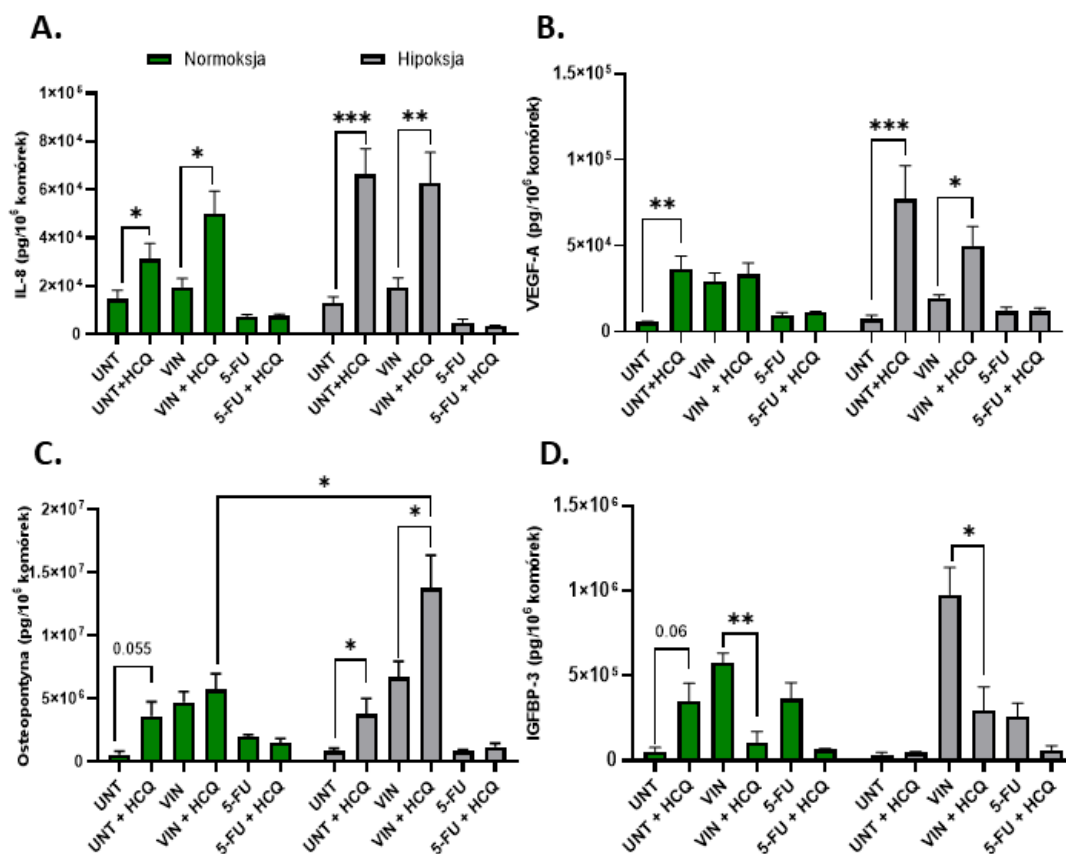
Podsumowując, HCQ hamuje przepływ autofagiczny. Zastosowanie tego inhibitora krótkotrwale hamuje aktywność lizosomalną. Reaktywuje się ona po usunięciu leku. Zmiany te były największe w hipoksji co pokrywa się z generacją komórek potomnych w niedotlenieniu.

### **8.2.5. Inhibicja autofagii zmienia sekrecję SASP**

SASP jest nie tylko markerem starych komórek nowotworowych. Odgrywa on też istotną rolę w komunikacji komórek starych z mikrośrodowiskiem guza. Aktywność autofagii może też promować sekrecję SASP [226].

Analizę sekrecji wybranych czynników SASP przeprowadzono w dniu 11 eksperymentu (Fig. 35). Sekrecja IL-8, VEGF, osteopontyny i IGFBP-3 wzrosła w pod wpływem HCQ w komórkach młodych, co sugeruje pro-starzeniowy efekt HCQ (Fig. 48A-D). Inhibicja autofagii wpłynęła na sekrecję SASP przez komórki traktowane VIN głównie w hipoksji, gdzie poziomy IL-8 VEGF-A i osteopontyny wzrosły (Fig. 48-C), a sekrecja iGFBP3 obniżyła się (Fig. 48D). Poziom IGFBP-3 obniżył się też w normoksji (Fig. 48D). W komórkach leczonych 5-FU nie zaobserwowano żadnych istotnych zmian pod wpływem leczenia HCQ (Fig. 48A-D).

Podsumowując wykazano, że generacji komórek potomnych w hipoksji towarzyszy istotny wzrost sekrecji takich czynników SASP jak IL-8, VEGF-A oraz osteopontyna przy równoczesnym spadku sekrecji IGFBP-3. Zmiany te potwierdzają, że zahamowanie autofagii wpływa na ucieczkę od starzenia komórek traktowanych VIN. Zbadanie roli SASP w ucieczce od starzenia jest kluczowa do lepszego zrozumienia tego procesu. Ponadto, przedstawione wyniki wskazują, że czynniki takie jak IGFBP-3 czy Osteopontyna mogą posłużyć jako markery do detekcji komórek uciekających od starzenia.



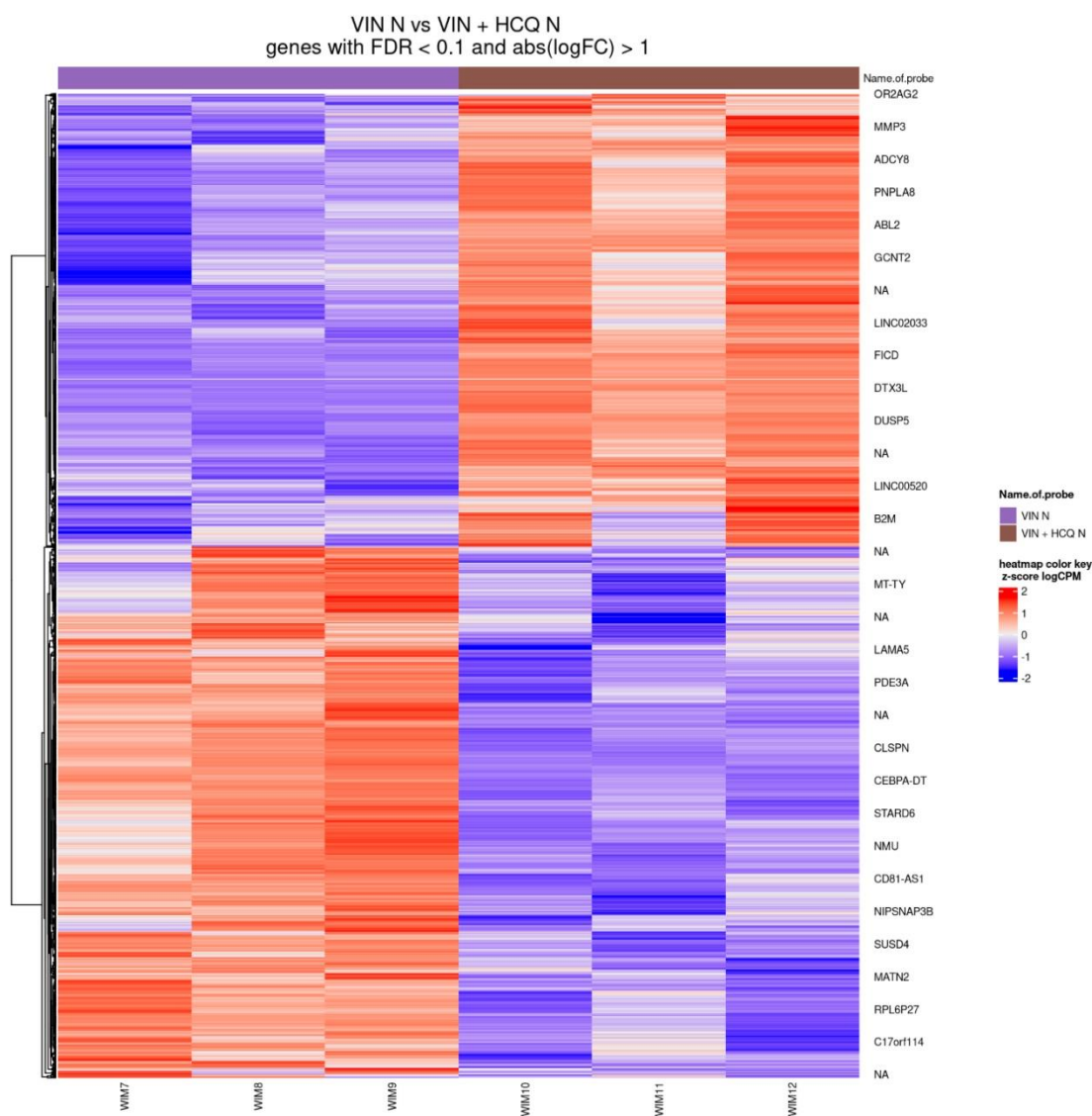
**Figura 48. Inhibicja autofagii wpływa w znaczący sposób na zmiany w sekrecji czynników SASP w modelach komórek młodych oraz TIS**

Wyniki analizy sekrecji wybranych czynników SASP wykonana metodą ELISA: **A.** IL-8; **B.** VEGF-A; **C.** Osteopontyna; **D.** IGFBP-3. Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 3 \pm$  SEM. \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ .

### 8.2.6. Wpływ inhibicji autofagii na zmianę ekspresji genów w starych komórkach nowotworowych – sekwencjonowanie następczej generacji

Wiedząc, że hipoksja przyspiesza generację komórek potomnych w wyniku zahamowania autofagii przeprowadzono pogłębione analizy NGS w celu ustalenia potencjalnych szlaków odpowiedzialnych za ten efekt. Analizy wykonano w dniu 9 eksperymentu (Fig. 35).

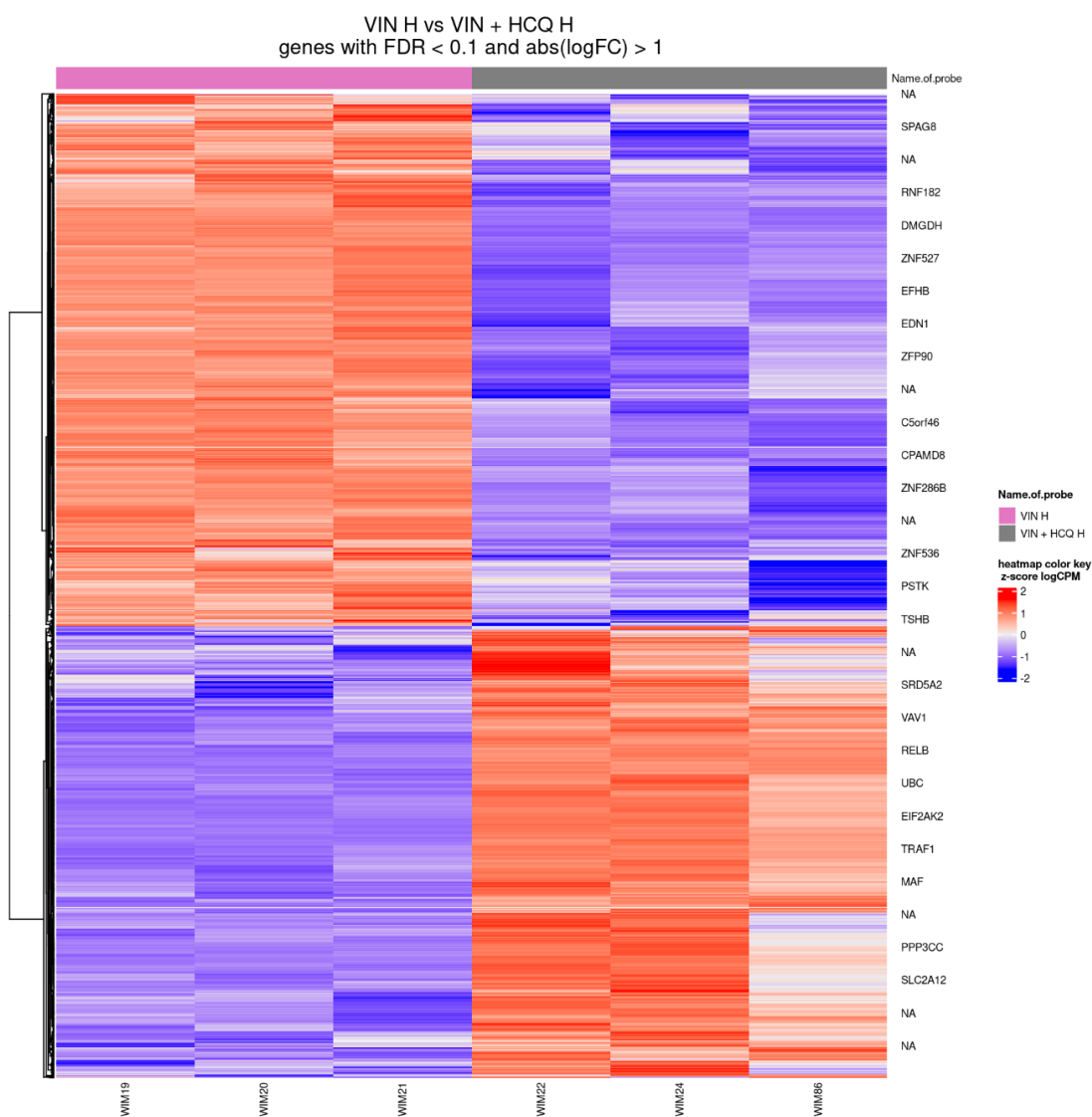
W normoksji po inkubacji z HCQ (porównanie VIN N vs VIN+HCQ N) odnotowano 3101 DEGs, 1637 o obniżonej ekspresji i 1428 o podwyższonej ekspresji (Fig. 49).



**Figura 49.** Mapa cieplna przedstawiająca wyniki ekspresji genów istotnie zmienionych w porównaniu VIN N vs VIN + HCQ N.

Kolorem czerwonym zaznaczono geny o podwyższonej ekspresji. Kolorem niebieskim oznaczono geny o niższej ekspresji. Po lewej stronie przedstawiono wyniki dla komórek nietraktowanych (VIN N). Po prawej stronie przedstawiono wyniki dla komórek leczonych VIN (VIN + HCQ N). Dane dotyczą komórek hodowanych w warunkach hipoksji.

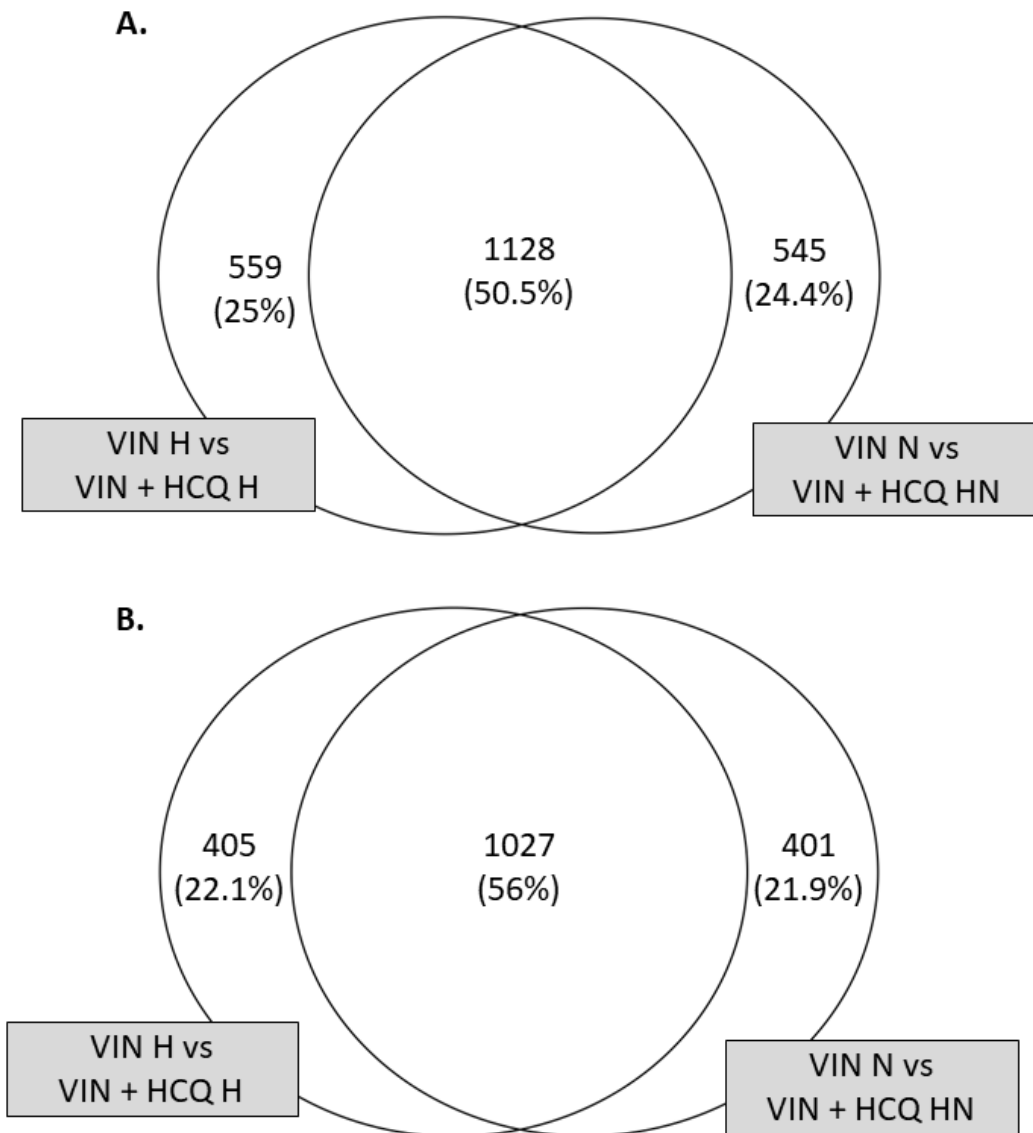
W hipoksji (VIN H vs VIN + HCQ H) odnotowano zmianę ekspresji 3119 genów, 1687 o obniżonej ekspresji i 1432 o podwyższonej ekspresji (Fig. 50).



**Figura 50. Mapa cieplna przedstawiająca wyniki ekspresji genów istotnie zmienionych w porównaniu VIN H vs VIN + HCQ H.**

Kolorem czerwonym zaznaczono geny o podwyższonej ekspresji. Kolorem niebieskim oznaczono geny o niższej ekspresji. Po lewej stronie przedstawiono wyniki dla komórek nietraktowanych (VIN H). Po prawej stronie przedstawiono wyniki dla komórek leczonych VIN (VIN + HCQ H). Dane dotyczą komórek hodowanych w warunkach hipoksji.

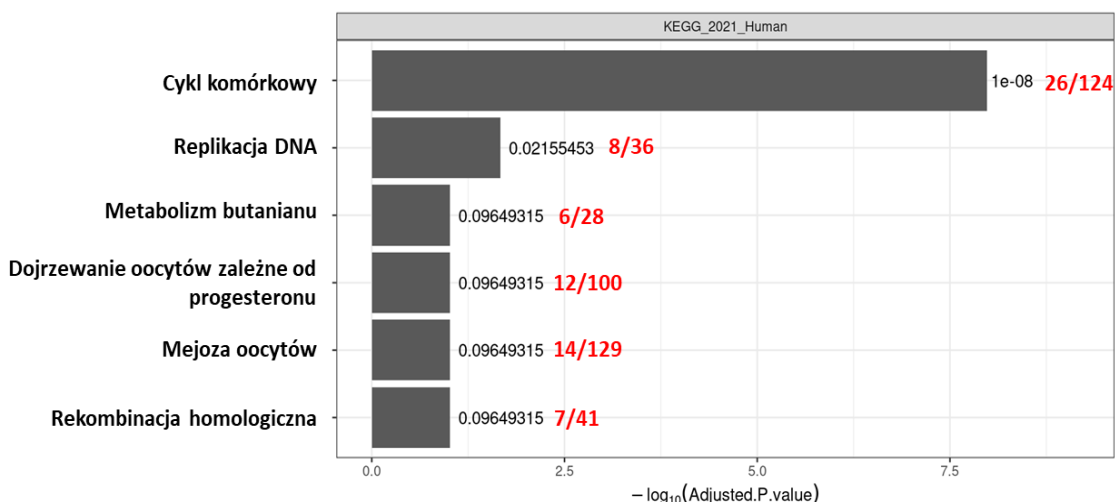
Analiza porównawcza wykazała, że zarówno w normoksji jak i hipoksji nadekspresji ulega 1128 takich samych genów (50.5%). Wśród genów o obniżonej ekspresji po inkubacji z HCQ odnotowano 559 genów charakterystycznych (25%) dla hipoksji, i 545 DEGs (24.4%) dla normoksji (Fig. 51A). Wśród genów o podwyższonej ekspresji 1027 (56%) DEGs było wspólnych dla normoksji i hipoksji, 405 DEGs (22.1%) DEGs było charakterystyczne dla hipoksji, a 401 (21.9%) dla normoksji (Fig. 51B).



**Figura 51. Diagramy Venna przedstawiający geny zmienionej ekspresji komórek starych (VIN) względem komórek starych leczonych HCQ (VIN+HCQ) w normoksji i w hipoksji. A. Diagram Venna dla genów o podwyższonej ekspresji B. Diagram Venna dla genów o obniżonej ekspresji.**

Na podstawie analizy porównawczej z bazą danych KEGG, zaobserwowano, że geny, których ekspresja zmalała po inkubacji w HCQ w normoksji i hipoksji przypisane zostały do mechanizmów związanych z proliferacją komórek. Potwierdza to wcześniejsze obserwacje wskazujące, że w komórkach starych pod wpływem zahamowania autofagii ekspresja białek regulujących cykl komórkowy spada (Fig. 52).

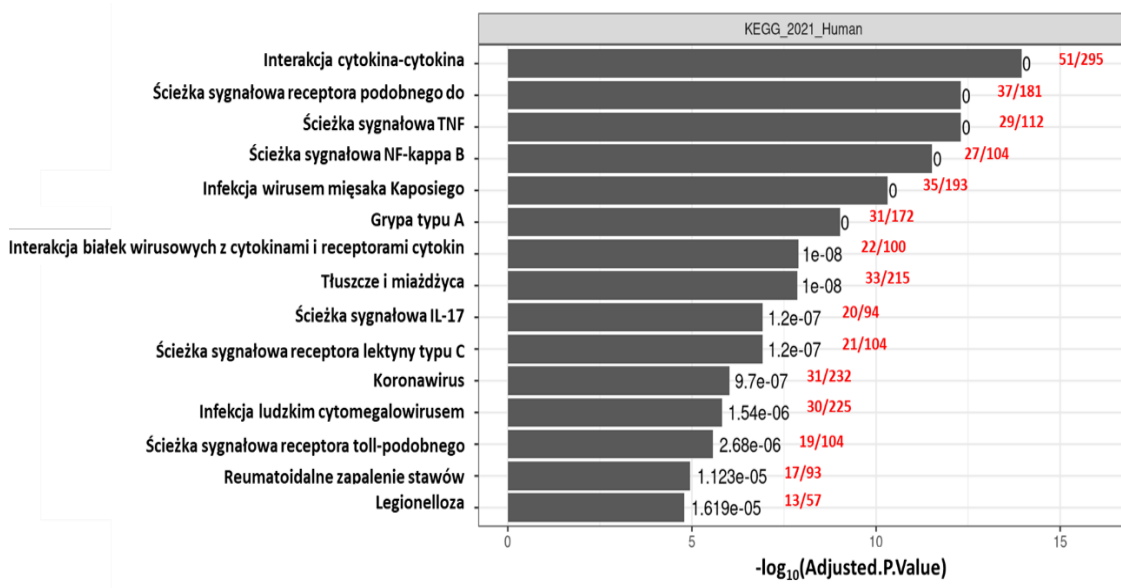




**Figura 52. Analiza szlaków najbardziej zmienionych dla genów wspólnych dla normoksji i hipoksji o obniżonej ekspresji po traktowaniu HCQ.**

Na wykresach przedstawiono wyniki analiz terminów KEGG. Po prawej stronie słupka przedstawiono wartości adjusted P-value oraz, zaznaczone kolorem czerwonym, liczbę DEGs zmienionych w badanych porównaniach w stosunku do liczby terminów przypisanych do szlaku w bazie KEGG.

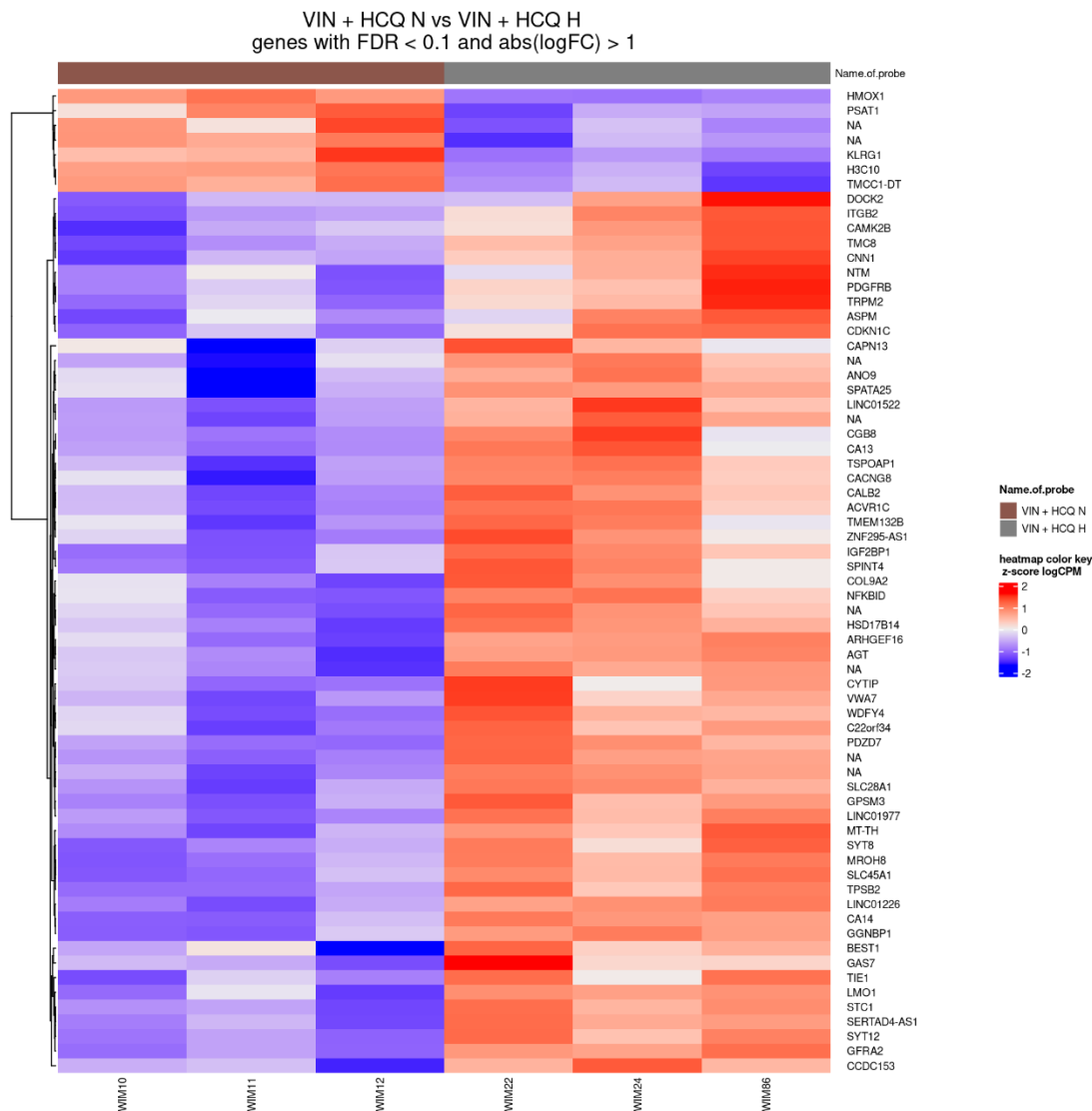
Najbardziej zmienione ścieżki, do których przypisano wspólne geny o podwyższonej ekspresji przypisano do szlaków: interakcja cytokina-cytokina, ścieżki sygnałowej receptora podobnego do NOD (ang. NOD-like receptor), ścieżki sygnałowej TNF (ang. Tumor Necrosis Factor) oraz ścieżki sygnałowej NF-kappa B. Ponadto wiele zmienionych ścieżek związana jest z regulacją odpowiedzi na zakażenia różnego typu mikroorganizmów patogennych (Fig. 53) co sugeruje aktywację odpowiedzi zapalnej.



**Figura 53. Analiza szlaków najbardziej zmienionych dla genów wspólnych dla normoksji i hipoksji o podwyższonej ekspresji po traktowaniu HCQ.**

Na wykresach przedstawiono wyniki analiz terminów KEGG. Po prawej stronie słupka przedstawiono wartości adjusted P-value oraz, zaznaczone kolorem czerwonym, liczbę DEGs zmienionych w badanych porównaniach w stosunku do liczby terminów przypisanych do szlaku w bazie KEGG.

Ponieważ zaobserwowano, że w hipoksji ucieczka od starzenia i generacja komórek potomnych następuje szybciej niż w normoksji, kolejnym krokiem była identyfikacja genów, których ekspresja różni się pomiędzy obydwojma warunkami tlenowymi. W tym celu przeprowadzono analizy porównawcze VIN + HCQ N vs VIN H + HCQ H. Wykazano, że ekspresja tylko 67 genów zmienia się w sposób istotny statystycznie pomiędzy normoksją a hipoksją. Odnotowano 7 genów o podwyższonej ekspresji oraz 60 genów o niższej ekspresji w normoksji (Fig. 54).



**Figura 54.** Mapa cieplna przedstawiająca wyniki ekspresji genów istotnie zmienionych w porównaniu VIN + HCQ N vs VIN + HCQ H.

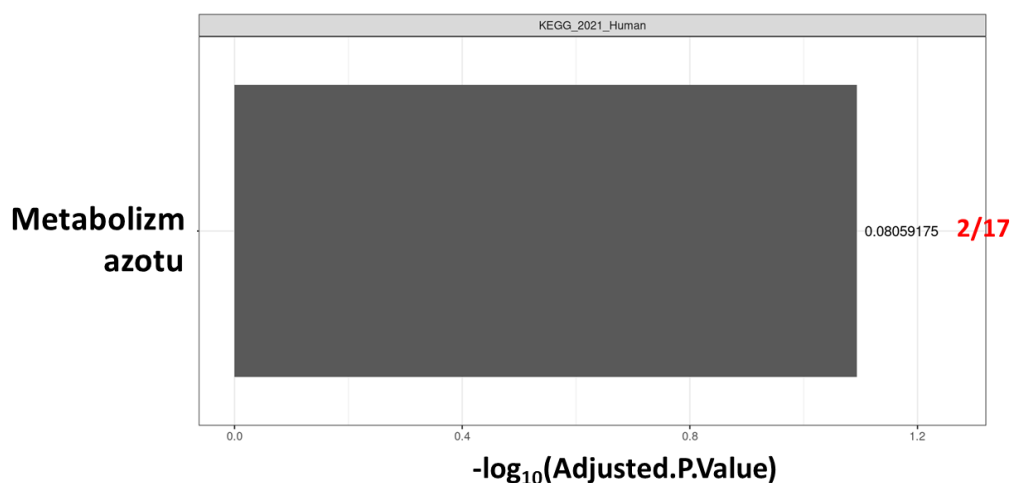
Kolorem czerwonym zaznaczono geny o podwyższonej ekspresji. Kolorem niebieskim oznaczono geny o niższej ekspresji. Po lewej stronie przedstawiono wyniki dla komórek nietraktowanych (VIN + HCQ N). Po prawej stronie przedstawiono wyniki dla komórek leczonych VIN (VIN + HCQ H). Dane dotyczą komórek hodowanych w warunkach hipoksji.

Wśród DEGs o obniżonej ekspresji nie odnotowano istotnie zmienionych szlaków, ale zidentyfikowano 4 geny kodujące białka: KLRG1, HMOX1, H3C10 oraz PSAT1 (Tab. 17).

**Tabela 17. Lista genów o niższej ekspresji po traktowaniu HCQ.**

Nazwa genu	Biotyp genu	logFC	Wartość P	FDR
	lncRNA	1.8347624	0.0002630	0.0510368
	lncRNA	1.7761848	0.0000019	0.0067208
KLRG1	Gen kodujący białko	1.259287	0.0008569	0.0799783
HMOX1	Gen kodujący białko	1.0880261	0.0000559	0.0279140
H3C10	Gen kodujący białko	1.0862431	0.0004966	0.0654943
TMCC1-DT	lncRNA	1.0542005	0.0007603	0.0781256
PSAT1	Gen kodujący białko	1.0202595	0.0002755	0.0526516

W przypadku DEGs o obniżonej ekspresji odnotowano tylko jeden istotnie zmieniony szlak, związany z metabolizmem azotu, do którego przypisano geny kodujące białka anhidraz węglanowych (ang. Carbonic Anhydrase, CA), CA13 i CA14 (Fig. 55), odgrywających kluczową rolę w obniżaniu pH w środowisku guza [227].



**Figura 55. Analiza szlaków najbardziej zmienionych dla genów o podwyższonej ekspresji w porównaniu po traktowaniu HCQ.**

Na wykresach przedstawiono wyniki analiz terminów KEGG. Po prawej stronie słupka przedstawiono wartości adjusted P-value oraz zaznaczone kolorem czerwonym liczbę DEGs zmienionych w badanych porównaniach w stosunku do liczby terminów przypisanych do szlaków w bazie KEGG.

Podsumowując, zahamowanie autofagii w komórkach traktowanych VIN hodowanych w normoksji lub hipoksji niewielka grupa genów różni się ekspresją. Wśród nich znajdują się geny związane zarówno z regulacją metabolizmu, takie jak PSAT-1, jak i reorganizacją chromosomalną czy cytokinezą. Jednoznaczne stwierdzenie, czy mogą one pełnić rolę w procesie ucieczki od starzenia wymaga dalszych analiz.

### 8.2.6.1. Weryfikacja wyników NGS

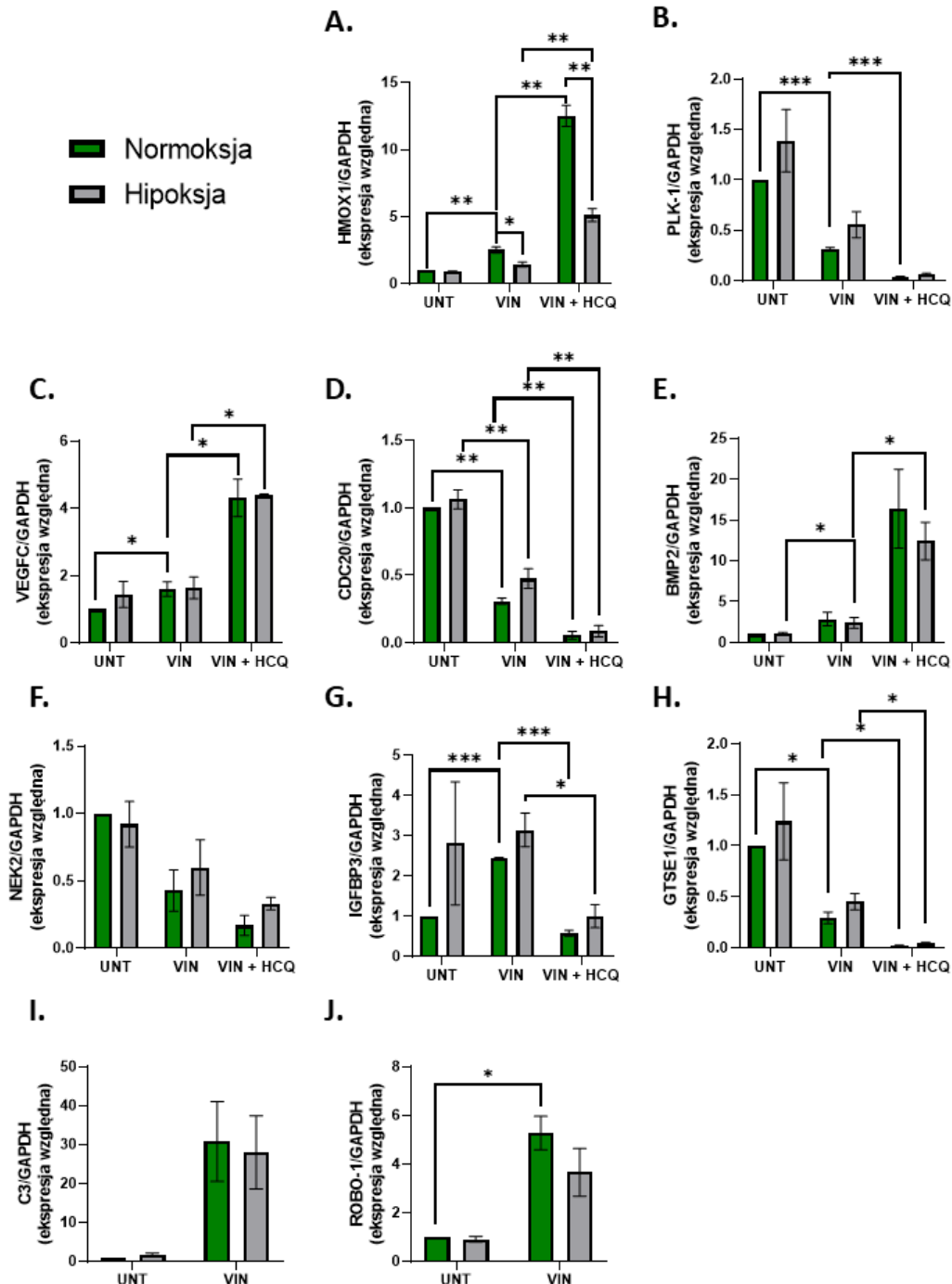
W celu weryfikacji wyników analizy NGS dla wybranych genów przeprowadzono analizę ekspresji metodą RT-PCR. Do analiz wybrano geny, których ekspresja była istotnie zmieniona i które zostały zidentyfikowane istotnie zmienionych szlakach wybranych na podstawie porównania z bazą KEGG.

Do analiz wybrano następujące geny: HO-1, PLK-1, VEGFC, CDC20, BMP2, NEK2, IGFBP-3, GTSE1, C3 i ROBO1 (Tab.18).

**Tabela 18. Lista genów wybrana do weryfikacji NGS wraz wartościami logFC dla analizowanych porównań.**

Porównanie	UNT N vs VIN N	UNT H vs VIN H	VIN N vs VIN H	VIN N vs VIN + HCQ N	VIN H vs VIN + HCQ H	VIN + HCQ N vs VIN + HCQ H
<b>GEN</b>	<b>logFC</b>					
<b>HMOX1</b>	-	-	1.2180525	-1.8417840	-1.9718104	1.0880261
<b>PLK1</b>	2.3507553	1.7983372	-	2.6166054	2.6170064	-
<b>VEGFC</b>	-	-	-	-1.7163169	-1.8014721	-
<b>CDC20</b>	2.4358042	1.7456581	-	3.7111716	3.5057908	-
<b>BMP2</b>	-	-	-	-2.9143188	-2.5699410	-
<b>NEK2</b>	2.4009681	1.4989703	-	5.4474088	4.2922403	-
<b>IGFBP3</b>	-	-	-	2.0916807	1.2793047	-
<b>GTSE1</b>	2.2347258	1.5722936	-	4.1924723	3.6822209	-
<b>C3</b>	-3.6974079	-3.9013487	-	-	-	-
<b>ROBO1</b>	-1.0666916	-1.6564867	-	-	-	-

Analiza ekspresji genów metodą RT-PCR potwierdziła wyniki otrzymane dla genów HMOX1, PLK1, VEGFC, CDC20, BMP2, iGFBP3, GTSE1 oraz ROBO1 (Fig. 56A-C, G, H, J). Dla genów NEK2 i C3 zaobserwowano tendencje wzrostowe wskazujące na taki sam kierunek zmian jak w analizach NGS (Fig. 56 F,I).



**Figura 56. Analiza ekspresji genów wybranych do weryfikacji NGS**

Analiza ekspresji genów **A.** HMOX1, **B.** PLK-1, **C.** VEGFC, **D.** CDC20, **E.** BMP2, **F.** NEK2, **G.** IGFBP3, **H.** GTSE1, **I.** C3 i **J.** ROBO-1. Wartości przedstawiono jako wartość względną w prównaniu do ekspresji genu referencyjnego GAPDH. Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n=3 \pm \text{SEM}$ . \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ .

### **8.3. Wpływ inhibicji autofagii na proces starzenia indukowanego chemioterapią *in vivo***

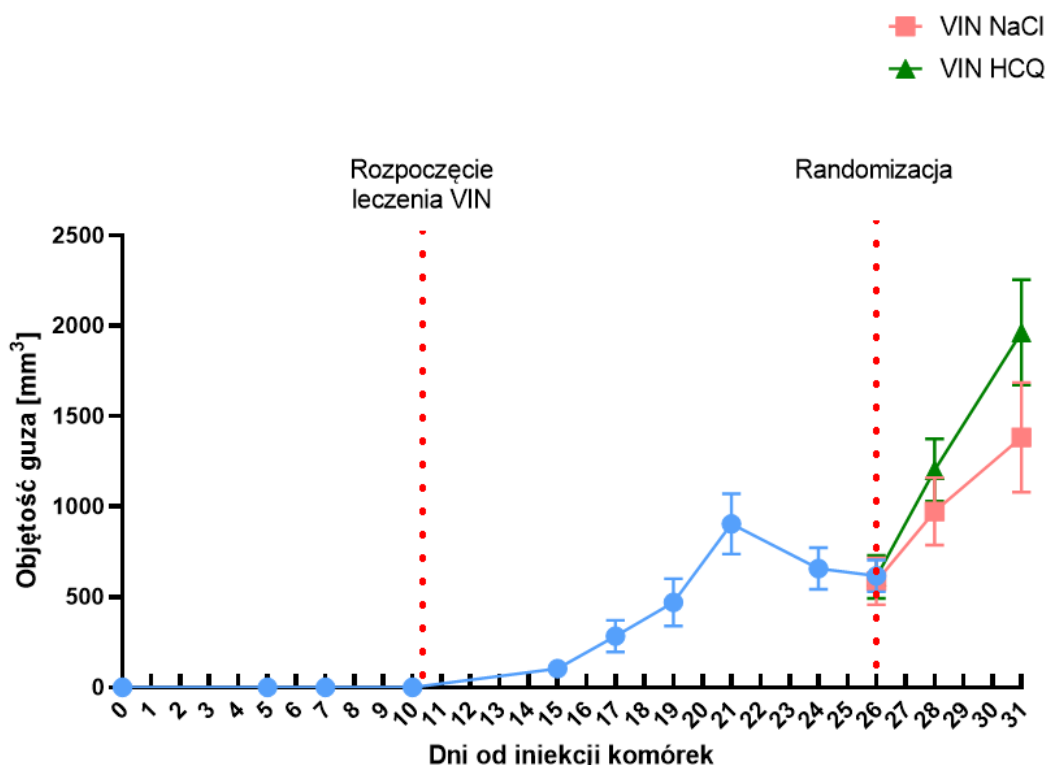
Eksperymenty przeprowadzone *in vitro* wykazały, że stosując chemioterapię można zaindukować proces starzenia zarówno w ludzkich jak i w mysich komórkach raka nerki, a pulsacyjne zahamowanie autofagii promuje ucieczkę od starzenia, gdzie w hipoksji efekt był przyspieszony. W celu weryfikacji tych obserwacji przeprowadzono analizy *in vivo* z wykorzystaniem syngenicznego modelu mysiego. Do eksperymentu wykorzystano myszy szczepu Balb/c, samce w wieku 8-tygodni. Do eksperymentu wykorzystano 52 osobniki.

#### **8.3.1. Opracowanie modelu starzenia komórkowego indukowanego chemioterapią *in vivo***

Głównym założeniem tych eksperymentów było opracowanie modelu eksperymentalnego najbliższego warunkom klinicznym, który umożliwiłby prowadzenie badań nad starzeniem komórkowym indukowanym chemioterapią *in vivo*.

Guzy u myszy indukowano z użyciem komórek mysiego raka nerki - RenCa. Komórki wstrzyknięto myszom podskórną, w okolicę górną grzbietową w ilości 100 000. Pierwsze mierzalne guzy zaobserwowano 15 dni od rozpoczęcia eksperymentu. Wzrost guza zaobserwowano u wszystkich myszy z wyjątkiem jednej.

Leczenie rozpoczęto po tym jak u większości myszy guzy były wyczuwalne palpacyjnie. Zwierzęta poddano dwuetapowemu leczeniu. W pierwszym tygodniu pierwszego etapu leczenia wszystkie myszy otrzymały leczenie VIN w dawce 0.5 mg/kg. Lek podawany był myszom codziennie przez 5 dni, po których nastąpiła 3-dniowa przerwa w leczeniu. W drugim tygodniu, dawka VIN została zmniejszona do 0.38 mg/kg. Schemat leczenia pozostał taki sam jak w tygodniu pierwszym. Okres leczenia w pierwszym etapie trwał w sumie 16 dni. W tym czasie od dnia 10 do dnia 21 zaobserwowano stabilny przyrost objętości guza. Od dnia 21 do dnia 26 objętości guza nie zmieniały się, co sugerowało zahamowanie jego wzrostu na skutek działania chemioterapii i wynikającej z tego indukcji starzenia (Fig. 57).



**Figura 57. HCQ nie wpływa na tempo wzrostu guza.**

Obserwacje dotyczące objętości guza rozpoczęto od dnia nastrzyknięcia myszy (dzień 0). Obserwacje kontynuowano do dnia 31. Do dnia 24 przedstawiono średnią dla objętości guzów wszystkich osobników biorących udział w eksperymencie. W dniu 26 myszy zrandomizowano do dwóch grup. W dniach 26-31 przedstawiono wyniki pomiarów objętości guzów dla dwóch grup VIN NaCl i VIN HCQ. W dniu 31 zakończono podawanie leków. Każdy punkt przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 5 \pm \text{SEM}$ .

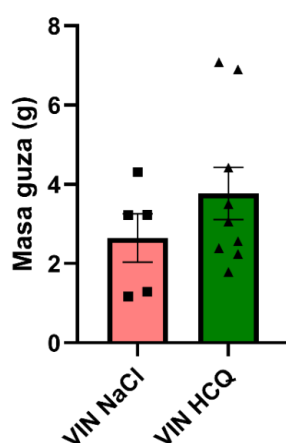
W związku z widocznym zahamowaniem przyrostu objętości guzów w dniu 26 zwierzęta zrandomizowano do dwóch grup VIN NaCl i VIN HCQ w celu zbadania wpływu zahamowania autofagii na starzenie *in vivo* (Fig. 57).

Do grupy VIN NaCl zrandomizowano 12 osobników. Badania pilotażowe wykazały, że zaprzestanie leczenia VIN spowodowało gwałtowny rozrost guza. W celu uniknięcia tego zjawiska we właściwym eksperymencie, leczenie VIN prowadzono przez cały czas trwania eksperymentu, przy czym dawkę zmniejszono do 0.3 mg/kg. W założeniu dawka ta miała spowolnić proliferację i rozrost guza. Grupa VIN NaCl stanowiła grupę kontrolną.

Do drugiej grupy, VIN HCQ, zrandomizowano 15 osobników. Dla myszy, oprócz wspomnianego wcześniej leczenia VIN w dawce 0.3 mg/kg, podano także inhibitor autofagii, HCQ, w dawce 30 mg/kg. Celem tej grupy było zbadanie, czy zahamowanie autofagii może wpływać ucieczkę komórek nowotworowych od starzenia i/lub na tempo wzrostu guza.

Leczenie w drugim etapie trwało do dnia 31. Guzy zwiększyły swoją wielkość blisko dwukrotnie w stosunku do dnia randomizacji (Fig. 57). Po zakończeniu obserwacji, w dniu 35 myszy z grup VIN NaCl i VIN HCQ uśmiercono.

Zaobserwowano, że w grupie VIN HCQ średnia objętość guza była nieznacznie większa niż w grupie VIN NaCl, jednak zmiany te nie były istotne statystycznie (Fig. 56). Nie zaobserwowano także istotnych statystycznie różnic w średniej masie guzów w momencie uśmiercenia zwierząt (Fig. 57). Wyniki te sugerują, że zahamowanie autofagii *in vivo* nie wpływa na tempo wzrostu guza.



**Figura 58. Zastosowanie HCQ nie wpłynęło na średnią masę guza.**

Analizie poddano guzy pobrane od zwierząt zrandomizowanych do grup VIN NaCl i VIN HCQ. Guzy zostały wyizolowane i zważone po planowanej nekropsji. Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 5 \pm \text{SEM}$ .

### **8.3.1.1. Kontrola wzrostu guza wiąże się z zastosowaniem wysoce toksycznych dawek chemioterapii**

Wśród badanych zwierząt wystąpiła ogólna wysoka śmiertelność. Stan zdrowia i dobrostan zwierząt oceniane były przez czas trwania całego badania. U części zwierząt obserwowaliśmy wzdęcia i problemy z wypróżnianiem, ale nie towarzyszyły temu inne efekty niepożądane, które sygnalizowałyby pogorszenie dobrostanu zwierząt. W trakcie eksperymentu nie zaobserwowaliśmy spadku wagi zwierząt, zwierzęta dbały o siebie i były aktywne. Nie zaobserwowano u nich zmrużenia oczu, cofnięcia wibrysów, utrudnienia w oddychaniu oraz piloerekcji. Tylko u pojedynczych osobników zaobserwowano biegunki, zmiany te jednak były przejściowe. Mimo tego, z grupy 52 zwierząt poddanych leczeniu, 17 zwierząt padło przedwcześnie, przed randomizacją i rozpoczęciem drugiej tury leczenia. Tylko 8 zwierząt wyłączono z eksperymentu przed randomizacją. U zwierząt tych zaobserwowaliśmy gwałtowny rozrost guzów, których objętość była bliska lub przekroczyła wartość krytyczną  $1.5 \text{ cm}^3$ . Przekroczenie tej



wartości było kluczowym kryterium, którego spełnienie klasyfikowało zwierzę do humanitarnej eutanazji.

Po randomizacji padło kolejnych 13 myszy z czego 7 zwierząt zostało wcześniej zrandomizowanych do grupy VIN NaCl, a 6 do grupy VIN HCQ. Wysoka śmiertelność i nagromadzenie efektów ubocznych terapii było związane najprawdopodobniej z intensyfikacją leczenia.

W eksperymentach pilotażowych wykorzystano dawkę VIN 1.5 mg/kg, gdzie lek podawany był raz w tygodniu. Schemat leczenia i dawki leków zaczerpnięte zostały z danych literaturowych [228, 229]. U zwierząt nie zaobserwowano efektów ubocznych, jednak leczenie to okazało się na tyle skuteczne by zahamować rozrost guza. Dlatego w eksperymencie właściwym sumaryczną tygodniową dawkę zwiększono do 2.5 mg/kg, ale lek podawany był częściej i w niższych dawkach [230]. Przy intensyfikacji terapii udało się spowolnić rozrost guzów. Wiązało się to jednak z wystąpieniem wielu objawów niepożądanych u myszy, które zaobserwowano dopiero pośmiertnie, po przeprowadzeniu sekcji (Tab.19).

W czasie sekcji zwierząt, które padły przedwcześnie (grupa zgony) zaobserwowano zmiany i nieprawidłowości w anatomii wielu organów (Tab. 19). U największej ilości zwierząt zaobserwowano przekrwienie płuc bez widocznych objawów krwawienia (22 zwierzęta), zaburzenie perystaltyki jelit (13 zwierząt) oraz atrofie lub zniekształcenia śledziony (19 zwierząt). Przekrwienia zaobserwowano także w takich organach jak mózg (10 zwierząt), jelita (7 zwierząt), nerki (6 zwierząt), wątroba (5 zwierząt), trzustka (3 zwierzęta) oraz żołądek (1 zwierzę). Krwawienia do czaszki wystąpiły u 4 myszy. U zwierząt, które zakończyły eksperyment planowo zaobserwowano mniej nieprawidłowości. Najczęstsze były przekrwienia płuc, z czego więcej przypadków odnotowano w grupie VIN HCQ.

Najwięcej nieprawidłowości zaobserwowano w układzie pokarmowym, w szczególności w jelitach. Zmiany w jelitach nie dotyczyły tylko zaburzenia ich perystaltyki, którą scharakteryzowano na podstawie nagromadzenia masy kałowej w dolnym odcinku jelita. Często była także obecność gazów oraz niestrawionego pokarmu w jelitach. W przypadku 9 zwierząt treść ich jelit była krwawa, co może wskazywać na aktywne krwawienie do narządu. Zaburzenia w układzie pokarmowym dotyczyły też morfologii żołądka. Poza przekrwieniem u kilku zwierząt zaobserwowano krwawienie w żołądku lub jego atrofię. Zmiany te odnotowano także u myszy które

zakończyły eksperyment planowo, jednak nie odnotowano różnic pomiędzy grupami VIN NaCl i VIN HCQ.

Nagromadzenie nieprawidłowości w obrębie układu pokarmowego wskazuje na to, że zastosowana terapia miała duży wpływ na trawienie oraz przyswajanie składników odżywczych z pokarmu. Problemy z przyswajaniem pokarmu oraz liczne przekrwienia, które wystąpiły na skutek stosowanej terapii mogą tłumaczyć wysoką śmiertelność zaobserwowaną w czasie trwania eksperymentu. Ponadto analizy pośmiertne myszy z grup VIN HCQ i VIN NaCl wskazują, że zastosowanie HCQ nie wpłynęło w sposób znaczący na toksyczność terapii.

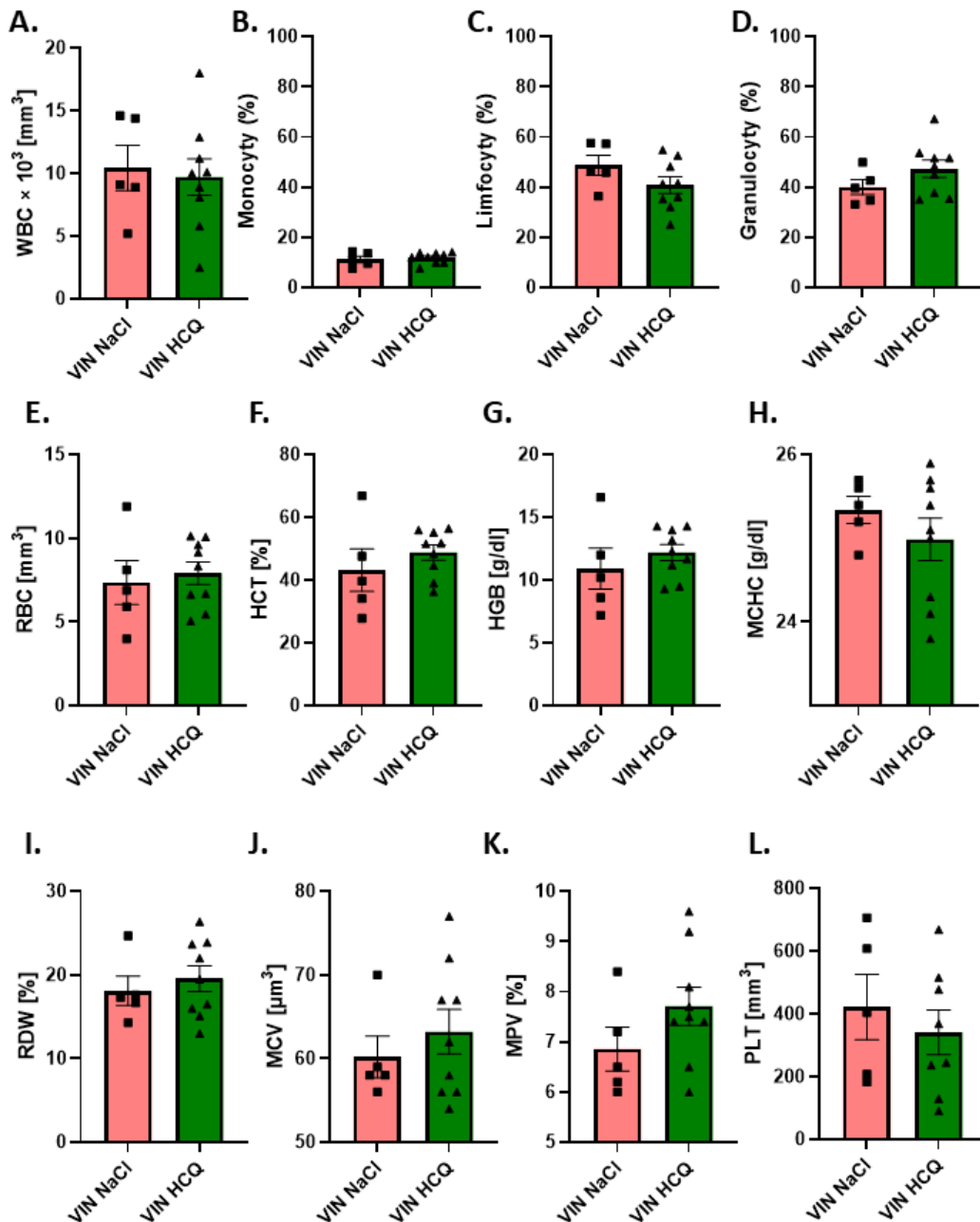
**Tabela 19. Podsumowanie wystąpienia nieprawidłowości w anatomii organów zwierząt biorących udział w eksperymencie ocenionych pośmiertnie.**

Objawy	Zgony	VIN NaCl	VIN HCQ
Krwawienie do czaszki	4	-	-
Przekrwienie mózgu	10	-	-
Krwawienie do płuc	2	-	-
Przekrwienie płuc	22	3	7
Krwawienie do żołądka	3	1	-
Przekrwienie żołądka	1	1	-
Atrofia żołądka	1	-	1
Zaburzenie perystaltyki jelit	13	4	4
Niestrawiony pokarm w jelitach	9	-	-
Przekrwienie jelit	7	1	-
Krwawa treść w jelicie	8	-	1
Powietrze w jelitach	8	1	1
Krucha ściana jelita	1	-	-
Atrofia lub odkształcenie śledziony	19	-	1
Przekrwienie nerek	6	-	1
Przekrwienie wątroby	5	1	-
Inne nieprawidłowości wątroby	7	-	-
Przekrwienie trzustki	3	-	0
Inne nieprawidłowości serca	1	-	-

Brak różnic w toksyczności pomiędzy grupami VIN NaCl i VIN HCQ potwierdziły analizy parametrów krwi: krwinek białych (Fig. 59A-D), krwinek czerwonych (Fig. 59E-J) oraz płytek krwi (Fig. 59K,L). Wyniki badanych parametrów nie odbiegały od norm dostępnych w literaturze [231, 232]. Nie zaobserwowano też istotnych różnic w masie organów: mózgu, wątroby, płuc, nerek, serca i śledziony, pomiędzy grupami VIN NaCl i VIN HCQ (Fig. 60). Analiza przeżywalności w grupach

VIN NaCl i VIN HCQ nie wykazała żadnych istotnych różnic statystycznych, co wskazuje na to, że HCQ nie wpłynęło na śmiertelność wśród myszy (Fig. 61).

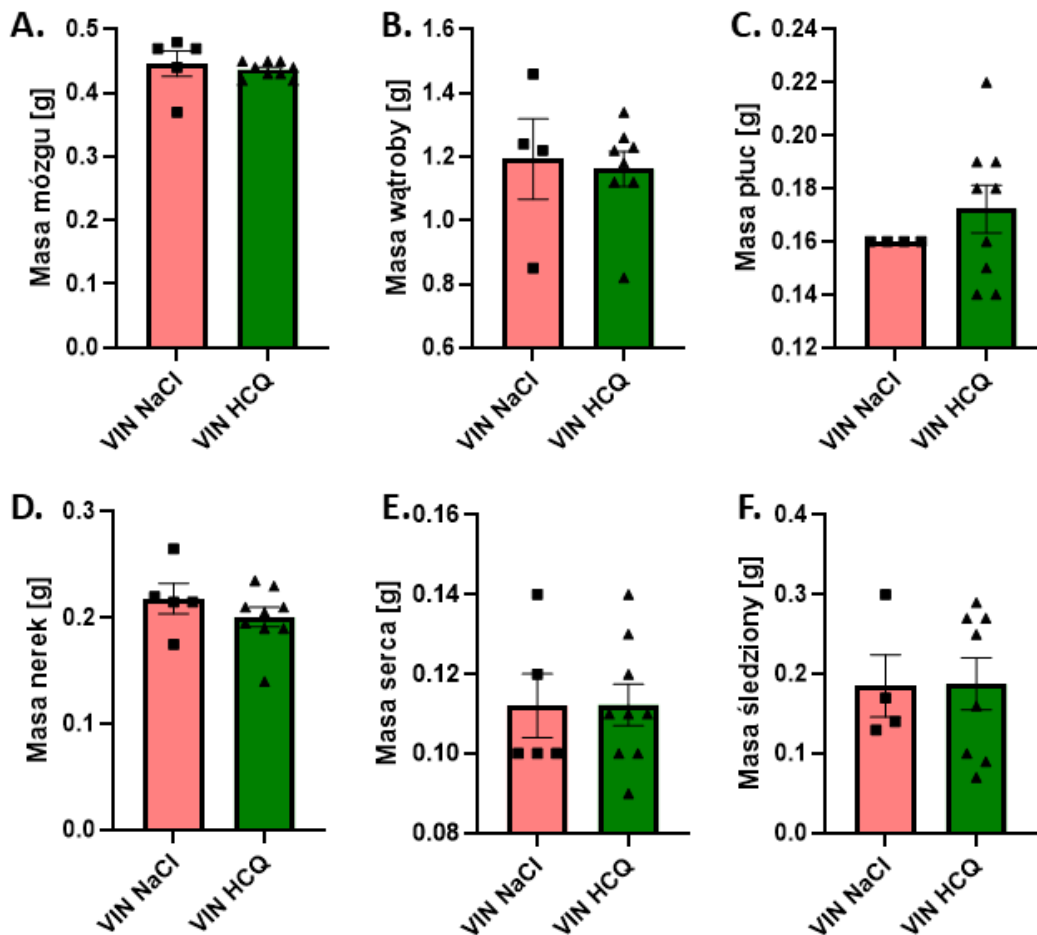
Podsumowując, w czasie trwania eksperymentu nie odnotowano zmian świadczących o gwałtownym pogorszeniu się stanu zdrowia zwierząt. Większość objawów niepożądanych odnotowano dopiero po śmierci zwierząt. Eksperymenty wykazały, że leczenie HCQ nie wpływa na toksyczność terapii w czasie jej trwania.



**Figura 59. HCQ nie wpływa na parametry krwi.**

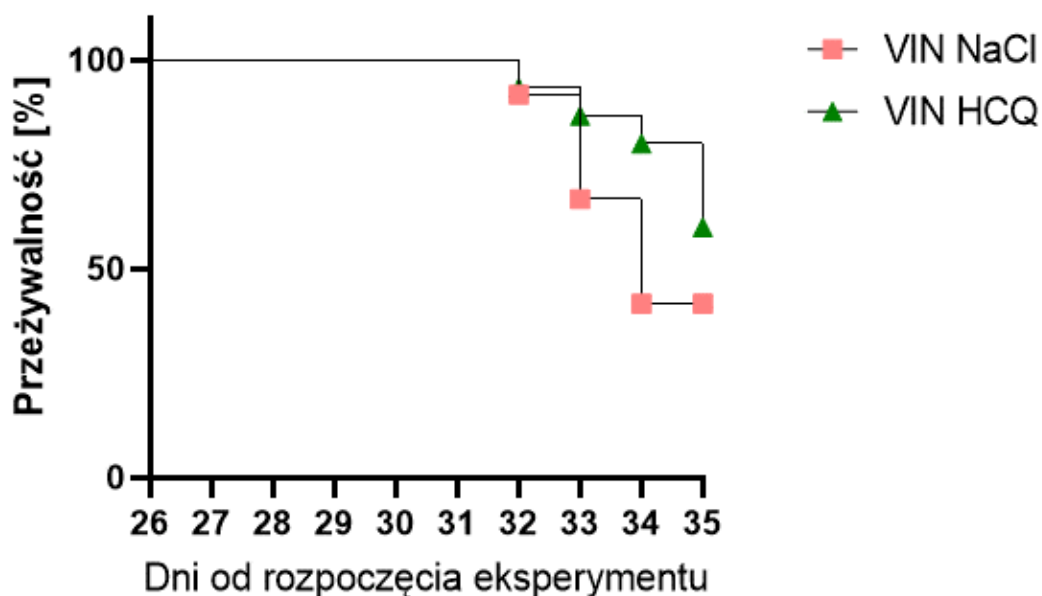
Analiza populacji parametrów krwi została wykonana przy użyciu urządzenia ABC VET. Wykresy przedstawiają odpowiednio: **A.** ilość wszystkich białych krwinek (WBC), **B.** udział procentowy monocytołów, **C.** udział procentowy limfocytołów oraz **D.** udział procentowy

granulocytów; **E.** całkowitą objętość krwinek czerwonych (RBC), **F.** hematokryt (HCT), **G.** hemoglobinę całkowitą (HGB), **H.** stężenie hemoglobiny w krwince (MCHC), **i.** rozkład objętości erytrocytów (RDW) oraz **J.** średnią objętość krwinek czerwonych (MCV). **K.** średnią wielkość płytek krwi (MPV) oraz **L.** poziom płytek krwi (PLT). Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 5 \pm \text{SEM}$ .



**Figura 60.** HCQ nie wpływa na masę organów myszy.

Na wykresach przedstawiono odpowiednio masy: **A.** mózgu, **B.** wątroby, **C.** płuc, **D.** nerek, **E.** serca i **F.** śledziony. Organy zostały zważone po przeprowadzeniu planowej nekropsji. Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 5 \pm \text{SEM}$ .

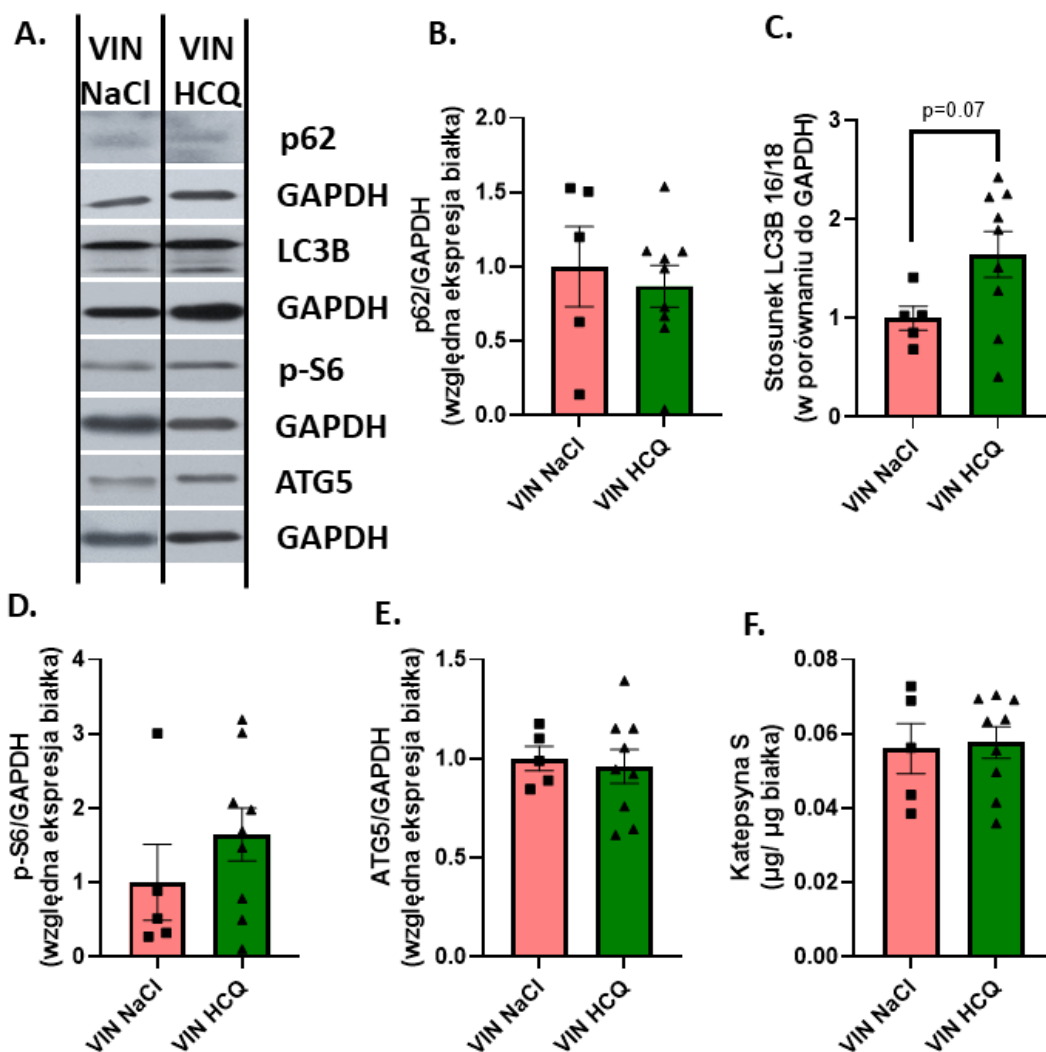


**Figura 61. Zastosowanie HCQ nie wpływa na przeżywalność zwierząt.**

Krzywa przeżywalności Kaplana-Meiera. W analizie przeżywalności porównano grupy zwierząt VIN NaCl oraz VIN HCQ od dnia randomizacji (26) do dnia 35, w którym przeprowadzono ostatnie nekropsje. Wykres nie uwzględnia zwierząt, które zakończyły eksperyment planowo.

### 8.3.1.2. HCQ aktywuje autofagię *in vivo*

Analizy *in vitro* wykazały, że w komórkach poddanych indukcji starzenia dochodzi do aktywacji autofagii, a samo zahamowanie autofagii przy użyciu HCQ prowadziło do blokady przepływu autofagicznego. W celu zbadania czy działanie HCQ wpłynęło na aktywność autofagii w guzach wykonano analizy ekspresji białek związanych z tym procesem: p62, LC3B, ATG5 oraz p-S6. HCQ nie wpłynęło na ekspresję p62 (Fig. 62A,B), ale wpłynęło zwiększenie stosunku izoform 16 kDa do 18 kDa białka LC3B (Fig. 62A,C). Sugeruje to, że w grupie VIN HCQ doszło do aktywacji autofagii.



**Figura 62. Farmakologiczna inhibicja autofagii wpływa na aktywację autofagii ale nie na aktywność lizosomalną.**

Analizę ekspresji białek p62, LC3B, p-S6, ATG5 wykonano metodą Western Blot. Jako białko referencyjne wykorzystano GAPDH **A.** Reprezentacyjne wyniki analizy Western Blot przedstawiające ekspresję białek p62, LC3B, p-S6, ATG5. GAPDH użyto jako białka referencyjnego. **B.** Względna ekspresja białka p62; **C.** Stosunek względnych wartości dwóch form białka LC3B (16/18). **D.** Względna ekspresja białka ATG5. **E.** Względna ekspresja białka p-S6; **F.** Sekrecja katepsyny S zmierzona metodą ELISA. Wartości względnych ekspresji badanych białek wyrażają stosunek wartości, uzyskanych poprzez analizę densytometryczną, białek badanych do białka referencyjnego, GAPDH. Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 5 \pm \text{SEM}$ . \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ .

W celu zbadania czy aktywacja autofagii mogłaby być wynikiem zmian na wczesnych etapach tego procesu, wykonano analizę ekspresji białka ATG5, zaangażowanego w proces tworzenia autofagosomu. Nie zaobserwowano żadnych różnic ekspresji ATG5 pomiędzy grupami co sugeruje, że zmiany w aktywności

autofagii są wynikiem zmian występujących na późniejszych etapach tego procesu, co potwierdza działanie HCQ (Fig. 62A,E).

W celu sprawdzenia czy, tak jak w przypadku eksperymentów *in vitro*, aktywacja autofagii koreluje z zahamowaniem działania mTOR, wykonano analizę ekspresji p-S6. Analizy *in vivo* wykazały, że w grupie VIN HCQ poziom ekspresji tego białka nie zmienia się (Fig. 62A,D), co wskazuje na brak zmian w aktywacji mTOR.

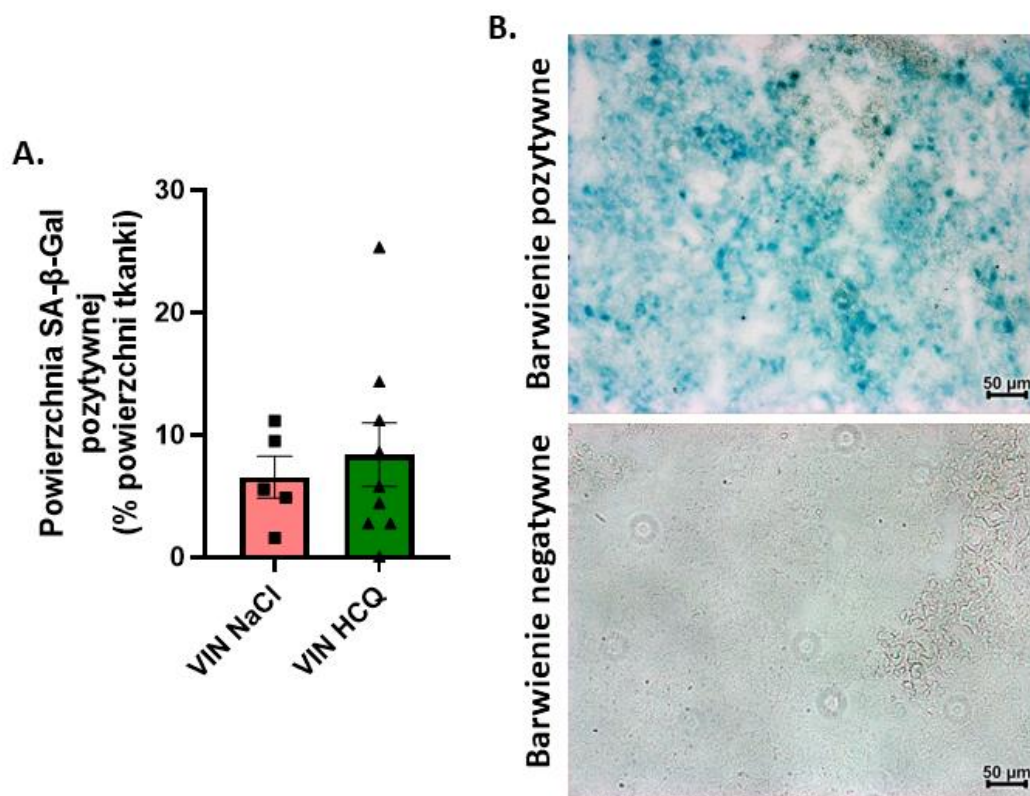
Analizy *in vitro* wykazały, że farmakologiczne zahamowanie autofagii nie tylko prowadzi do blokady przepływu autofagicznego, ale wzmaga też aktywność lizosomalną co przejawiało się podwyższonym poziomem sekrecji katepsyny S. *in vivo* nie zaobserwowano zmian w poziomie produkcji katepsyny S co sugeruje, że modulacja autofagii nie zwiększa aktywności lizosomalnej komórek w guzie (Fig. 62F).

Podsumowując, HCQ wpłynęło tylko na zwiększenie stosunku LC3-II/I, świadczy to o zwiększonej formacji autofagosomów. Pozostałe badane markery nie zmieniły się, co wskazuje, że regulacja autofagii nie została zaburzona.

### **8.3.2. Starzenie jest indukowane *in vivo***

Głównym celem eksperymentów na zwierzętach było zbadanie czy zastosowanie chemioterapii *in vivo* może powodować starzenie komórkowe.

W celu zbadania czy w guzach obecne były komórki TIS wykonano barwienia histochemiczne skrawków guzów na aktywność SA- $\beta$ -Gal. W celu potwierdzenia czy barwienie było specyficzne wykonano barwienia pozytywne i negatywne, gdzie w barwieniu negatywnym do mieszaniny reakcyjnej nie dodano X-Gal. Wyniki analizy przedstawione na figurze 63 wykazały, że w obu grupach, w większości zbadanych guzów, obecne były fragmenty tkanki SA- $\beta$ -Gal pozytywnej, co wskazuje na indukcję starzenia. Między badanymi grupami nie odnotowano jednak istotnych różnic w powierzchni SA- $\beta$ -Gal pozytywnej, co wskazuje, że HCQ nie wpływa na starzenie komórek *in vivo*.

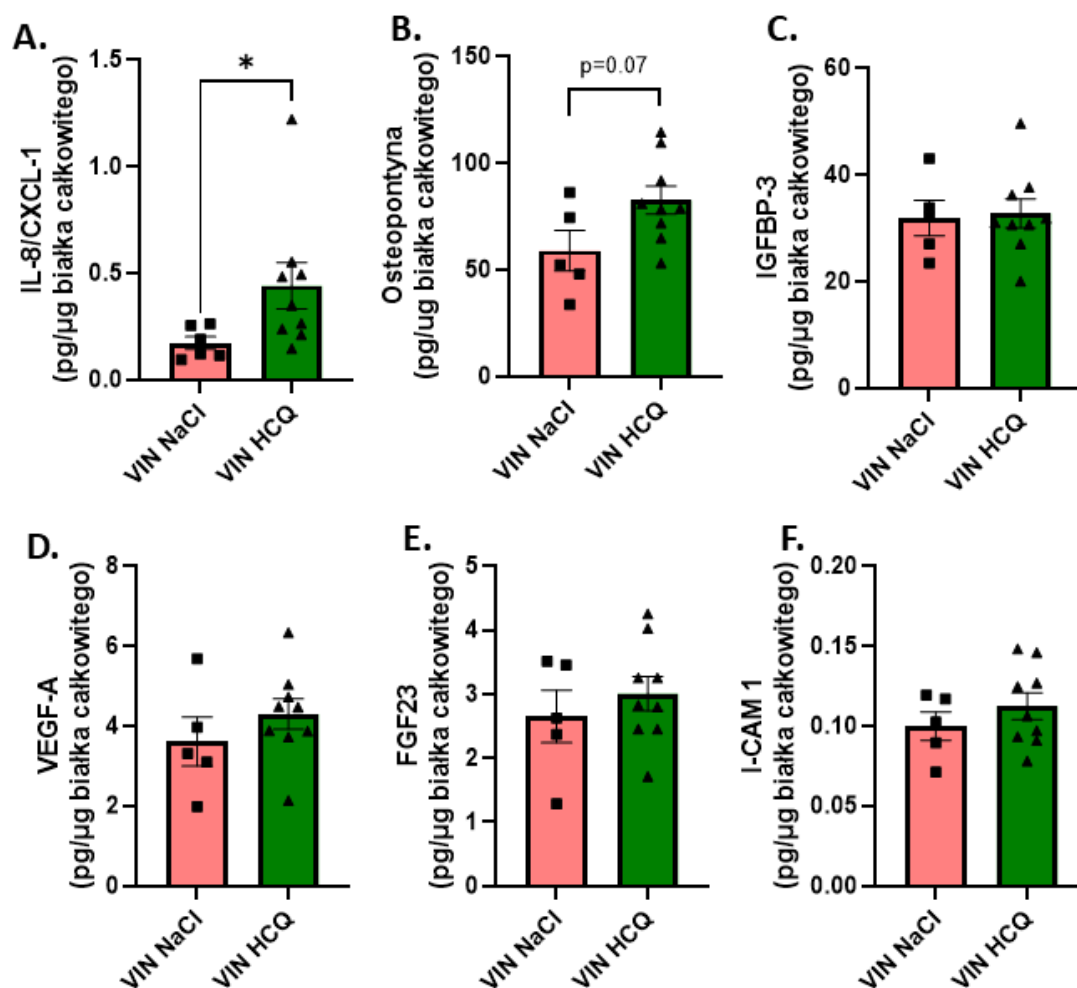


**Figura 63. HCQ nie wpływa na wielkość powierzchni tkanki SA-β-Gal pozytywnej w guzach *in vivo*.**

Analiza aktywności SA-β-Gal została wykonana na preparatach histologicznych przygotowanych z tkanki guza. **A.** Analiza liczbowa powierzchni tkanki SA-β-Gal pozytywnej wyrażona jako procent powierzchni preparatu. Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 5 \pm \text{SEM}$ . **B.** Zdjęcia reprezentatywne przedstawiające barwienie pozytywne oraz barwienie negatywne tego samego preparatu. Preparaty zostały wybarwione metodą histochemiczną w obecności lub bez substratu SA-β-Galu. Zdjęcia wykonano w świetle przechodzącym. Skala 50 μm.

*In vitro* zaobserwowano, że indukcja starzenia komórkowego oraz zahamowanie autofagii w znaczący sposób wpływają na zmiany w SASP. W celu potwierdzenia, czy zastosowana terapia mogła wpłynąć na ekspresję cytokin w analizie poddano wcześniej testowane *in vitro* cytokiny: IL-8, VEGF-A, osteopontynę i IGFBP-3. Ponadto, przeprowadzono analizę produkcji FGF23 oraz ICAM-1. Analizy wykazały, że jedynymi cytokinami, których sekrecja różniła się między grupami są IL-8 oraz osteopontyna. W obu przypadkach ich sekrecja wzrosła po leczeniu HCQ (Fig. 64 A,B).





**Figura 64. Sekrecja IL-8 i osteopontyny wzrasta po leczeniu HCQ.**

Wyniki analizy produkcji wybranych czynników SASP w lizatach białkowych guzów wykonana metodą ELISA: **A.** IL-8; **B.** Osteopontyna; **C.** IGFBP-3; **D.** VEGF-A; **E.** FGF23; **F.** I-CAM 1. Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 5 \pm$  SEM. \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ .

Podsumowując, w guzach potwierdzono indukcję starzenia *in vivo*. HCQ nie wpływa na powierzchnię tkanek SA- $\beta$ -Gal pozytywnych, ale promuje produkcję czynników SASP, IL-8 i osteopontyny. Ponieważ podwyższoną sekrecję tych cytokin zaobserwowano w komórkach raka nerki uciekających od starzenia i generujących komórki potomne *in vitro*, można przypuszczać, że HCQ promuje ucieczkę od starzenia *in vivo*.

### 8.3.3. HCQ nie wpływa na proliferację, ale promuje wyjście z blokady cyklu komórkowego oraz tendencję do aktywacji śmierci komórkowej w guzach

Ponieważ starzenie komórkowe jest ściśle związane z regulacją cyklu komórkowego, w dalszych eksperymentach wykonano analizy ekspresji cyklin związanych z jego regulacją: p-cdc2 oraz cykliny B, oraz analizę ilościową komórek aktywnie proliferujących. Pomiedzy grupą VIN NaCl i VIN HCQ nie zaobserwowano żadnych istotnych różnic w ekspresji obu białek (Fig. 65A-C).

W celu przeprowadzenia analizy ilościowej komórek aktywnie proliferujących na skrawkach guzów wykonano barwienie immunofluorescencyjne na obecność Ki67. Ki67 jest obecne we wszystkich komórkach będących w fazach czynnych cyklu komórkowego (G1, S, G2 oraz M). Na podstawie przeprowadzonej analizy wykazano, że średnia ilość komórek Ki67 nie zmienia się po leczeniu HCQ (Fig. 65D-E). Wskazuje to, że HCQ nie wpłynęło na proliferację komórek w guzie.

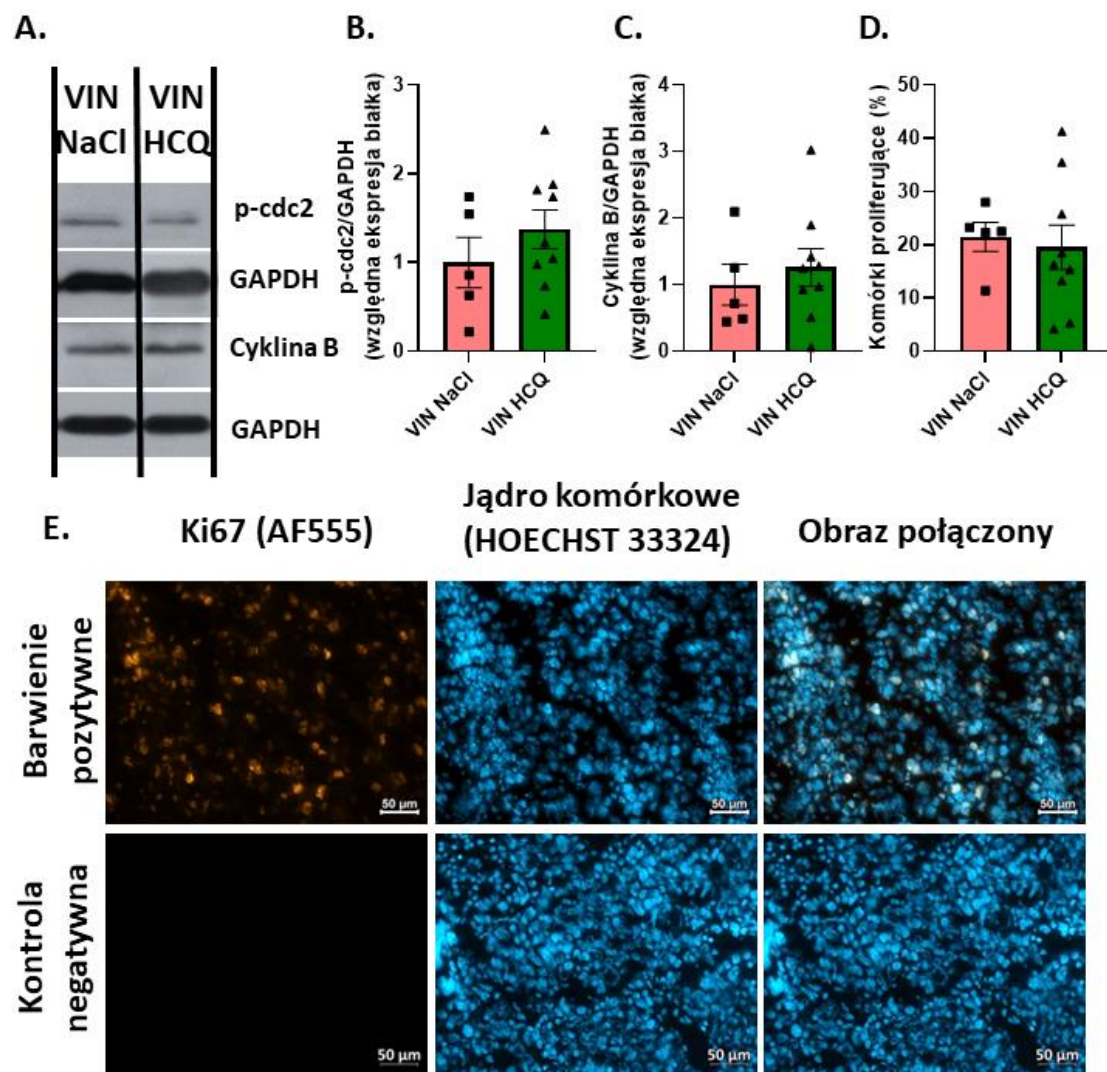


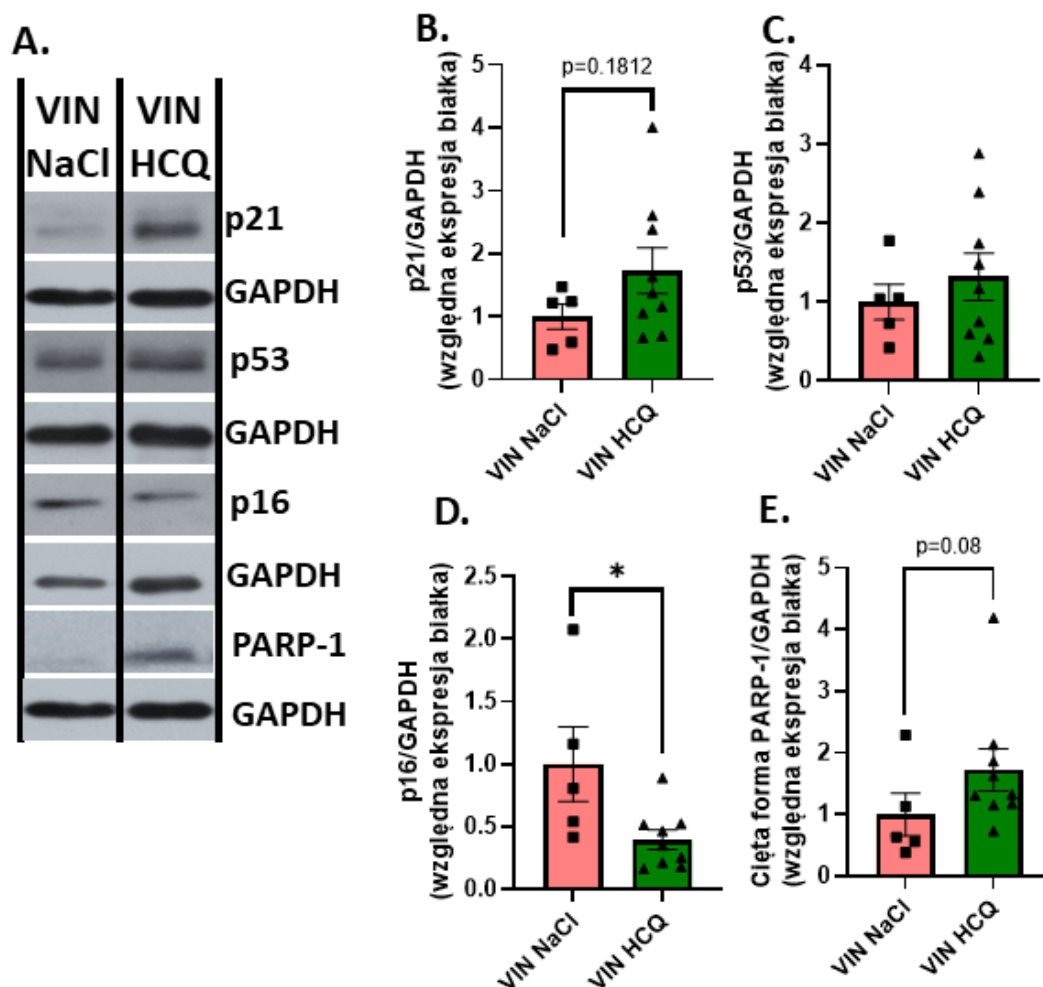
Figura 65. HCQ nie wpływa na proliferację komórek w guzach *in vivo*.

Analizę ekspresji białek p-cdc2 oraz cyklina B wykonano metodą Western Blot. **A.** Reprezentacyjne wyniki analizy Western Blot przedstawiające ekspresję białek p-cdc2 i cyklina B. GAPDH użyto jako białka referencyjnego. Wartości względnych ekspresji badanych białek wyrażają stosunek wartości białek badanych do białka referencyjnego, GAPDH. **B.** Względna ekspresja białka p-cdc2, **C.** Względna ekspresja białka Cyklina B. **D.** Analiza odsetka komórek Ki67 pozytywnych wyrażona jako procent wszystkich komórek. Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 5 \pm \text{SEM}$ . \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ . **E.** Reprezentatywne zdjęcia przedstawiające wynik barwienia immunofluorescyjnego wykrywającego białko Ki67 (kolor pomarańczowy, AF 555) oraz obraz jąder komórkowych (kolor niebieski, Hoechst 33324). Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego. Do obserwacji jąder komórkowych wykorzystano układ filtrów o parametrach EX  $385 \pm 10$  nm, BP 405 nm, EM  $425 \pm 15$  nm. Do obserwacji Ki67 wykorzystano układ filtrów o parametrach EX  $545.5 \pm 12.5$  nm, BP 570 nm, EM  $605 \pm 35$  nm. Wartość skali: 50  $\mu\text{m}$ .

W dalszej kolejności przeprowadzono analizę ekspresji białek związanych z inhibicją cyklu komórkowego metodą Western Blot: p16, p21 oraz p53. W przypadku p21 zaobserwowano tylko tendencję wzrostową po leczeniu HCQ (Fig. 66A,B), i nie zaobserwowano różnic w ekspresji p53 (Fig. 66A,C). W grupie VIN HCQ ekspresja p16 była niższa w porównaniu do grupy VIN NaCl (Fig. 66A,D).

W celu sprawdzenia, czy zaaplikowana terapia mogła wpłynąć na śmierć komórkową, wykonano analizę ekspresji ciętej formy białka PARP-1, markera apoptozy. W grupie VIN HCQ analiza ekspresji ciętej formy białka wykazała trend wzrostowy w porównaniu do grupy VIN NaCl (Fig. 66A,D), co sugeruje indukcję apoptozy.

Podsumowując, HCQ nie wpłynęło istotnie na proliferację komórek w guzie. Obniżona ekspresja p16 może wskazywać na wczesne oznaki ucieczki od starzenia zależną od szlaku p16/p-Rb. Wymaga to jednak potwierdzenia, w długotrwałych eksperymentach na większych grupach zwierząt.



**Figura 66. HCQ hamuje ekspresję p16 *in vivo*.**

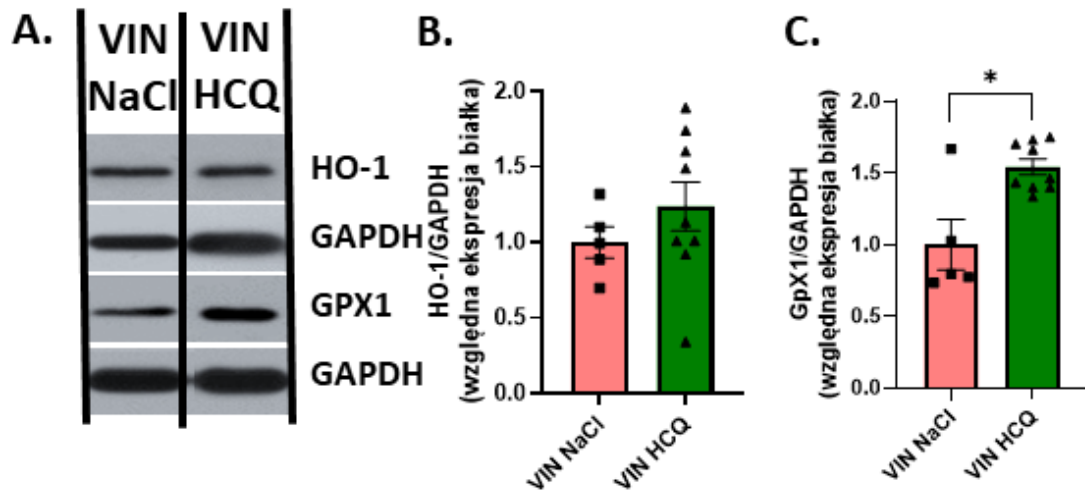
Analizę ekspresji białek p21, p53 oraz p16 wykonano metodą Western Blot. **A.** Reprezentacyjne wyniki analizy Western Blot przedstawiające ekspresję białek p16, p21 i p53. GAPDH użyto jako białka referencyjnego. Wartości względnych ekspresji badanych białek wyrażają stosunek wartości białek badanych do białka referencyjnego, GAPDH. **B.** Względna ekspresja białka p21, **C.** Względna ekspresja białka p53, **D.** Względna ekspresja białka p16, **E.** Względna ekspresja ciężkiej formy PARP-1, Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 5 \pm \text{SEM}$ . \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ .

### 8.3.4. HCQ nie wpływa na mikrośrodowisko guzów poza odpowiedzią antyoksydacyjną

W celu oceny czy HCQ wpływa na mikrośrodowisko guza przeprowadzono analizy ekspresji markerów stresu oksydacyjnego, EMT, macierzystości, hipoksji i odpowiedzi immunologicznej.

W ramach oceny aktywacji stresu oksydacyjnego wykonano analizy ekspresji białek oksygenaza hemowa 1 (ang. Heme Oxygenase 1, HO-1) oraz peroksydaza

glutationowa 1 (ang. Glutathione peroxidase 1, GpX1). Leczenie HCQ nie wpłynęło na ekspresję HO-1 (Fig. 67A,B), ale zwiększyło ekspresję białka GpX1 (Fig. 67 A,C).



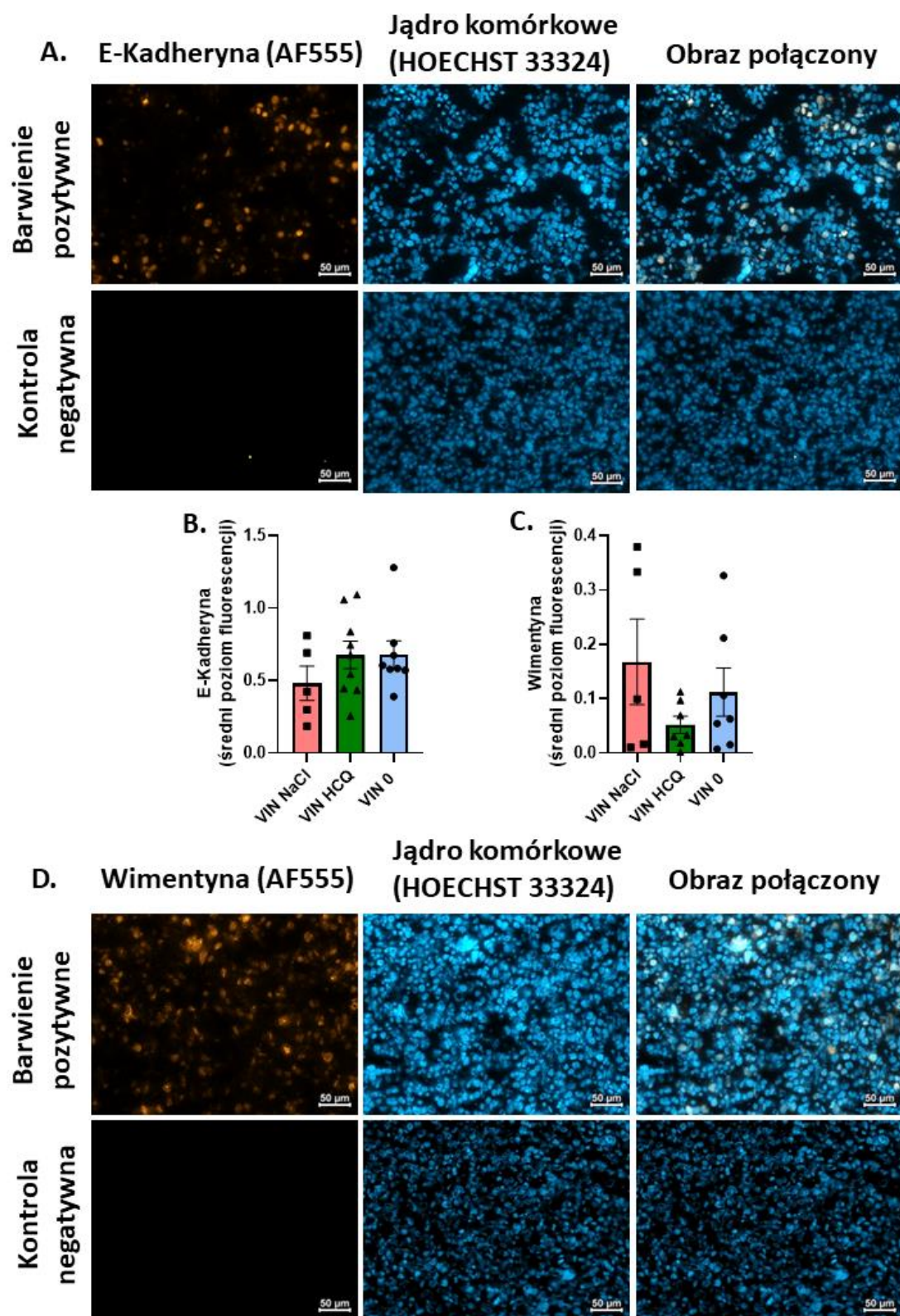
**Figura 67. HCQ promuje ekspresję GpX1 *in vivo*.**

Analizę ekspresji białek HO-1 oraz GpX1 wykonano metodą Western Blot. **A.** Reprezentacyjne wyniki analizy Western Blot przedstawiające ekspresję białek p16, p21 i p53. GAPDH użyto jako białka referencyjnego. Wartości względnych ekspresji badanych białek wyrażają stosunek wartości białka badanego do GAPDH. **B.** Względna ekspresja białka HO-1. **C.** Względna ekspresja białka GpX1, Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 5 \pm \text{SEM}$ . \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ .

Analizy ekspresji E-kadheryny, wimentyny i SNAIL wykazały, że HCQ nie wpływa na EMT (Fig. 68; 69 A-C). HCQ nie wpłynęło też na badane markery macierzystości, Nanog i ALDH1A1 (Fig. 69A,D,E). Nie zaobserwowano zmian w ekspresji białek HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$  co wskazuje na brak wpływu HCQ na hipoksję (Fig. 70). Zahamowanie autofagii nie wpłynęło też na odpowiedź immunologiczną i limfangiogenezę, na co wskazuje brak różnicy w ekspresji markerów CD45 i Lyve-1 (Fig. 71).

Podsumowując, zastosowane leczenie z użyciem HCQ nie wpłynęło na większość badanych paramentów mikrośrodowiska guza, takich jak EMT, macierzystość, hipoksja czy odpowiedź immunologiczna. Odnotowano jedynie wyższą ekspresję białka GpX1, co wskazuje na aktywację odpowiedzi antyoksydacyjnej.

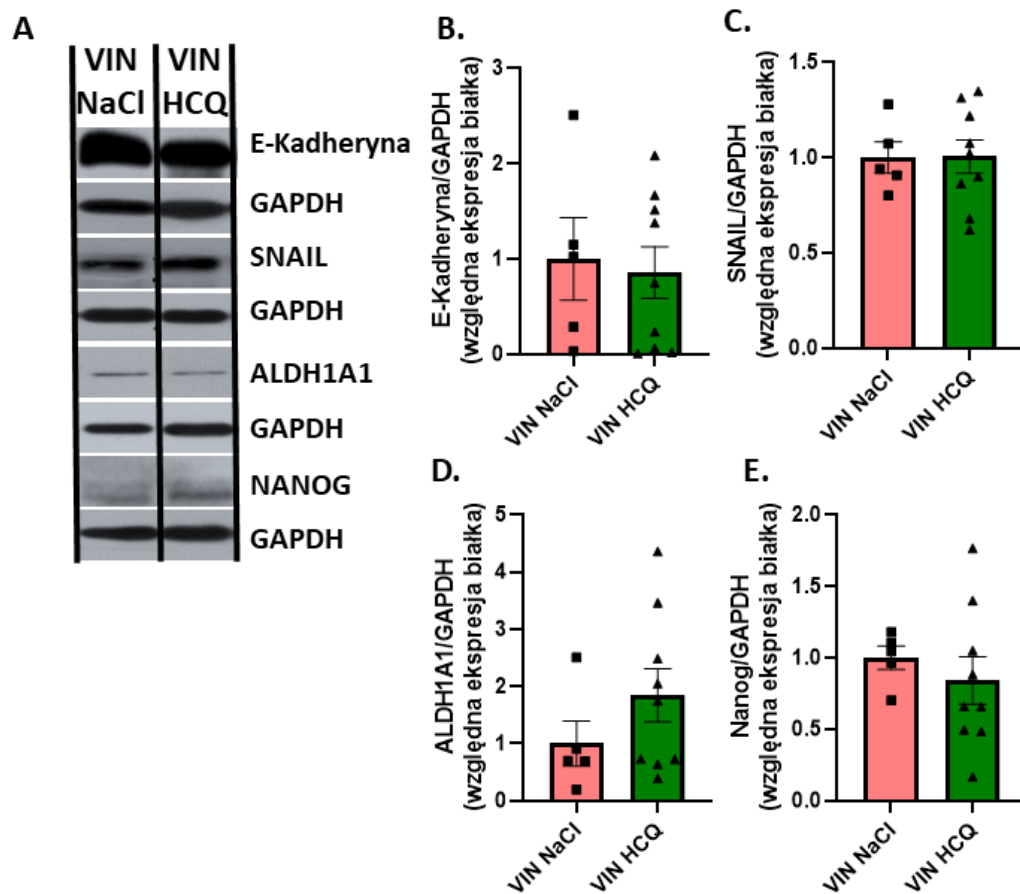




**Figura 68. HCQ nie wpływa na ekspresję markerów EMT.**

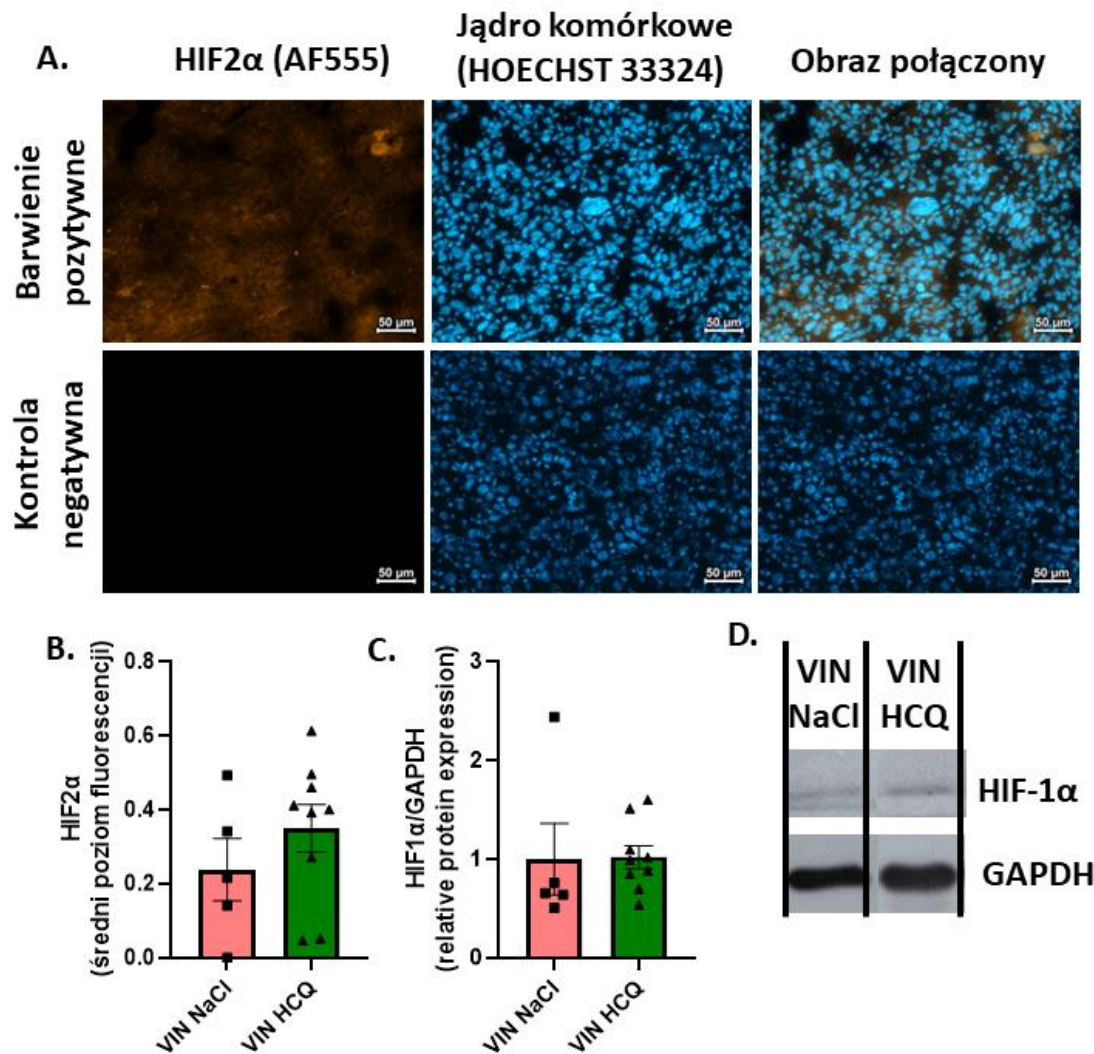
**A.** Reprezentatywne zdjęcia przedstawiające wynik barwienia immunofluorescyjnego wykrywającego białko E-Kadheryna (kolor pomarańczowy, AF555) oraz obraz jąder komórkowych (kolor niebieski, HOECHST 33324). Wartość skali: 50  $\mu\text{m}$  **B.** Wynik pomiaru średniego poziomu fluorescencji białka E-Kadheryna wyrażonego jako wartość względna. Wynik fluorescencji białka badanego porównano do fluorescencji jąder komórkowych; **C.**

Wynik pomiaru średniego poziomu fluorescencji białka wimentyna wyrażonego jako wartość względna. Wynik fluorescencji białka badanego porównano do fluorescencji jąder komórkowych. Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 5 \pm \text{SEM}$ . \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ . **D.** Reprezentatywne zdjęcia przedstawiające wynik barwienia immunofluorescyjnego wykrywającego białko wimentyna (kolor pomarańczowy, AF555) oraz obraz jąder komórkowych (kolor niebieski, Hoechst 33342). Wartość skali: 50  $\mu\text{m}$ . Zdjęcia dla obu barwień wykonano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego. Do obserwacji jąder komórkowych wykorzystano układ filtrów o parametrach EX 385 $\pm$ 10 nm, BP 405 nm, EM 425 $\pm$ 15 nm. Do obserwacji CD45 wykorzystano układ filtrów o parametrach EX 545.5 $\pm$ 12.5 nm, BP 570 nm, EM 605 $\pm$ 35 nm.



**Figura 69. HCQ nie wpływa na ekspresję markerów EMT i macierzystości *in vivo*.**

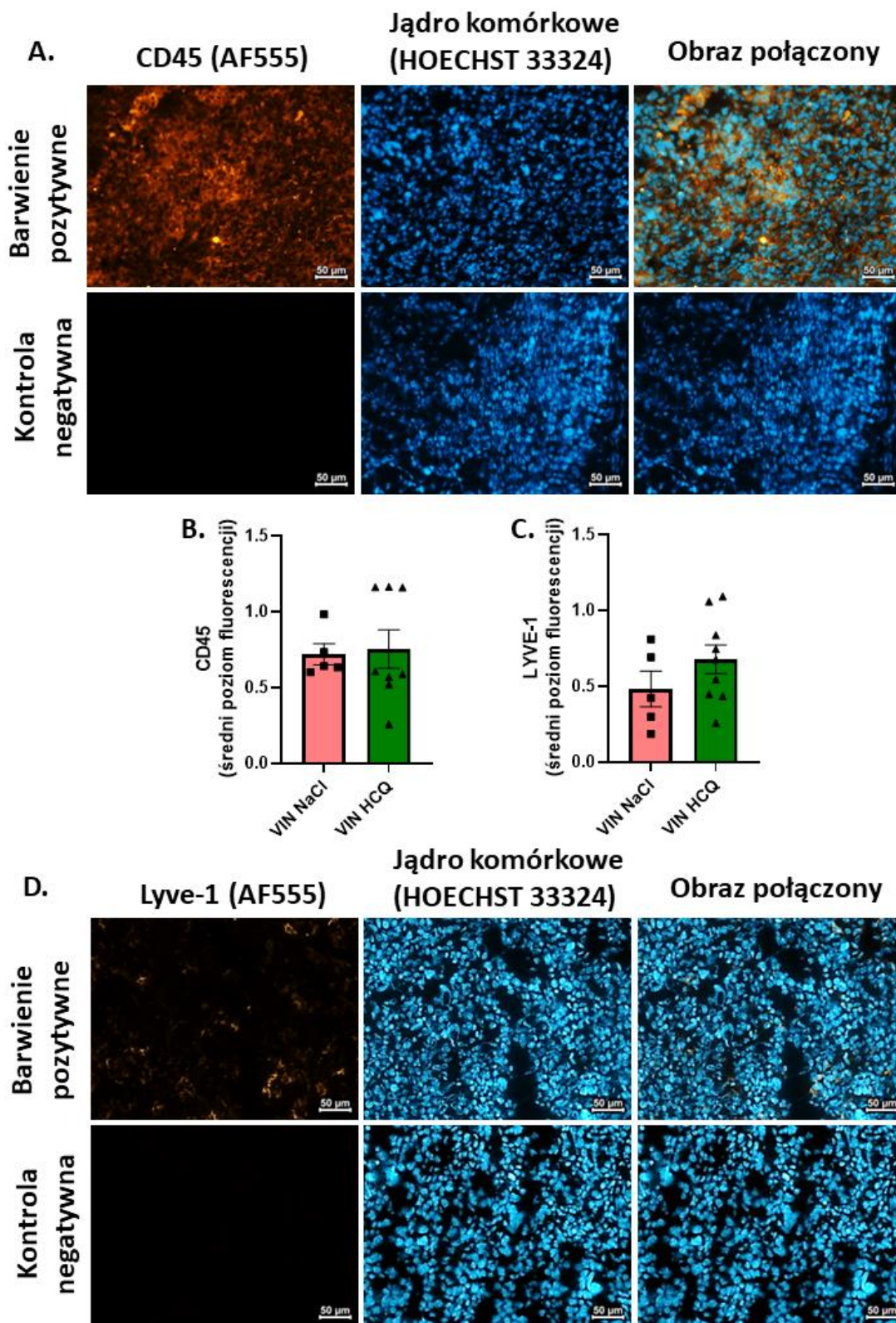
Analizę ekspresji białek E-Kadheryna, SNAIL, ALDH1A1 i NANOG wykonano metodą Western Blot. **A.** Reprezentacyjne wyniki analizy Western Blot przedstawiające ekspresję białek E-Kadheryna, SNAIL, ALDH1A1 i NANOG. GAPDH użyto jako białka referencyjnego. Wartości względnych ekspresji badanych białek wyrażają stosunek wartości, białek badanych do białka referencyjnego, GAPDH. **B.** Względna ekspresja białka E-Kadheryna **C.** Względna ekspresja białka SNAIL, **D.** Względna ekspresja białka ALDH1A1, **E.** Względna ekspresja białka Nanog. Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 5 \pm \text{SEM}$ . \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ .



**Figura 70. HCQ nie wpływa na poziom ekspresji markerów hipoksji.**

**A.** Reprezentatywne zdjęcia przedstawiające wynik barwienia immunofluorescyjnego wykrywającego białko HIF-2 $\alpha$  (kolor pomarańczowy, AF555) oraz obraz jąder komórkowych (kolor niebieski, Hoechst 33342). Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego. Do obserwacji jąder komórkowych wykorzystano układ filtrów o parametrach EX 385 $\pm$ 10 nm, BP 405 nm, EM 425 $\pm$ 15 nm. Do obserwacji HIF-2 $\alpha$  wykorzystano układ filtrów o parametrach EX 545.5 $\pm$ 12.5 nm, BP 570 nm, EM 605 $\pm$ 35 nm. Wartość skali: 50  $\mu$ m **B.** Wynik pomiaru średniego poziomu fluorescencji białka HIF-2 $\alpha$  wyrażonego jako wartość względna. Wynik fluorescencji białka badanego porównano do fluorescencji jąder komórkowych. **C.** Względna ekspresja białka HIF-1 $\alpha$ . Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 5 \pm$  SEM. \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ . **D.** Reprezentatywny wynik analizy ekspresji HIF-1 $\alpha$ . GAPDH użyto jako białka referencyjnego.





**Figura 71. HCQ nie wpływa na odpowiedź immunologiczną w guzach.**

A. Reprezentatywne zdjęcia przedstawiające wynik barwienia immunofluorescyjnego wykrywającego białko CD45 (kolor pomarańczowy, AF555) oraz obraz jąder komórkowych (kolor niebieski, Hoechst 33324). Wartość skali: 50 µm B. Wynik pomiaru średniego poziomu fluorescencji białka CD45 wyrażonego jako wartość względna. Wynik fluorescencji białka badanego porównano do fluorescencji jąder komórkowych; C. Wynik pomiaru średniego

poziomu fluorescencji białka Lyve-1 wyrażonego jako wartość względna. Wynik fluorescencji białka badanego porównano do fluorescencji jąder komórkowych. Każdy słupek przedstawia średnią wartość dla  $n \geq 5 \pm \text{SEM}$ . \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ . **D.** Reprezentatywne zdjęcia przedstawiające wynik barwienia immunofluorescyjnego wykrywającego białko Lyve-1 (kolor pomarańczowy, AF555) oraz obraz jąder komórkowych (kolor niebieski, Hoechst 33342). Wartość skali: 50  $\mu\text{m}$ . Zdjęcia dla obu barwień wykonano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego. Do obserwacji jąder komórkowych wykorzystano układ filtrów o parametrach EX 385 $\pm$ 10 nm, BP 405 nm, EM 425 $\pm$ 15 nm. Do obserwacji CD45 wykorzystano układ filtrów o parametrach EX 545.5 $\pm$ 12.5 nm, BP 570 nm, EM 605 $\pm$ 35 nm.

## 9. Dyskusja

Raki nerki charakteryzują się dużą opornością na chemoterapeutyki, co ogranicza ich zastosowanie w terapii neoadiuwantowej i adiuwantowej [24, 25]. Przypuszczamy, że jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za to zjawisko może być starzenie komórkowe. Podstawową definicją starzenia jest nieodwracalne zatrzymanie progresji cyklu komórkowego i zahamowanie podziału komórki. Pierwsze odkrycia opisywały starzenie jako zjawisko związane z limitem replikacyjnym występującym w niezmiennych nowotworowo komórkach [80, 81]. Obecnie wiadomo, że przedwczesne starzenie może być indukowane w wyniku ekspozycji komórek na czynniki stresowe, takie jak chemioterapia i radioterapia, także w komórkach nowotworowych [64]. Mechanizmy prowadzące do indukcji starzenia w wyniku działania chemioterapii są dobrze poznane i opisane, ale w niewielu badaniach bierze się pod uwagę wpływ niedotlenienia na ten proces [199, 233]. Nikt też do tej pory nie zgłębił zagadnienia indukcji starzenia w RCC pod wpływem genu i cytotoksycznej chemioterapii.

Ponieważ w wyniku starzenia dochodzi do nieodwracalnej blokady cyklu komórkowego, przez wiele lat zjawisko to uważane było za pożądany efekt terapeutyczny, sprzyjający zahamowaniu progresji choroby nowotworowej [64]. Okazało się jednak, że obecność starych komórek w guzie wiąże się z niższą przeżywalnością pacjentów, w tym chorych na RCC [65, 234]. Wiadomo, że długotrwała obecność komórek TIS w guzie promuje progresję i agresywność choroby głównie poprzez wydzielanie czynników SASP. SASP wpływa zarówno na sąsiadujące, niezmiennione starzeniowo komórki nowotworowe oraz komórki mikrośrodowiska guza, promując stan zapalny, angiogenezę oraz parakrynnie indukując starzenie. Ponadto, SASP może przyczyniać się do tworzenia przerzutów [123]. Coraz częściej mówi się też o zdolności komórek TIS do odzyskiwania potencjału proliferacyjnego, przez co mogą przyczyniać się do repopulacji i wznowy guza [134, 135, 235]. Komórki TIS są niewrażliwe na chemoterapeutyki genu – i cytotoksyczne, skuteczne w komórkach aktywnie proliferujących. W związku z tym, kluczowym jest opracowanie terapii umożliwiających selektywną eliminację starych komórek nowotworowych [158].

Rola autofagii w starzeniu komórek nowotworowych jest wciąż niekonkluzywna [157, 226]. Podejrzewa się, że autofagia może odgrywać istotną rolę w przeżyciu komórek starych, a także w aktywizacji ich podziałów [214, 236]. Zahamowanie autofagii w hipoksji może też hamować ucieczkę od starzenia

indukowaną terapiami genotoksycznymi [199]. Z tego powodu jej kontrola wydaje się atrakcyjnym celem dla terapii senolitycznych. Istnieją jednak doniesienia wskazujące, że krótkotrwałe zahamowanie autofagii w warunkach normoksji nie powoduje śmierci komórek TIS, a w długoterminowej perspektywie przyspiesza powstawanie komórek potomnych, także *in vivo* [135]. Dlatego fundamentalne znaczenie ma ustalenie, czy w warunkach zbliżonych do faktycznego mikrośrodowiska guza, np. w niedotlenieniu, kontrola autofagii w starych komórkach raka nerki jest możliwa i czy może wpłynąć na ich potencjał proliferacyjny i/lub ich śmierć.

W niniejszej pracy wykazano że: 1) komórki raka nerki ulegają starzeniu pod wpływem chemoterapeutyków, gdzie wykazały się one szczególną wrażliwością na działanie winblastyny; 2) Hipoksja nie wpływa w znaczący sposób na indukcję starzenia komórek ludzkiego raka nerki o zmutowanym białku pVHL; 3) Analizy NGS wykazały, że pod wpływem indukcji starzenia w komórkach dochodzi do aktywacji szlaków związanych z przewodzeniem aksonów i neuroaktywnej interakcji ligand-receptor, wcześniej niezidentyfikowanych w starzeniu; 4) Genetyczna modulacja wczesnych etapów autofagii nie wpływa na proliferację i aktywność metaboliczną komórek poddanych indukcji starzenia; 5) HCQ nie działa selektywnie na komórki TIS; 6) Hipoksja przyspiesza ucieczkę od starzenia pod wpływem inhibicji autofagii *in vitro*; 7) Analizy NGS pozwoliły na wyodrębnienie grupy 67 genów, których ekspresja różni się pomiędzy komórkami uciekającymi od starzenia hodowanymi w normoksji i w hipoksji, co może pozwolić zidentyfikować procesy odpowiedzialne za szybszą generację komórek potomnych w niedotlenieniu; 8) Komórki nowotworowe ulegają starzeniu pod wpływem winblastyny *in vivo*, a 9) zahamowanie autofagii nie wpływa na ekspresję markerów EMT, hipoksji, odpowiedzi immunologicznej i macierzystości *in vivo* w perspektywie krótkoterminowej, ale 8) promują sekrecję czynników SASP, IL-8 i osteopontyny, co korelowało ze spadkiem ekspresji p16 i wzrostem ekspresji GpX1. Zmiany te wskazują, że zahamowanie autofagii może przyspieszać ucieczkę od starzenia *in vivo*.

Wykazano, że ludzkie (RCC4) i mysie (RenCa) komórki ulegają starzeniu komórkowemu pod wpływem VIN, GEM i 5-FU, ale z różnym skutkiem. Najsilniejszy efekt prostarzeniowy w obu liniach uzyskano po zastosowaniu trucizny mikrotubul, VIN. W mniejszym stopniu indukcję starzenia zaobserwowano po leczeniu genotoksycznym GEM. W ludzkiej linii, niezależnie od warunków tlenowych, po

inkubacji z obydwoma lekami zaobserwowano zwiększenie populacji komórek, które wykazały się aktywnością SA- $\beta$ -Gal, a efekt ten był dawko zależny. W odróżnieniu od GEM po leczeniu VIN zaobserwowano istotnie statystyczną akumulację komórek powiększonych i granularnych. Najmniej zmian świadczących o starzeniu w ludzkiej linii komórkowej zaobserwowano po leczeniu genotoksycznym 5-FU. Podobnie w raku płuca, zaobserwowano, że zastosowanie trucizn mikrotubul, winorelbiny i docetakselu, miało większy prostarzeniowy efekt niezależnie od warunków tlenowych, niż zastosowanie genotoksycznej cisplatyny [199]. Wyniki te przeczą danym wskazującym, że trucizny mikrotubul indukują starzenie w mniejszym stopniu niż terapie genotoksyczne [97, 237].

VIN blokuje podział mitotyczny komórki na etapie przejścia z anafazy do metafazy [238]. Mechanizm działania VIN zależy w głównej mierze od jej stężenia. W niskich stężeniach hamuje proces aktywnego wydłużania i skracania mikrotubul, a w większych stężeniach prowadzi do depolimeryzacji i zmniejszenia masy mikrotubul [239]. W komórkach raka nerki traktowanie VIN wiązało się z blokadą komórek w fazie G2/M, akumulacją komórek poliploidalnych i nadekspresją zarówno p53 jak i p21 w sposób dawko-zależny. Analizy NGS przeprowadzone 4 dni po traktowaniu VIN wykazały, też że w wyniku indukcji starzenia doszło do deregulacji szlaków związanych z cyklem komórkowym. Wśród genów o obniżonej ekspresji po traktowaniu VIN zidentyfikowano geny związane z regulacją cytokinezy, takich jak AURKA, AURKB, AURKC oraz Plk1, co wskazuje, że w komórkach raka nerki mogło dojść do nieprawidłowości w podziałach mitotycznych. Mogło to prowadzić do defektów w funkcjonowaniu centrosomu, powstawaniu wrzeciona kariokinetycznego, segregacji chromosomów i samej cytokinezy [240]. Kinazy te ulegają ekspresji głównie w czasie tranzycji z fazy G2 do M [241, 242]. Wskazuje to, że w wyniku traktowania VIN doszło do katastrofy mitotycznej, wynikiem której była indukcja starzenia. Indukcję starzenia w wyniku blokady mitozy potwierdzają też prace innych zespołów badawczych [243-246].

Blokada mitozy może prowadzić do endoreplikacji, czyli mitozy, której następstwem nie jest podział komórki. To może prowadzić do śmierci komórki lub starzenia [247]. W komórkach raka szyjki macicy ekspresja p21 chroniła komórki przed apoptozą i promowała endoreplikację. W tym samym czasie w komórkach o obniżonej ekspresji p21 VIN indukowała śmierć komórkową [248]. Badania prowadzone na raku płuca wykazały, że utrata sygnalizacji kinaz Aurora prowadzi do endoreplikacji i

generacji komórek poliploidalnych, PGCC [249]. Zahamowanie kinaz Aurora poprzez zastosowanie specyficznego inhibitora MLN8237 w komórkach czerniaka doprowadziło do indukcji starzenia oraz poliploidyzacji nie przyczyniając się przy tym do indukcji śmierci komórkowej [250]. W ludzkich komórkach raka nerki doszło do poliploidyzacji co może być bezpośrednim efektem blokady mitozy. Poliploidyzacja może prowadzić do powstawania komórek PGCC, które charakteryzują się zdolnością do produkcji komórek potomnych. Wyniki te sugerują, że stosowanie toksyn mikrotubul może przyczyniać się do powstawania komórek starych o wysokim ryzyku wznowy podziałów. Hipoteza ta wymaga jednak potwierdzenia w badaniach prowadzonych w perspektywie długoterminowej.

Komórki ludzkiego raka nerki wykazały się wysoką opornością na działanie 5-FU. Traktowanie tym lekiem doprowadziło do akumulacji komórek SA- $\beta$ -Gal pozytywnych w mniejszym stopniu niż po VIN oraz obniżenia ekspresji białek regulujących cykl komórkowy p-cdc2 i pRb. Po traktowaniu 5-FU nie zaobserwowano znacznej akumulacji komórek granularnych i powiększonych. Nie zaobserwowano też znaczących zmian w ekspresji molekularnych markerów starzenia: p21 i p53. Inkubacja z 5-FU nie promowała też na sekrecję czynników SASP, co zaobserwowano po traktowaniu VIN. Guo i in. wskazali, że komórki raka jelita grubego, o chemoodporności nabytej, charakteryzują się spowolnieniem cyklu komórkowego i obniżeniem fosforylacja białka Rb, którym nie towarzyszyła nadekspresja p21, czy p53 [251]. Bojko i in. wykazano, że w kilku typach nowotworów 5-FU, mimo zwiększonej aktywności SA- $\beta$ -Gal i zwiększonej ekspresji p21, hamuje wzrost komórek, ale nie generuje starzenia [252]. Wyniki te potwierdzają, że w ludzkiej linii raka nerki nie doszło do indukcji starzenia w wyniku traktowania 5-FU.

5-FU działa poprzez hamowanie działania syntazy tymidylanowej (TS). Metabolity 5-FU mają ponadto zdolność do wbudowywania się do DNA i RNA. W efekcie jego działania dochodzi do uszkodzenia podwójnej lub pojedynczej nici DNA, które mogą prowadzić do aktywacji DDR i blokady cyklu komórkowego [30]. Oporność linii RCC4 na 5-FU może być związana z brakiem funkcjonalnego białka pVHL, co wiąże się z rozwojem „pseudohipoksji”. „Pseudohipoksja” to stan, w którym nie dochodzi do poliubikwitynizacji białka HIF- $\alpha$  i jego proteasomalnej degradacji, co w konsekwencji prowadzi do akumulacji i stabilizacji czynników HIF- $\alpha$  niezależnie od stężenia tlenu [253-255]. Komórki nerwiaka zarodkowego (neuroblastomy) [256], raka jelita grubego [257] oraz raka wątroby [258] wykazywały większą oporność na

działanie 5-FU w hipoksji. Zahamowanie aktywności HIF1- $\alpha$  przyczynia się do uwrażliwienia komórek raka jelita grubego na działanie 5-FU. W warunkach hipoksji obniża się poziom syntazy tymidylanowej [258], co wiąże się z wyższą opornością na działanie 5-FU [259] i niższą liczbą uszkodzeń DNA [258], niewystarczającą do efektywnej aktywacji maszynerii DDR i promocji starzenia. Ponadto, brak TS wiąże się z zahamowaniem syntezy DNA, co tłumaczy spadek populacji komórek RCC4 w fazie S. W raku jelita grubego zaobserwowano, że 5-FU indukowało proces starzenia dopiero po kilku cyklach leczenia w porównaniu do innych testowanych leków genotoksycznych [134]. Sugeruje to, że w komórkach raka nerki, o niefunkcjonalnym pVHL, uszkodzenia wywołane przez inkubację z 5-FU były na tyle istotne by wstrzymać podział komórek, jednak nie był to wystarczający sygnał do indukcji starzenia. Hipoteza ta wymaga jednak dalszych badań oceniających zmiany w uszkodzeniach DNA pomiędzy komórkami traktowanymi 5-FU i komórkami starymi indukowanymi do starzenia innym lekiem genotoksycznym.

W odróżnieniu od ludzkiej linii, komórki RenCa w mniejszym stopniu ulegały starzeniu w hipoksji niż w normoksji. W warunkach niedotlenienia dochodzi do stabilizacji i aktywacji czynnika HIF1- $\alpha$  [260], który, jak udowodniono w mysich embrionalnych fibroblastach, jest głównym czynnikiem chroniącym komórki przed starzeniem, a jego brak zwiększa wrażliwość komórek na indukcję TIS w wyniku działania radioterapii [261]. HIF1- $\alpha$  hamuje ekspresję białek p53 i p21 [262]. W eksperymentach prowadzonych na komórkach kostniakomiesaka potwierdzono, że brak HIF1- $\alpha$  promuje blokadę cyklu komórkowego i nadekspresję białek p53 i p21 [263]. W komórkach raka płuca i raka jelita grubego zaobserwowano niższą ekspresję p21 i p53, w komórkach hipoksyjnych w porównaniu do komórek hodowanych w normoksji. Zmiany te korelowały z ucieczką od starzenia [199]. Szlak p53/p21 jest kluczowy w indukcji blokady cyklu komórkowego, a jego ekspresja jest w głównej mierze regulowana przez maszynerię DDR [103]. W ludzkich i mysich fibroblastach zaobserwowano, że w warunkach obniżonego stężenia tlenu komórki doświadczyły mniejszej ilości uszkodzeń DNA niż w normoksji [264]. W macierzystych komórkach mezenchymalnych, aktywacja białka TWIST przez HIF-1 $\alpha$ , prowadzi do usunięcia czynnika transkrypcyjnego E2F z regionu promotora genu kodującego p21. Przyczynia się to do zahamowania ekspresji p21 [265]. Ekspresja p21 i p53 jest także regulowana przez czynnik hamowania migracji (ang. Migration Inhibitory Factor, MIF). MIF jest jednym z genów, którego transkrypcja jest aktywowana przez HIF-1 $\alpha$  [261]. Ponadto

sam czynnik pVHL może wpływać na ekspresję białek związanych ze starzeniem. Utrata pVHL prowadzi do destabilizacji aktywności p53, co w konsekwencji prowadzi do aktywacji ekspresji p21 w warunkach normoksji [263]. Większość przedstawionych danych wskazuje, że akumulacja HIF-1 $\alpha$  ogranicza indukcję starzenia w wyniku działania leków genotoksycznych. W naszych badaniach wykazaliśmy, że obecność niefunkcjonalnego pVHL nie wpływa na indukcję starzenia wynikającą z blokady mitozy w komórkach ludzkiego raka nerki. Jednak to czy może być to efekt związany z potencjalną akumulacją HIF-1 $\alpha$ , czy też w tym procesie uczestniczą inne mechanizmy, wymaga przeprowadzenia dalszych analiz. Analizy wielkoskalowe, takie jak NGS umożliwiają identyfikację pojedynczych genów i szlaków, których aktywność ulega zmianie w kluczowych procesach biologicznych i fizjologicznych.

NGS jest metodą, która umożliwiła nam głęboką analizę genów, których ekspresja uległa zmianie w wyniku indukcji starzenia w komórkach o niefunkcjonalnym pVHL. Przeprowadzone analizy wykazały, że w wyniku indukcji starzenia poza zmianami w szlakach powszechnie kojarzonych z regulacją proliferacji i naprawy DNA, doszło do aktywacji szlaków przewodzenia aksonów oraz szlaku związanego z neuroaktywną interakcją ligand-receptor. Do szlaku przewodzenia aksonów zalicza się trzy główne grupy białek: semaforyny, netryny oraz białka macierzy zewnątrzkomórkowej, SLIT. Białka te odgrywają kluczową rolę w rozwoju aksonów i migracji neuronów, przyczyniając się do rozwoju układu nerwowego [266]. W komórkach RCC4 traktowanych VIN odnotowano nadekspresję zarówno semaforyn jak i białek związanych ze szlakiem SLIT/ROBO. Białka SLIT (SLIT1, SLIT2 i SLIT3) to rodzina wydzielanych białek, które uczestniczą w interakcjach między komórkami a ich środowiskiem poprzez sygnalizację za pośrednictwem receptorów ROBO (ROBO1, ROBO2, ROBO3 i ROBO4). Wykazano, że szlak sygnałowy SLIT/ROBO bierze udział w neurogenезie oraz w tworzeniu układu naczyniowego [267]. Aktywacji ścieżki SLIT/ROBO może promować rozwój fenotypu macierzystego co wykazano w komórkach raka piersi [268], oraz hamować proliferację komórek nowotworowych [269]. Semaforyny to duża rodzina białek regulujących sygnały rozwojowe. Cząsteczki te kontrolują komunikację komórka-komórka, migrację komórek, inwazję i przerzuty, angiogenezę oraz reakcje zapalne. Coraz więcej dowodów wskazuje, że semaforyny można uznać za nowe biomarkery kliniczne raka, zwłaszcza do przewidywania przeżycia pacjentów i ich odpowiedzi na terapię [270]. Do tej pory w raku nerki odnotowano podwyższoną ekspresję tylko dwóch semaforyn Sema5B [271]



oraz Sema6C [272], których nadekspresję zaobserwowano także po traktowaniu VIN. Tak jak w przypadku szlaku SLIT/ROBO, także w przypadku semaforów dotąd nie opisano ich roli w starzeniu. Szenajch i in. przeprowadzili analizy NGS na komórkach raka jajnika w których wyindukowano oporność na paklitaksel, związek stabilizujący mikrotubule. Analizy te wykazały, że zmianie ekspresji ulegały geny związane między innymi z rozwojem układu nerwowego. Zaobserwowane zmiany były gradacyjne, to znaczy, że im wyższą opornością na lek wykazywały się komórki, tym odnotowywano bardziej istotne zmiany ekspresji badanych genów. W swojej pracy badacze zidentyfikowali m.in. geny z grupy semaforów oraz gen SLITRK5 (ang. SLIT and NTRK-like protein-5) [273]. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy po raz pierwszy wykazały, że w wyniku indukcji starzenia w komórkach nowotworowych dochodzi do aktywacji ekspresji genów przypisanych do szlaków przewodzenia aksonów oraz z neuroaktywną interakcją ligand-receptor. Zbadanie ich roli w procesie indukcji starzenia może okazać się kluczowe w lepszym zrozumieniu tego zjawiska, szczególnie w kontekście jego roli jako mechanizmu przyczyniającego się chemooporności. Ponadto, badania nad tymi mechanizmami mogą przyczynić się do opracowania nowych strategii terapeutycznych, w tym potencjalnych terapii senolitycznych.

Leki o działaniu senolitycznym, to związki, których działanie opiera się na selektywnej eliminacji komórek starych [274]. Jednym z mechanizmów, którego modulacja mogłaby mieć efekt senolityczny jest autofagia. [124, 174]. W celu ustalenia, czy zastosowanie takiej strategii mogłoby okazać się skuteczne w komórkach raka nerki ulegających starzeniu, w pierwszej kolejności przeprowadzono analizy aktywności autofagii w komórkach traktowanych VIN oraz 5-FU. Wykazano, że leczenie VIN równocześnie z akumulacją komórek starych promowała aktywację autofagii w komórkach RCC4 co wykazał wyższy stosunek form LC3-II do LC3-I zarówno w normoksji jak i w hipoksji. Rolę aktywacji autofagii w procesie indukcji starzenia potwierdza fakt, że po leczeniu 5-FU nie zaobserwowano podobnych zmian w stosunku LC3-II/LC3-I, co szło w parze z brakiem znaczących zmian świadczących o indukcji starzenia. Aktywację autofagii w komórkach TIS zaobserwowano też w komórkach raka jelita grubego i raka piersi [135, 214].

Aktywacja autofagii wydaje się być ściśle związana z mechanizmem działania VIN. Wczesne prace wykazały, że związek ten promuje akumulację autofagosomów [275]. VIN wpływając na mikrotubule hamuje transport pęcherzykowy, przyczyniając

się do blokady fuzji autofagosomów i lizosomów, a co za tym idzie do deregulacji przepływu autofagicznego [276, 277]. W komórkach RCC4 dochodziło do degradacji autofagolizosomów po traktowaniu VIN o czym świadczył obniżony poziom p62. Ponadto, w komórkach raka nerki zaobserwowano zwiększoną sekrecję katepsyny-S, która odgrywa istotną rolę w procesie fuzji autofagosomów i lizosomów [225]. Zmiany te wskazują, że w komórkach raka nerki w wyniku traktowania VIN doszło do aktywacji autofagii, a jej przepływ nie został zahamowany. Aktywację autofagii i prawidłowy przebieg autofagiczny wraz z akumulacją komórek SA- $\beta$ -Gal pozytywnych zaobserwowano też w komórkach raka płuca poddanych radioterapii [278]. Co więcej, wyciszenie p62 indukuje fenotyp starzeniowy [279]. Aktywność p62 jest związana z zahamowaniem szlaku mTOR [280]. Kompleks MTORC1, odgrywa kluczową rolę w regulacji procesu autofagii, gdzie zahamowanie jego aktywności wiąże się z aktywacją autofagii [279]. W swojej pracy Duran i in. potwierdzili, że p62 odgrywa kluczową rolę w regulacji aktywacji kompleksu MTORC1 [281]. W komórkach raka nerki w wyniku indukcji starzenia doszło do zahamowania szlaku mTOR o czym świadczyła obniżona ekspresja p-S6, głównego efektora szlaku mTOR, oraz zwiększona aktywność PTEN, który jest negatywnym regulatorem PI3K/Akt. Potwierdza to, że aktywacja autofagii w komórkach raka nerki traktowanych VIN jest regulowana przez zahamowanie aktywności szlaku mTOR. Podsumowując, w komórkach raka nerki zaobserwowano, że w wyniku traktowania VIN dochodzi zarówno do aktywacji TIS jak i autofagii.

To czy autofagia odgrywa rolę w procesie indukcji starzenia pozostaje kwestią nierozwiązaną [124]. Istnieją doniesienia wskazujące, że zahamowanie autofagii na jej wczesnych etapach może promować indukcję starzenia [282]. Jej aktywacja jest też kluczowa w procesie indukcji starzenia w wyniku radioterapii [283]. W niniejszej pracy wykazano, że inhibicja genów odpowiedzialnych za inicjację autofagii oraz formowanie autofagoforu (ATG5, ATG7, Becn1 oraz ULK-1) nie wpłynęła na proliferację oraz aktywność metaboliczną komórek traktowanych VIN i 5-FU. Wynika z tego, że zahamowanie etapu inicjacji autofagii w komórkach raka nerki poprzez wyciszenie pojedynczych genów autofagicznych nie jest czynnikiem limitującym w indukcji starzenia. Brak wpływu modulacji procesu inicjacji autofagii na rozwój starzenia wykazali też Saleh i in.. Zaobserwowali, że wyciszenie ATG5 nie wpływa na indukcję, ani podtrzymanie starzenia w komórkach nowotworowych [284]. W swojej pracy Olszewska i in. wykazali, że genetyczna modyfikacja autofagii przez wyciszenie

ATG5, ATG7 i Becn1 w niewielkim stopniu wpłynęła na aktywność metaboliczną, proliferację i liczebność komórek raka płuca [199]. Z kolei w komórkach raka piersi wyciszenie genów ATG5 i ATG7 spowolniło rozwój starzenia pod wpływem adriamycyny [285]. Zaobserwowano też, że wyciszenie genów autofagicznych nie wpłynęło na ekspresję białek LC3-II/I oraz p62 [284]. Należy jednak brać pod uwagę, że brak ekspresji jednego genu autofagicznego może być kompensowany przez inne białka ATG co w swojej pracy sugerowali Xu i in. [286]. W związku z tym zagadnienie hamowania wczesnych etapów autofagii wymaga dalszych badań uwzględniających wyciszenie więcej niż jednego genu związanego z tym procesem.

Ponieważ inhibicja autofagii wydaje się nie wpływać na proces indukcji starzenia, postawiono tezę, że może ona przyczyniać się do utrzymania fenotypu starzeniowego. W związku z tym przeprowadzono analizy z wykorzystaniem inhibitorów późnej autofagii BafA1 i HCQ. Inkubacji z inhibitorami poddano komórki raka nerki wcześniej traktowane VIN lub 5-FU. W pierwszej kolejności porównano efektywność obu inhibitorów. Oba leki wpłynęły na obniżenie aktywności metabolicznej i proliferacji badanych komórek. Zaobserwowano, że komórki traktowane VIN były wrażliwe zarówno na BafA1 i HCQ. Pod wpływem HCQ odnotowano akumulację komórek apoptotycznych oraz zmiany wskazujące na blokadę cyklu komórkowego. Podobny efekt zaobserwowano w fibroblastach, w których starzenie było indukowane przez mutację BRAF-V600, po zastosowaniu CQ i g-Strofantyny, pośrednio wpływającej na autofagię. CQ nie działał jednak na komórki TIS indukowane etopozydem [287]. Mutacja BRAF-V600 prowadzi do odwracalnej blokady cytokinezy spowodowanej inhibicją ekspresji genu AURKB [288], co może przyczyniać się do poliploidyzacji. Obniżenie ekspresji kinazy Aurora oraz poliploidyzację odnotowano też po leczeniu VIN w ludzkiej linii RCC4. Sugeruje to, że poliploidyzacja może odgrywać istotną rolę w odpowiedzi na działanie inhibitorów autofagii. Z drugiej strony komórki raka jelita grubego i glejaka, które w wyniku traktowania doksorubicyną uległy starzeniu i poliploidyzacji wykazały się wyższą opornością na działanie BafA1, niż komórki nietraktowane. W aktywnie proliferujących fibroblastach CQ miało efekt cytostatyczny [287]. W komórkach nietraktowanych raka nerki zaobserwowano efekt cytotoksyczny i blokadę cyklu komórkowego pod wpływem HCQ, tak jak w przypadku komórek traktowanych VIN. Analizy gęstości hodowli wykazały, że efekt cytotoksyczny był bardziej znaczący w komórkach nietraktowanych niż w komórkach traktowanych VIN. Sugeruje to, że zmiany

zaobserwowane w hodowlach inkubowanych z VIN, nie dotyczył komórek TIS, ale komórek, które nie uległy starzeniu, a były cały czas obecne w hodowli. Podobne wnioski wysunęli badacze oceniający efekt BafA1 na komórki raka jelita grubego [135]. Wskazuje to, że HCQ nie ma działania senolitycznego.

HCQ nieznacznie wpłynęło na komórki traktowane 5-FU, które nie uległy starzeniu, ale były zablokowane w cyklu komórkowym. Komórki te okazały się z kolei wrażliwe na działanie BafA1, jednak wniosek ten jest wyciągnięty tylko na podstawie przeprowadzonych analiz proliferacji i aktywności metabolicznej. W swojej pracy Waś i in. wykazali, że komórki traktowane oksaliplatyną, które nie wykazywały cech indukcji starzenia odpowiedziały na inhibicję autofagii, o czym świadczył spadek liczby kolonii tworzonych przez komórki traktowane BafA1. W komórkach tych nie odnotowano aktywacji autofagii, w odróżnieniu do komórek traktowanych doksorubicyną i irinotekaniem, które okazały się odporne na działanie BafA1 [135]. Z kolei w komórkach raka nerki traktowanych 5-FU zaobserwowano spadki ekspresji p62, sugerujące aktywację autofagii. Nie zaobserwowano w nich jednak zmian w stosunku LC3-II/I, co wskazuje na brak generacji autofagosomów. Waś i in. w swojej pracy zasugerowali, że wysoka aktywność autofagii może hamować działanie inhibitora BafA1. Wyniki przedstawione w tej pracy potwierdzają tę tezę.

Po zastosowaniu HCQ zaobserwowano zmiany wskazujące na ucieczkę od starzenia, takie jak spadek ekspresji p21 i p53. Analizy morfologii jąder komórkowych wykazały, że w hipoksji zwiększyła się populacja komórek o normalnych jądrach komórkowych. Obserwacje te sugerują ucieczkę od blokady cyklu komórkowego i generację komórek potomnych. Ucieczkę od starzenia i generację komórek potomnych w wyniku zahamowania autofagii zaobserwowano też we wcześniej wspomnianych badaniach prowadzonych na raku jelita grubego [135]. W normoksji zahamowanie autofagii spowodowało ucieczkę od starzenia komórek TIS indukowanych doksorubicyną. W warunkach *in vivo* z kolei efekt ten był odwrotny, gdzie to komórki traktowane BafA1 generowały guz szybciej niż komórki nietraktowane inhibitorem [135]. W obu przypadkach w hodowlach obserwowane były komórki poliploidalne. Depoliplidyzację powiązano z generacją komórek potomnych przez komórki stare, w kilku typach nowotworów [28, 145, 289]. W RCC4 zaobserwowano, że generacji komórek o normalnej morfologii komórek, towarzyszył spadek liczby komórek o jądrach pączkujących. Pączkowanie jest jednym z proponowanych podziałów amitotycznych niewymagających utworzenia wrzeciona kariokinetycznego [148, 290, 291]. O tym, że

generacja komórek potomnych nie jest wynikiem prawidłowych podziałów mitotycznych świadczą też wyniki analiz NGS. Wykazały one, że po traktowaniu HCQ w komórkach starych dochodzi do zahamowania ekspresji genów związanych z proliferacją i replikacją DNA. Dodatkowo wraz zahamowaniem prawidłowego przepływu autofagicznego zmniejszyła się aktywacja szlaków związanych z naprawą DNA, co może wskazywać na akumulację jego uszkodzeń w komórkach. Obserwacje takie poczyniono w raku piersi [214]. To w jaki sposób zahamowanie autofagii wpływa na generację komórek potomnych i dlaczego niedotlenienie przyspiesza ten proces nie jest do końca zrozumiałe. Przedstawione w pracy wyniki wskazują jednak na kilka mechanizmów, które mogą regulować ten proces.

Pojawienie się komórek potomnych w hipoksji korelowało z blokadą przepływu autofagicznego. Nieprawidłowości w przepływie autofagicznym odnotowano też w normoksji, jednak zmiany te były mniej istotne niż w niedotlenieniu. Blokadę przepływu autofagicznego zaobserwowano, przy równoczesnym spadku odsetka komórek poliploidalnych także w komórkach raka piersi [214]. Almacellas i in. udowodnili, że prawidłowy przepływ autofagii jest wymagany do zahamowania prawidłowej segregacji chromosomów w czasie podziałów komórkowych. Autorzy nie wskazują jednak, czy zaobserwowane przez nich zaburzenia mogą wpływać na depoliploidyzację [292]. Co więcej, w raku piersi odnotowano, że poziom autofagii w komórkach potomnych wraca do poziomu bazowego, cechującego komórki nietraktowane [214]. Wyniki te sugerują, że to zahamowanie przepływu autofagicznego jest bezpośrednią przyczyną indukcji podziałów amitotycznych. To, w jaki sposób regulacja autofagii wpływa na podziały amitotyczne nadal pozostaje bez odpowiedzi. Zahamowanie przepływu autofagicznego może generować stres, prowadzący do śmierci części komórek. W komórkach raka jelita grubego, zaobserwowano, że traktowanie BafA1 generuje poliploidyzację komórek TIS [135]. W raku nerki nie zaobserwowaliśmy takich zmian. Różnica ta może wynikać z długości czasu trwania eksperymentu. W naszych badaniach prowadziliśmy eksperymenty krótkotrwałe, trwające maksymalnie 11 dni, gdy w przypadku raka jelita grubego zmiany obserwowano przez 25 dni. W raku nerki zaobserwowano, że bezpośrednio po traktowaniu HCQ aktywność lizosomalna spada, ale już po dwóch dniach od usunięcia inhibitora poziom ten wzrasta. Podobny efekt zaobserwowano po traktowaniu starych komórek raka jelita grubego BafA1 [135]. Sugeruje to, że usunięcie inhibitora powoduje

kompensacyjną reaktywację autofagii, co w konsekwencji może prowadzić do depoliploidyacji. Z drugiej strony White-Gilbertson i in. zaobserwowali, że generacja komórek potomnych jest zależna od aktywności lizosomalnego enzymu, ceramidazy ASAH1, a jego inhibicja wpływa na deregulację metabolizmu cholesterolu, lipidu z grupy steroidów [293]. W komórkach raka nerki na podstawie analizy NGS odnotowano, że HCQ promuje ekspresję genu ASAH2 oraz aktywuje ścieżkę pierwotnej biosyntezy kwasów żółciowych. Kwasy żółciowe są rozpuszczalnymi pochodnymi cholesterolu [294]. Lipidy odgrywają kluczową rolę w regulacji struktury błony lipidowej oraz metabolizmu komórek starych [295]. Na tej podstawie można przypuszczać, że w depoliploidyacji komórek raka nerki kluczową rolę może także odgrywać metabolizm cholesterolu i reaktywacja lizosomów. Hipoteza ta wymaga jednak dalszych analiz.

W RCC4 indukowanych do starzenia zaobserwowano istotnie wyższą sekrecję SASP: VEGF-A, IL-8 oraz osteopontyny. Zmiany w większości przypadków były bardziej istotne w hipoksji, gdzie odnotowano generację komórek potomnych. Podobny efekt zaobserwowano po traktowaniu starych komórek HCT116 BafA1, gdzie odnotowano wyższą sekrecję czynników IL-8 i VEGF wraz z ucieczką od starzenia [135]. Jedynie w przypadku IGFBP-3, zaobserwowano spadek sekrecji w wyniku działania HCQ, zarówno w normoksji i hipoksji. Spadek ekspresji tego genu zaobserwowano także w ramach analiz NGS i potwierdzono w ramach eksperymentów weryfikujących. Kim i in. w swojej pracy zaobserwowali, że ekspresja IGFBP-3, spadała wraz z ucieczką od starzenia replikacyjnego komórek endotelialnych. W swojej pracy badacze wykazali też, że IGFBP-3 powoduje starzenie zależne od p53 [296]. Co więcej, istnieją badania wskazujące, że IGFBP-3 reguluje proces autofagii [297]. W przedstawionych badaniach zaobserwowano, że sekrecja IGFBP-3 wzrastała wraz z aktywnością autofagii, ale w momencie kiedy doszło do zahamowania jego przepływu jego ekspresja spadała. Sugeruje to, że IGFBP-3 może być jednym z czynników regulujących proces ucieczki od starzenia. Weryfikacja tego wniosku wymaga jednak dalszych badań i weryfikacji.

Osteopontyna, której ekspresja po zahamowaniu autofagii wzrosła w hipoksji jest chemokiną, której ekspresja jest podwyższona w wielu typach nowotworów w tym RCC [298], gdzie wykazano, że jej nadekspresja wiąże się z niższą przeżywalnością pacjentów [299, 300]. Promocję fenotypu macierzystego pod wpływem tej chemokiny odnotowano też w raku trzustki [301] oraz raka jajnika [302]. W komórkach glejaka

wielopostaciowego udowodniono, że wyciszenie osteopontyny hamuje zdolność komórek do inicjacji nowotworowej [303]. Nadekspresja tej chemokiny związana jest z aktywacją autofagii w wyniku głodzenia, i na odwrót, nadekspresja osteopontyny promuje aktywację autofagii w raku wątroby [304]. W raku wątroby zaobserwowano, że nadekspresja osteopontyny promuje rozwój fenotypu macierzystego poprzez aktywację szlaku  $\alpha\beta3$ -NF $\kappa$ B-HIF-1 $\alpha$  [305]. Analizy NGS wykazały, że w komórkach raka nerki dochodzi do nadekspresji genów związanych ze szlakiem NF $\kappa$ B w wyniku zahamowania autofagii. Szlak NF $\kappa$ B odgrywa kluczową rolę w regulacji sekrecji SASP [306]. Podobnie jak w przypadku osteopontyny, wyciszenie ekspresji NF $\kappa$ B prowadziło do utraty cech macierzystości przez komórki raka płuca [307] oraz raka jelita grubego [308]. Nadekspresję markerów macierzystości zaobserwowano w komórkach raka płuca [199] oraz komórkach raka jelita grubego [134, 135] indukowanych do TIS. W przypadku komórek raka jelita grubego nadekspresję tych markerów zaobserwowano równoległe z ucieczką od starzenia i generacją komórek potomnych [134, 135]. Wzmoczona sekrecja osteopontyny oraz nadekspresja genów szlaku NF $\kappa$ B w komórkach RCC4 w hipoksji sugeruje indukcję fenotypu macierzystego w odpowiedzi na modulację autofagii z użyciem HCQ. Zjawisko to mogłoby tłumaczyć dlaczego w hipoksji zaobserwowano komórki potomne, gdy w normoksji zaobserwowano tylko zmiany molekularne wskazujące na ucieczkę od starzenia. Hipoteza ta wymaga jednak dalszych badań w celu potwierdzenia ekspresji markerów macierzystości w komórkach raka nerki traktowanych VIN po leczeniu HCQ.

Analizy NGS pozwoliły też na wytypowanie niewielkiej grupy genów, których ekspresja różniła się w komórkach uciekających od starzenia hodowanych w normoksji oraz w hipoksji. Wśród nich odnotowano tylko cztery geny kodujące białka, których ekspresja była niższa w hipoksji: HMOX1, KLRG1, H3C10 oraz PSAT1. Nie są to białka powszechnie związane z funkcjonowaniem komórek nowotworowych czy depoliploidyzacją. Różnice w ich ekspresji mogą tłumaczyć, dlaczego niedotlenienie przyspieszyło ucieczkę od starzenia pod wpływem inhibicji autofagii.

HMOX1, jest genem kodującym oksygenazę hemową (HO-1). HO-1 jest enzymem odgrywającym kluczową rolę w katabolizmie hemu do biliwerdyny, tlenku węgla (CO) oraz jonów żelaza Fe<sup>2+</sup>. Ekspresja HO-1 jest aktywowana w odpowiedzi na stres oksydacyjny wywołany np. przez niedotlenienie. Spadek ekspresji tego genu odnotowano także w wyniku indukcji starzenia. Spadek ekspresji HO-1 w wyniku

indukcji TIS zaobserwowano też w komórkach raka jelita grubego. W tym modelu ucieczka od TIS i aktywacja EMT korelowała ze wzrost ekspresji HO-1, po zastosowaniu związku aktywującego stres oksydacyjny  $H_2O_2$  [309]. Z drugiej strony, obniżoną ekspresję HO-1 zaobserwowano w różnych typach tkanek ulegających starzeniu fizjologicznemu, co przyczyniało się akumulacji uszkodzeń wynikających ze stresu oksydacyjnego oraz akumulacją ROS [310, 311]. Podwyższony poziom ROS zidentyfikowano w komórkach poliploidalnych co związane było z wyższą zdolnością komórek do tumorigenezy [312]. Sugeruje to, że w komórkach poliploidalnych RCC4 mogło dojść do akumulacji ROS, co mogło przyczynić się do ucieczki od starzenia. Z drugiej strony zastosowanie związków antyoksydacyjnych mogłoby posłużyć do eliminacji starych, poliploidalnych komórek lub zapobiec ich ucieczce od starzenia. Takie obserwacje poczyniono w komórkach raka jelita grubego, gdzie zastosowanie antyoksydantu Trolox przyczyniło się do zmniejszenia populacji komórek poliploidalnych. W komórkach zaobserwowano, że traktowanie antyoksydantem nie zmniejszyło indukcji starzenia, ale komórki te charakteryzowała niższa zdolność do tworzenia kolonii w trakcie testu klonogenicznego, w porównaniu do komórek leczonych tylko chemoterapeutykami [145]. Przyspieszenie ucieczki od starzenia zaobserwowano też po zastosowaniu prooksydantu  $H_2O_2$  w komórkach raka jelita grubego indukowanych do starzenia przez irinotekan [309]. Wskazuje to, że w RCC4 mogło dojść do podobnych zmian. Hipoteza ta wymaga jednak dalszych analiz gospodarki ROS w komórkach raka nerki indukowanych do starzenia przy użyciu VIN.

KLRG1 ulega ekspresji na powierzchni komórek układu immunologicznego, limfocytów T i komórek NK, a jego nadekspresja uznawana jest za oznakę starzenia komórek odpornościowych [313]. Nie istnieje wiele informacji odnośnie roli tego białka w progresji nowotworowej. Odnotowano, że ekspresja KLRG1 wzrasta w próbkach ludzkich nowotworów po zastosowaniu radioterapii, chemioterapii, immunoterapii oraz terapii endokrynnej [314]. W komórkach raka płuca zaobserwowano, że wyciszenie ekspresji KLRG1 przyczyniło się do zwiększenia ich proliferacji [315]. Sugeruje to, że spadek ekspresji KLRG1 w komórkach raka nerki uciekających od starzenia może być jednym z czynników regulujących wznowę podziałów. Wymaga to jednak dalszych badań.

PSAT1 jest aminotransferazą fosfoserynową, regulującą syntezę seryny [316]. Nadekspresję PSAT1 zaobserwowano w raku piersi [317] oraz w raku jelita grubego [316]. Wang i in. w swoich badaniach zaobserwowali, że nadekspresja PSAT1



prowadziła do akumulacji komórek w fazie G0/G1 oraz spadku ekspresji cykliny D1, kluczowej w regulacji tranzycji z fazy G1 do S [316]. Obniżenie ekspresji genu PSAT1 może wiązać się z ucieczką od blokady w fazie G0/G1. W komórkach traktowanych VIN po zastosowaniu HCQ zaobserwowano spadek populacji komórek w fazie cyklu G0/G1 w hipoksji. Może to wskazywać na Wyciszenie PSAT1 prowadziło też do obniżenia aktywności szlaku mTOR, o czym świadczyła zmniejszona fosforylacja białek mTOR oraz S6 [316]. W przypadku komórek raka nerki także zaobserwowaliśmy spadek ekspresji białka p-S6 oraz ekspresji PSAT1 zarówno w wyniku indukcji starzenia, jak i zahamowania autofagii, gdzie w hipoksji zmiany te były istotnie wyższe niż w normoksji. Jednym z kluczowych elementów prowadzących do nieodwracalnego starzenia jest aktywacja szlaku mTOR w czasie blokady cyklu komórkowego, która prowadzi do gerokonwersji [107]. Obniżenie ekspresji PSAT1 może tłumaczyć brak aktywności szlaku mTOR w odpowiedzi na inkubację z VIN, a co za tym idzie tłumaczyć dlaczego w komórkach raka nerki tak szybko zaobserwowano ucieczkę od starzenia.

Otrzymane wyniki *in vitro*, wykazały, że zahamowanie autofagii przyspiesza ucieczkę od starzenia. Chcieliśmy zweryfikować te obserwacje także w warunkach *in vivo*. We wcześniejszych pracach członków naszego zespołu wykazano, że w modelu NUDE/SCID komórki TIS traktowane BafA1 znacznie szybciej generowały guzy niż komórki nietraktowane inhibitorem. Eksperymenty te wykorzystywały komórki leczone przed iniekcją do myszy. Ponadto wykorzystany szczep charakteryzuje się brakiem aktywności układu immunologicznego [135]. W celu lepszego odwzorowania warunków klinicznych, postanowiliśmy opracować model indukcji starzenia bezpośrednio w organizmie zwierząt. Ponadto zależało nam by TME było jak najbliższe temu, które obserwowane jest u pacjentów. Z tego powodu zdecydowano o wykorzystaniu modelu syngenicznego, o normalnie funkcjonującym układzie immunologicznym. Próba opracowania modelu indukcji starzenia *in vivo* z wykorzystaniem terapii systemowej wiązała się z dużymi trudnościami w utrzymaniu stabilnego wzrostu guza. Na początku trwania eksperymentu zaobserwowano, że wzrost guzów był spowolniony, ale po rozpoczęciu drugiej tury leczenia, gdzie porównywaliśmy efekt HCQ do VIN, zaobserwowaliśmy nagły wzrost objętości guza. Pierwsze badania nad efektywnością VIN *in vivo* prowadzone na myszach NMRI/SCID i pierwotnych ludzkich linii raka nerki wykazały, że leczenie VIN nie przyczyniło się do zahamowania wzrostu guza w 3 na 4 badanych liniach komórkowych. Badacze

zaobserwowali jednak, że zwiększenie dawki VIN spowalniało wzrost guza [230]. W modelu ksenograficznym raka nerki, leczenie VIN najslabiej wpłynęło na wzrost guza w porównaniu do inhibitora topoizomerazy. Guzy myszy leczonych trucizną mikrotubul były zdecydowanie większe niż myszy leczonych inhibitorem topoizomerazy. Zastosowanie VIN raz w tygodniu w dawce 2.7 mg/kg wiązało się też z największą toksycznością w porównaniu do innych badanych związków. O toksyczności świadczył spadek wagi myszy. Efekt ten był jednak przejściowy, ponieważ waga myszy wzrosła tydzień po zaprzestaniu terapii. Badacze nie badali innych objawów niepożądanych. Odnotowali jedynie, że zastosowane leczenie nie przyczyniło się do śmierci żadnego ze zwierząt [228]. W badaniach *in vivo* oceniających skuteczność VIN i kolchicyny w leczeniu raka gruczołowego jelita grubego zaobserwowano, że stosowanie 10mg/kg VIN spowodowało śmierć 1/6 zwierząt, które poddano leczeniu. Badacze nie wspominają jednak o wystąpieniu innych objawów niepożądanych [318]. W eksperymentach pilotażowych VIN podawaliśmy raz w tygodniu, zgodnie z danymi literaturowymi. Ponieważ zależało nam na spowolnieniu wzrostu guza, która mogłaby wskazywać na rozwój TIS, zwierzętom podawano VIN w dawce 1.5 mg/kg. Okazało się, że zastosowane leczenie nie zahamowało wzrostu guza. U myszy nie zaobserwowano też objawów wskazujących na toksyczność zastosowanego leczenia. W związku z tym, zdecydowano o częstszym podawaniu VIN o większej sumarycznej tygodniowej dawce (maksymalnie 2.5 mg/kg). VIN podawana była codziennie przez okres 5 dni. W efekcie zmiany schematu terapii zaobserwowano wolniejszy wzrost guzów w porównaniu do eksperymentów pilotażowych. Zwiększenie dawki wiązało się jednak wystąpieniem problemów z układem trawiennym w postaci zaparc oraz wzdęć. U ludzi i innych gatunków zwierząt także obserwuje się podobne problemy z układem trawiennym [319-321]. U pacjentów, u których stosuje się VIN najczęściej występującym objawem jest neutropenia, czyli obniżenie liczby granulocytów obojętnochłonnych [319, 320, 322]. W przeprowadzonych badaniach, u myszy które zakończyły eksperyment planowo, parametry krwi nie zmieniły się w porównaniu do danych dostępnych w literaturze [231, 232]. Nie wiemy jednak jak i czy zmienione były parametry krwi zwierząt, które padły przed zakończeniem eksperymentu.

Problemy trawienne uległy złagodnieniu po obniżeniu dawki leku w drugim i trzecim tygodniu leczenia oraz po zastosowaniu środków zaradczych, takich jak 3-dniowa przerwa w terapii, czy wstępna obróbka pokarmu. W czasie nekropsji, oraz sekcji zwierząt, które padły w trakcie trwania eksperymentu zaobserwowaliśmy jednak

krwawienia wewnętrzne i przekrwienie organów. Wystąpienie krwawień może być bezpośrednim wynikiem działania VIN. Związek ten poza efektem cytotoksycznym na komórki nowotworowe, hamuje proces angiogenezy [323], oraz obniża poziom płytek we krwi [324], co może przyczyniać się do występowania krwawień u pacjentów [325]. Uważamy, że istotną kwestią jest podkreślenie wszystkich obserwacji dokonanych w czasie opisywanych eksperymentów *in vivo*. Nasze obserwacje mogą posłużyć innym zespołom próbującym opracować modele starzenia *in vivo*, do opracowania schematów terapii o niższej toksyczności, ale o wyższej skuteczności. Opracowanie takiego modelu pozwoli lepiej zrozumieć mechanikę działania choroby pod wpływem działania stosowanej terapii u pacjentów leczonych chemoterapeutykami.

HCQ nie wpłynęło na większość badanych zjawisk związanych z regulacją mikrośrodowiska guza. Zaobserwowaliśmy jednak zmiany w pojedynczych markerach autofagii, stresu oksydacyjnego oraz SASP. HCQ wpłynęło na aktywację autofagii w guzie o czym świadczył wyższy stosunek LC3II/I. Wzrost ekspresji tego białka może się wiązać z akumulacją autofagosomów, co jak wykazaliśmy w badaniach *in vitro* koreluje z ucieczką od starzenia. HCQ nie wpłynęła jednak na zmianę ekspresji markerów proliferacji i macierzystości, które mogłyby potwierdzić czy w guzach dochodziło do ucieczki od starzenia. HCQ wpłynęło jednak na tendencyjny wzrost ekspresji ciętej formy PARP-1, co może świadczyć o indukcji apoptozy. Z tymi zmianami korelowała wyższa ekspresja białka antyoksydacyjnego GPX1. Nadekspresja GpX1 może świadczyć o aktywacji odpowiedzi na stres oksydacyjny. Jedną z jego głównych funkcji w komórkach jest rozkład nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ) [326]. Satyavarapu i in. w swojej pracy opisali niezależną od aktywacji autofagii nadekspresję LC3B w wyniku stresu oksydacyjnego. Zaobserwowali oni, że generacja ROS w komórkach raka jajnika hamowała fuzję autofagosomów z lizosomami, prowadząc przy tym do śmierci komórkowej także *in vivo* [327]. Co więcej aktywacja GPX1 wiąże się z indukcją ferroptozy [328]. Ferroptoza jest formą śmierci komórkowej niezależnej od apoptozy, w której główną rolę odgrywa żelazo. Głównym czynnikiem indukującym ten rodzaj śmierci komórkowej jest nagromadzenie rodników kwasów tłuszczowych [329]. W analizach NGS przeprowadzonych na ludzkiej linii raka nerki zaobserwowano, że leczenie VIN w normoksji prowadzi do aktywacji genów związanych z ferroptozą. Aktywacja ferroptozy prowadzi do śmierci komórkowej, także komórek starych [330]. Ponadto, uważa się, że ferroptoza jest jednym z rodzajów śmierci autofagicznej [331].

Obserwacje te wskazują, że zahamowanie autofagii *in vivo* może indukować stres prowadzący do śmierci komórek nowotworowych.

Leczenie HCQ spowodowało także spadek ekspresji p16 przy równoczesne zwiększonej sekrecji cytokin IL-8 i osteopontyny. Il-8 oraz osteopontyna uznawane są za markery starzenia [332]. Ich zwiększona ekspresja po leczeniu HCQ może wskazywać, że w guzach tych osobników populacja komórek starych była większa, lub komórki stare wydzielały więcej SASP. Na podstawie analiz *in vitro* przeprowadzonych na ludzkiej linii raka nerki można przypuszczać, że wzrost ekspresji tych czynników wiązał się z ucieczką od starzenia. Nadekspresja p16 jest jednym z markerów starzenia. Uważa się, że białko to odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu fenotypu starzeniowego przez komórki [333]. Buj i in. w swoich badaniach zaobserwowali, że wyciszenie p16 prowadziło do spadku produkcji SASP w tym IL-8 i korelowało z niższym odsetkiem komórek SA- $\beta$ -Gal pozytywnych. Taką samą zależność pomiędzy p16 i SASP odnotowano w tkankach pobranych od pacjentów, ale nie wpłynęło na wielkość ognisk komórek starych [334]. W ludzkich komórkach progenitorowych sercs zaobserwowano, że genetyczne wyciszenie p16 chroniło je przed indukcją starzenia. Wyciszeniu tego genu towarzyszyła też aktywacja odpowiedzi antyoksydacyjnej, co wiązało się z produkcją ROS [335]. Można przypuszczać, że w przypadku badanego modelu raka nerki *in vivo* spadek ekspresji p16 po zahamowaniu autofagii mógł być wczesnym objawem ucieczki od starzenia. Spadek ekspresji p16 w naszym modelu *in vivo* korelował z nadekspresją białka GpX1. Można przypuszczać, że w komórkach raka nerki doszło do ucieczki od starzenia, a w procesie tym rolę mogła odgrywać odpowiedź antyoksydacyjna. W celu potwierdzenia tej hipotezy niezbędne jest wykonanie dalszych eksperymentów, które badałyby efekt HCQ w perspektywie długoterminowej.

## 10. Wnioski

Wyniki otrzymane w ramach rozprawy doktorskiej wskazują, że indukcja starzenia w raku nerki jest silnie zależna od rodzaju czynnika cytoksycznego, na które narażone są komórki. Najsilniejszy efekt pro-starzeniowy zaobserwowano po zastosowaniu winblastyny, leku powodującego blokadę podziału komórki na etapie mitozy. Przyczyniło się to generacji komórek poliploidalnych, oraz indukcji autofagii. Obecność niefunkcjonalnego pVHL nie wpływa na indukcję starzenia w wyniku działania VIN w hipoksji. Analizy NGS potwierdziły, że w komórkach traktowanych VIN dochodzi do zmiany ekspresji genów związanych z blokadą progresji cyklu komórkowego, replikacji DNA oraz destabilizacji procesu kariokinezy. Ponadto, analizy te wykazały, że pod wpływem indukcji starzenia w komórkach dochodzi do aktywacji szlaków związanych z przewodzeniem aksonów i neuroaktywnej interakcji ligand-receptor, wcześniej niezidentyfikowanych w starzeniu. Obserwacje te otwierają nowe perspektywy na prowadzenie badań, które przyczyniłyby się do lepszego zrozumienia procesu starzenia.

Zaobserwowaliśmy, że autofagia jest aktywowana w komórkach TIS. Wyciszenie pojedynczych genów autofagicznych, związanych ze wczesnymi etapami autofagii, nie wpłynęło na indukcję starzenia w wyniku działania chemoterapeutyków. Z kolei farmakologiczna inhibicja późnej autofagii z wykorzystaniem HCQ prowadziła do akumulacji komórek apoptotycznych i blokady cyklu, zarówno w komórkach traktowanych VIN jak i w komórkach nietraktowanych. Wskazuje to że HCQ nie można uważać za związek o działaniu senolitycznym. Ponadto, zahamowanie późnej autofagii promowało ucieczkę od starzenia. W hipoksji, poza spadkiem ekspresji inhibitora cyklu komórkowego p21, zaobserwowano generację komórek potomnych. W związku z tym, że komórki pozostawały zablokowane w cyklu komórkowym, co potwierdziły też analizy NGS, powstanie nowych komórek było najprawdopodobniej wynikiem podziałów amitotycznych. Wyniki sekrecji cytokin oraz analiz NGS wskazują, że kluczową rolę w tym procesie może odgrywać szlak związany z IGFBP-3, osteopontyna, aktywność lizosomalna i gospodarka lipidów, w szczególności cholesterolu, a także odpowiedź antyoksydacyjna. Zbadanie tych mechanizmów przyczyni się do lepszego zrozumienia zjawiska ucieczki od starzenia, co w perspektywie może zaowocować opracowaniem nowych strategii terapeutycznych. Ponadto, nasze podejście pozwoliło na identyfikację 67 genów, których ekspresja różniła się pomiędzy komórkami uciekającymi od starzenia hodowanymi w normoksji

a tymi w hipoksji. Geny te mogą pomóc nam zrozumieć jakie procesy są odpowiedzialne za inicjację powstania komórek potomnych. Zahamowanie autofagii w niedotlenieniu wpływa też na zwiększenie sekrecji pro-zapalnych i angiogennych czynników SASP: VEGF, IL-8 oraz osteopontyny. Wyniki te otwierają nową interesującą drogę do przeprowadzenia pogłębionych analiz i zrozumienia obrazu klinicznego zjawiska ucieczki od starzenia.

Eksperymenty *in vivo* wykazały, że zastosowanie HCQ w perspektywie krótkotrwałej terapii nie przyczynia się do zwiększenia toksyczności leczenia chemioterapeutykami, a jednocześnie nie wpływa na proliferację i cykl komórkowy w warunkach *in vivo*. Nie zmienia też ekspresji markerów związanych z procesami takimi jak: EMT, macierzystość, odpowiedź immunologiczna, czy hipoksja. Jednak analizy molekularne wykazały, że inhibicja autofagii zwiększa sekrecję czynników SASP, IL-8 oraz osteopontyny, co korelowało ze spadkiem ekspresji p16 i wzrostem ekspresji białka antyoksydacyjnego GpX1. Zmiany te sugerują, że w guzach mogło dojść do aktywacji procesów odpowiedzialnych za ucieczkę od starzenia. Wniosek ten wymaga jednak potwierdzenia poprzez przeprowadzenie badań na większej grupie badawczej przez dłuższy okres czasu.

Otrzymane wyniki wskazujące na promocję ucieczki przed starzeniem poprzez użycie HCQ stawiają zatem istotne pytania o konsekwencje leczenia chemioterapeutycznego w połączeniu z inhibitorami autofagii. Zastosowanie inhibitorów w perspektywie długoterminowej może wiązać się z większym ryzykiem wznowy choroby nowotworowej. Wskazuje to na konieczność dokładnego monitorowania pacjentów i ewaluacji, czy terapia taka, w perspektywie czasu, nie przyniosłaby więcej skutków negatywnych niż pozytywnych.

## 11. Piśmiennictwo

1. Gluba-Brzozka, A., et al., *Renal Cell Cancer and Obesity*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(6).
2. Protzel, C., M. Maruschke, and O.W. Hakenberg, *Epidemiology, Aetiology, and Pathogenesis of Renal Cell Carcinoma*. European Urology Supplements, 2012. **11**(3): p. 52-59.
3. Lázaro, M., et al., *SEOM clinical guideline for treatment of kidney cancer (2019)*. Clinical and Translational Oncology, 2020. **22**(2): p. 256-269.
4. Padala, S.A., et al., *Epidemiology of Renal Cell Carcinoma*. World J Oncol, 2020. **11**(3): p. 79-87.
5. Pandey, J. and W. Syed, *Renal Cancer*, in *StatPearls*. 2023: Treasure Island (FL).
6. Shuch, B., et al., *Understanding pathologic variants of renal cell carcinoma: distilling therapeutic opportunities from biologic complexity*. Eur Urol, 2015. **67**(1): p. 85-97.
7. Ridge, C.A., B.B. Pua, and D.C. Madoff, *Epidemiology and staging of renal cell carcinoma*. Semin Intervent Radiol, 2014. **31**(1): p. 3-8.
8. Decastro, G.J. and J.M. McKiernan, *Epidemiology, clinical staging, and presentation of renal cell carcinoma*. Urol Clin North Am, 2008. **35**(4): p. 581-92; vi.
9. Scoll, B.J., et al., *Age, tumor size and relative survival of patients with localized renal cell carcinoma: a surveillance, epidemiology and end results analysis*. J Urol, 2009. **181**(2): p. 506-11.
10. Capitanio, U. and F. Montorsi, *Renal cancer*. The Lancet, 2016. **387**(10021): p. 894-906.
11. Maher, E.R., *Hereditary renal cell carcinoma syndromes: diagnosis, surveillance and management*. World J Urol, 2018. **36**(12): p. 1891-1898.
12. Heidegger, I., A. Pircher, and R. Pichler, *Targeting the Tumor Microenvironment in Renal Cell Cancer Biology and Therapy*. Front Oncol, 2019. **9**: p. 490.
13. Wang, M., et al., *Role of tumor microenvironment in tumorigenesis*. J Cancer, 2017. **8**(5): p. 761-773.
14. Vuong, L., et al., *Tumor Microenvironment Dynamics in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma*. Cancer Discov, 2019. **9**(10): p. 1349-1357.
15. Hakimi, A.A., et al., *An Integrated Metabolic Atlas of Clear Cell Renal Cell Carcinoma*. Cancer Cell, 2016. **29**(1): p. 104-116.
16. Hsieh, J.J., et al., *Chromosome 3p Loss-Orchestrated VHL, HIF, and Epigenetic Deregulation in Clear Cell Renal Cell Carcinoma*. J Clin Oncol, 2018. **36**(36): p. Jco2018792549.
17. Mittal, K., J. Ebos, and B. Rini, *Angiogenesis and the Tumor Microenvironment: Vascular Endothelial Growth Factor and Beyond*. Seminars in Oncology, 2014. **41**(2): p. 235-251.
18. Takebe, N., et al., *Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update*. Nat Rev Clin Oncol, 2015. **12**(8): p. 445-64.
19. Noman, M.Z., et al., *Hypoxia: a key player in antitumor immune response. A Review in the Theme: Cellular Responses to Hypoxia*. Am J Physiol Cell Physiol, 2015. **309**(9): p. C569-79.
20. Şenbabaoğlu, Y., et al., *Tumor immune microenvironment characterization in clear cell renal cell carcinoma identifies prognostic and immunotherapeutically relevant messenger RNA signatures*. Genome Biol, 2016. **17**(1): p. 231.
21. Yoshihara, K., et al., *Inferring tumour purity and stromal and immune cell admixture from expression data*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2612.

22. Bamias, A., et al., *Current Clinical Practice Guidelines for the Treatment of Renal Cell Carcinoma: A Systematic Review and Critical Evaluation*. *Oncologist*, 2017. **22**(6): p. 667-679.
23. Vilaça, M., F. Braga, and A. Mesquita, *Cutaneous Metastases and Long-Term Survival of a Patient With Clear Cell Renal Carcinoma*. *Cureus*, 2022. **14**(3): p. e23598.
24. Buti, S., et al., *Chemotherapy in metastatic renal cell carcinoma today? A systematic review*. *Anticancer Drugs*, 2013. **24**(6): p. 535-54.
25. Hartmann, J.T. and C. Bokemeyer, *Chemotherapy for renal cell carcinoma*. *Anticancer Res*, 1999. **19**(2C): p. 1541-3.
26. Diamond, E., et al., *Cytotoxic chemotherapy in the treatment of advanced renal cell carcinoma in the era of targeted therapy*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2015. **96**(3): p. 518-26.
27. Dhyani, P., et al., *Anticancer potential of alkaloids: a key emphasis to colchicine, vinblastine, vincristine, vindesine, vinorelbine and vincamine*. *Cancer Cell Int*, 2022. **22**(1): p. 206.
28. Niu, N., et al., *Linking genomic reorganization to tumor initiation via the giant cell cycle*. *Oncogenesis*, 2016. **5**(12): p. e281-e281.
29. Ciccolini, J., et al., *Pharmacokinetics and pharmacogenetics of Gemcitabine as a mainstay in adult and pediatric oncology: an EORTC-PAMM perspective*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2016. **78**(1): p. 1-12.
30. Longley, D.B., D.P. Harkin, and P.G. Johnston, *5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(5): p. 330-8.
31. Zhang, N., et al., *5-Fluorouracil: mechanisms of resistance and reversal strategies*. *Molecules*, 2008. **13**(8): p. 1551-69.
32. Ghafouri-Fard, S., et al., *5-Fluorouracil: A Narrative Review on the Role of Regulatory Mechanisms in Driving Resistance to This Chemotherapeutic Agent*. *Front Oncol*, 2021. **11**: p. 658636.
33. Motzer, R.J. and P. Russo, *Systemic therapy for renal cell carcinoma*. *J Urol*, 2000. **163**(2): p. 408-17.
34. Mani, S., et al., *Phase I study to evaluate multiple regimens of intravenous 5-fluorouracil administered in combination with weekly gemcitabine in patients with advanced solid tumors: a potential broadly active regimen for advanced solid tumor malignancies*. *Cancer*, 2001. **92**(6): p. 1567-76.
35. Hemminki, O., et al., *Treatment of Advanced Renal Cell Carcinoma: Immunotherapies Have Demonstrated Overall Survival Benefits While Targeted Therapies Have Not*. *European Urology Open Science*, 2020. **22**: p. 61-73.
36. Laru, L., H. Ronkainen, and M.H. Vaarala, *Transition to Targeted Therapies Improved the Prognosis and Increased the Utilization of Medical Treatments among Patients with Synchronous Metastatic Renal Cell Cancer*. *International Journal of Surgical Oncology*, 2021. **2021**: p. 5237695.
37. Tenold, M., et al., *Current Approaches to the Treatment of Advanced or Metastatic Renal Cell Carcinoma*. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 2020(40): p. 187-196.
38. Grünwald, V., et al., *Systemic therapy in metastatic renal cell carcinoma (mRCC): an evidence-based recommendation of the German interdisciplinary RCC guidelines group*. *World Journal of Urology*, 2022. **40**(10): p. 2381-2386.
39. Sharma, R., et al., *Determinants of resistance to VEGF-TKI and immune checkpoint inhibitors in metastatic renal cell carcinoma*. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2021. **40**(1): p. 186.



40. Kroeger, N., et al., *Survival outcome and treatment response of patients with late relapse from renal cell carcinoma in the era of targeted therapy*. Eur Urol, 2014. **65**(6): p. 1086-92.
41. Li, Y., L. Zhao, and X.F. Li, *Hypoxia and the Tumor Microenvironment*. Technol Cancer Res Treat, 2021. **20**: p. 15330338211036304.
42. Muz, B., et al., *The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy*. Hypoxia (Auckl), 2015. **3**: p. 83-92.
43. Jing, X., et al., *Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment*. Molecular Cancer, 2019. **18**(1): p. 157.
44. Luo, Z., et al., *Hypoxia signaling in human health and diseases: implications and prospects for therapeutics*. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2022. **7**(1): p. 218.
45. Haase, V.H., *The VHL/HIF oxygen-sensing pathway and its relevance to kidney disease*. Kidney International, 2006. **69**(8): p. 1302-1307.
46. Dengler, V.L., M. Galbraith, and J.M. Espinosa, *Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2014. **49**(1): p. 1-15.
47. Cinque, A., et al., *The Clinical and Molecular Features in the VHL Renal Cancers; Close or Distant Relatives with Sporadic Clear Cell Renal Cell Carcinoma?* Cancers, 2022. **14**(21): p. 5352.
48. Otero-Albiol, D. and A. Carnero, *Cellular senescence or stemness: hypoxia flips the coin*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2021. **40**(1): p. 243.
49. Albadari, N., S. Deng, and W. Li, *The transcriptional factors HIF-1 and HIF-2 and their novel inhibitors in cancer therapy*. Expert Opin Drug Discov, 2019. **14**(7): p. 667-682.
50. Cowey, C.L. and W.K. Rathmell, *VHL gene mutations in renal cell carcinoma: role as a biomarker of disease outcome and drug efficacy*. Curr Oncol Rep, 2009. **11**(2): p. 94-101.
51. Akman, M., et al., *Hypoxia, endoplasmic reticulum stress and chemoresistance: dangerous liaisons*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2021. **40**(1): p. 28.
52. Cosse, J.P. and C. Michiels, *Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression*. Anticancer Agents Med Chem, 2008. **8**(7): p. 790-7.
53. Hodorová, I., et al., *Multidrug resistance proteins in renal cell carcinoma*. Folia Biol (Praha), 2008. **54**(6): p. 187-92.
54. Cordon-Cardo, C., et al., *Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues*. J Histochem Cytochem, 1990. **38**(9): p. 1277-87.
55. Murray, G.I., et al., *Cytochrome P450 CYP3A in human renal cell cancer*. Br J Cancer, 1999. **79**(11-12): p. 1836-42.
56. Bates, S.E., et al., *A phase I/II study of infusional vinblastine with the P-glycoprotein antagonist valspodar (PSC 833) in renal cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(14): p. 4724-33.
57. Yu, D.S., et al., *Verapamil modulation of multidrug resistance in renal cell carcinoma*. J Formos Med Assoc, 2000. **99**(4): p. 311-6.
58. Taylor, C.T. and S.P. Colgan, *Regulation of immunity and inflammation by hypoxia in immunological niches*. Nat Rev Immunol, 2017. **17**(12): p. 774-785.
59. Vétizou, M., et al., *Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota*. Science, 2015. **350**(6264): p. 1079-84.

60. Siemens, D.R., et al., *Hypoxia increases tumor cell shedding of MHC class I chain-related molecule: role of nitric oxide*. *Cancer Res*, 2008. **68**(12): p. 4746-53.
61. El Hafny-Rahbi, B., et al., *Tumour angiogenesis normalized by myo-inositol trispyrophosphate alleviates hypoxia in the microenvironment and promotes antitumor immune response*. *J Cell Mol Med*, 2021. **25**(7): p. 3284-3299.
62. Myszczyzyn, A., et al., *The Role of Hypoxia and Cancer Stem Cells in Renal Cell Carcinoma Pathogenesis*. *Stem Cell Rev Rep*, 2015. **11**(6): p. 919-43.
63. Polonis, K., et al., *Chronic Intermittent Hypoxia Triggers a Senescence-like Phenotype in Human White Preadipocytes*. *Scientific Reports*, 2020. **10**(1): p. 6846.
64. Ewald, J.A., et al., *Therapy-induced senescence in cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 2010. **102**(20): p. 1536-46.
65. Domen, A., et al., *Cellular senescence in cancer: clinical detection and prognostic implications*. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2022. **41**(1): p. 360.
66. Li, J., et al., *An Aging and Senescence-Related Gene Signature for Prognosis Prediction in Clear Cell Renal Cell Carcinoma*. *Front Genet*, 2022. **13**: p. 871088.
67. Basu, A., *The interplay between apoptosis and cellular senescence: Bcl-2 family proteins as targets for cancer therapy*. *Pharmacol Ther*, 2022. **230**: p. 107943.
68. He, Y., et al., *New frontiers against sorafenib resistance in renal cell carcinoma: From molecular mechanisms to predictive biomarkers*. *Pharmacol Res*, 2021. **170**: p. 105732.
69. Lilleby, W. and S.D. Fossa, *Chemotherapy in metastatic renal cell cancer*. *World J Urol*, 2005. **23**(3): p. 175-9.
70. Schödel, J., et al., *Hypoxia, Hypoxia-inducible Transcription Factors, and Renal Cancer*. *Eur Urol*, 2016. **69**(4): p. 646-657.
71. Lu, C., et al., *Comprehensive analysis of cellular senescence-related genes in the prognosis, tumor microenvironment, and immunotherapy/chemotherapy of clear cell renal cell carcinoma*. *Front Immunol*, 2022. **13**: p. 934243.
72. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. *Cell*, 2000. **100**(1): p. 57-70.
73. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
74. Hanahan, D., *Hallmarks of Cancer: New Dimensions*. *Cancer Discovery*, 2022. **12**(1): p. 31-46.
75. Truskowski, K., S.R. Amend, and K.J. Pienta, *Dormant cancer cells: programmed quiescence, senescence, or both?* *Cancer and Metastasis Reviews*, 2023. **42**(1): p. 37-47.
76. Wells, A., et al., *The dormancy dilemma: quiescence versus balanced proliferation*. *Cancer Res*, 2013. **73**(13): p. 3811-6.
77. Damen, M.P.F., J. van Rheenen, and C.L.G.J. Scheele, *Targeting dormant tumor cells to prevent cancer recurrence*. *The FEBS Journal*, 2021. **288**(21): p. 6286-6303.
78. Wang, B., J. Kohli, and M. Demaria, *Senescent Cells in Cancer Therapy: Friends or Foes?* *Trends in Cancer*, 2020. **6**(10): p. 838-857.
79. Lee, S. and C.A. Schmitt, *The dynamic nature of senescence in cancer*. *Nature Cell Biology*, 2019. **21**(1): p. 94-101.

80. Hayflick, L. and P.S. Moorhead, *The serial cultivation of human diploid cell strains*. Exp Cell Res, 1961. **25**: p. 585-621.
81. Hayflick, L., *The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains*. Exp Cell Res, 1965. **37**: p. 614-36.
82. Harley, C.B., A.B. Futcher, and C.W. Greider, *Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts*. Nature, 1990. **345**(6274): p. 458-60.
83. Allsopp, R.C. and C.B. Harley, *Evidence for a critical telomere length in senescent human fibroblasts*. Exp Cell Res, 1995. **219**(1): p. 130-6.
84. von Zglinicki, T., et al., *Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence?* Exp Cell Res, 1995. **220**(1): p. 186-93.
85. Gomez, D.E., et al., *Telomere structure and telomerase in health and disease (review)*. Int J Oncol, 2012. **41**(5): p. 1561-9.
86. Campisi, J., *The biology of replicative senescence*. Eur J Cancer, 1997. **33**(5): p. 703-9.
87. Sager, R., *Senescence as a mode of tumor suppression*. Environ Health Perspect, 1991. **93**: p. 59-62.
88. Shay, J.W. and S. Bacchetti, *A survey of telomerase activity in human cancer*. Eur J Cancer, 1997. **33**(5): p. 787-91.
89. Nabetani, A. and F. Ishikawa, *Alternative lengthening of telomeres pathway: recombination-mediated telomere maintenance mechanism in human cells*. J Biochem, 2011. **149**(1): p. 5-14.
90. Courtois-Cox, S., S.L. Jones, and K. Cichowski, *Many roads lead to oncogene-induced senescence*. Oncogene, 2008. **27**(20): p. 2801-9.
91. Yang, J., et al., *The Paradoxical Role of Cellular Senescence in Cancer*. Front Cell Dev Biol, 2021. **9**: p. 722205.
92. Guillon, J., et al., *Chemotherapy-induced senescence, an adaptive mechanism driving resistance and tumor heterogeneity*. Cell Cycle, 2019. **18**(19): p. 2385-2397.
93. Liu, X.-l., J. Ding, and L.-h. Meng, *Oncogene-induced senescence: a double edged sword in cancer*. Acta Pharmacologica Sinica, 2018. **39**(10): p. 1553-1558.
94. Kim, J.H., S.L. Brown, and M.N. Gordon, *Radiation-induced senescence: therapeutic opportunities*. Radiation Oncology, 2023. **18**(1): p. 10.
95. Wang, X., et al., *Evidence of Cisplatin-induced Senescent-like Growth Arrest in Nasopharyngeal Carcinoma Cells1*. Cancer Research, 1998. **58**(22): p. 5019-5022.
96. Chang, B.D., et al., *A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents*. Cancer Res, 1999. **59**(15): p. 3761-7.
97. Saleh, T., et al., *Therapy-Induced Senescence: An "Old" Friend Becomes the Enemy*. Cancers, 2020. **12**(4): p. 822.
98. Rayess, H., M.B. Wang, and E.S. Srivatsan, *Cellular senescence and tumor suppressor gene p16*. Int J Cancer, 2012. **130**(8): p. 1715-25.
99. Lee, M. and J.S. Lee, *Exploiting tumor cell senescence in anticancer therapy*. BMB Rep, 2014. **47**(2): p. 51-9.
100. Faheem, M.M., et al., *Convergence of therapy-induced senescence (TIS) and EMT in multistep carcinogenesis: current opinions and emerging perspectives*. Cell Death Discovery, 2020. **6**(1): p. 51.

101. Olivieri, F., et al., *DNA damage response (DDR) and senescence: shuttled inflamma-miRNAs on the stage of inflamm-aging*. *Oncotarget*, 2015. **6**(34): p. 35509-21.
102. Yamasaki, L., *Role of the RB tumor suppressor in cancer*. *Cancer Treat Res*, 2003. **115**: p. 209-39.
103. Mijit, M., et al., *Role of p53 in the Regulation of Cellular Senescence*. *Biomolecules*, 2020. **10**(3).
104. Ou, H.L., et al., *Cellular senescence in cancer: from mechanisms to detection*. *Mol Oncol*, 2021. **15**(10): p. 2634-2671.
105. Campisi, J., *Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors*. *Cell*, 2005. **120**(4): p. 513-22.
106. Blagosklonny, M.V., *Cellular senescence: when growth stimulation meets cell cycle arrest*. *Aging (Albany NY)*, 2023. **15**(4): p. 905-913.
107. Blagosklonny, M.V., *Geroconversion: irreversible step to cellular senescence*. *Cell Cycle*, 2014. **13**(23): p. 3628-35.
108. Kumari, R. and P. Jat, *Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype*. *Front Cell Dev Biol*, 2021. **9**: p. 645593.
109. Gorgoulis, V., et al., *Cellular Senescence: Defining a Path Forward*. *Cell*, 2019. **179**(4): p. 813-827.
110. González-Gualda, E., et al., *A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo*. *The FEBS Journal*, 2021. **288**(1): p. 56-80.
111. Aird, K.M. and R. Zhang, *Detection of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF)*. *Methods Mol Biol*, 2013. **965**: p. 185-96.
112. Crouch, J., et al., *Epigenetic Regulation of Cellular Senescence*. *Cells*, 2022. **11**(4).
113. Freund, A., et al., *Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker*. *Mol Biol Cell*, 2012. **23**(11): p. 2066-75.
114. Hallstrom, T.C., S. Mori, and J.R. Nevins, *An E2F1-dependent gene expression program that determines the balance between proliferation and cell death*. *Cancer Cell*, 2008. **13**(1): p. 11-22.
115. Polymenis, M. and B.K. Kennedy, *Unbalanced Growth, Senescence and Aging*. *Adv Exp Med Biol*, 2017. **1002**: p. 189-208.
116. Biran, A., et al., *Quantitative identification of senescent cells in aging and disease*. *Aging Cell*, 2017. **16**(4): p. 661-671.
117. Beck, J., I. Horikawa, and C. Harris, *Cellular Senescence: Mechanisms, Morphology, and Mouse Models*. *Vet Pathol*, 2020. **57**(6): p. 747-757.
118. Kwon, S.M., et al., *Metabolic features and regulation in cell senescence*. *BMB Rep*, 2019. **52**(1): p. 5-12.
119. Yang, N.C. and M.L. Hu, *The limitations and validities of senescence associated-beta-galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells*. *Exp Gerontol*, 2005. **40**(10): p. 813-9.
120. Summer, R., et al., *Activation of the mTORC1/PGC-1 axis promotes mitochondrial biogenesis and induces cellular senescence in the lung epithelium*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2019. **316**(6): p. L1049-11060.
121. Birch, J. and J. Gil, *Senescence and the SASP: many therapeutic avenues*. *Genes Dev*, 2020. **34**(23-24): p. 1565-1576.
122. Park, S.S., et al., *Senescent tumor cells: an overlooked adversary in the battle against cancer*. *Experimental & Molecular Medicine*, 2021. **53**(12): p. 1834-1841.

123. Cuollo, L., et al., *The Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) in the Challenging Future of Cancer Therapy and Age-Related Diseases*. Biology (Basel), 2020. **9**(12).
124. Kwon, Y., et al., *Autophagy Is Pro-Senescence When Seen in Close-Up, but Anti-Senescence in Long-Shot*. Mol Cells, 2017. **40**(9): p. 607-612.
125. Lasry, A. and Y. Ben-Neriah, *Senescence-associated inflammatory responses: aging and cancer perspectives*. Trends Immunol, 2015. **36**(4): p. 217-28.
126. Takasugi, M., et al., *The role of cellular senescence and SASP in tumour microenvironment*. FEBS J, 2023. **290**(5): p. 1348-1361.
127. Babaei, G., S.G. Aziz, and N.Z.Z. Jaghi, *EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis*. Biomed Pharmacother, 2021. **133**: p. 110909.
128. Battle, E. and H. Clevers, *Cancer stem cells revisited*. Nat Med, 2017. **23**(10): p. 1124-1134.
129. Desai, A., Y. Yan, and S.L. Gerson, *Concise Reviews: Cancer Stem Cell Targeted Therapies: Toward Clinical Success*. Stem Cells Transl Med, 2019. **8**(1): p. 75-81.
130. Walcher, L., et al., *Cancer Stem Cells-Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 1280.
131. Milanovic, M., et al., *Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness*. Nature, 2018. **553**(7686): p. 96-100.
132. Gupta, P.B., et al., *Phenotypic Plasticity: Driver of Cancer Initiation, Progression, and Therapy Resistance*. Cell Stem Cell, 2019. **24**(1): p. 65-78.
133. Canino, C., et al., *SASP mediates chemoresistance and tumor-initiating-activity of mesothelioma cells*. Oncogene, 2012. **31**(26): p. 3148-3163.
134. Was, H., et al., *Some chemotherapeutics-treated colon cancer cells display a specific phenotype being a combination of stem-like and senescent cell features*. Cancer Biol Ther, 2018. **19**(1): p. 63-75.
135. Was, H., et al., *Bafilomycin A1 triggers proliferative potential of senescent cancer cells in vitro and in NOD/SCID mice*. Oncotarget, 2017. **8**(6): p. 9303-9322.
136. Huna, A., et al., *Role of stress-activated OCT4A in the cell fate decisions of embryonal carcinoma cells treated with etoposide*. Cell Cycle, 2015. **14**(18): p. 2969-84.
137. Gerashchenko, B.I., et al., *Disentangling the aneuploidy and senescence paradoxes: a study of triploid breast cancers non-responsive to neoadjuvant therapy*. Histochem Cell Biol, 2016. **145**(4): p. 497-508.
138. Dou, Z. and S.L. Berger, *Senescence Elicits Stemness: A Surprising Mechanism for Cancer Relapse*. Cell Metab, 2018. **27**(4): p. 710-711.
139. Medema, J.P., *Escape from senescence boosts tumour growth*. Nature, 2018. **553**(7686): p. 37-38.
140. Collado, M., M.A. Blasco, and M. Serrano, *Cellular senescence in cancer and aging*. Cell, 2007. **130**(2): p. 223-33.
141. Serrano, M., et al., *Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a*. Cell, 1997. **88**(5): p. 593-602.
142. Pluquet, O., C. Abbadie, and O. Coqueret, *Connecting cancer relapse with senescence*. Cancer Lett, 2019. **463**: p. 50-58.
143. Jonchère, B., et al., *Irinotecan treatment and senescence failure promote the emergence of more transformed and invasive cells that depend on anti-apoptotic Mcl-1*. Oncotarget, 2014. **6**(1).

144. Puig, P.-E., et al., *Tumor cells can escape DNA-damaging cisplatin through DNA endoreduplication and reversible polyploidy*. Cell Biology International, 2008. **32**(9): p. 1031-1043.
145. Mosieniak, G., et al., *Polyploidy Formation in Doxorubicin-Treated Cancer Cells Can Favor Escape from Senescence*. Neoplasia, 2015. **17**(12): p. 882-893.
146. Elmore, L.W., et al., *Evasion of a Single-Step, Chemotherapy-Induced Senescence in Breast Cancer Cells: Implications for Treatment Response*. Clinical Cancer Research, 2005. **11**(7): p. 2637-2643.
147. De Blander, H., et al., *Cellular Plasticity: A Route to Senescence Exit and Tumorigenesis*. Cancers (Basel), 2021. **13**(18).
148. Rajaraman, R., et al., *Neosis--a paradigm of self-renewal in cancer*. Cell Biol Int, 2005. **29**(12): p. 1084-97.
149. Was, H., et al., *Polyploidy formation in cancer cells: How a Trojan horse is born*. Seminars in Cancer Biology, 2022. **81**: p. 24-36.
150. Gordon, D.J., B. Resio, and D. Pellman, *Causes and consequences of aneuploidy in cancer*. Nat Rev Genet, 2012. **13**(3): p. 189-203.
151. Saleh, T., et al., *Targeting tumor cell senescence and polyploidy as potential therapeutic strategies*. Semin Cancer Biol, 2022. **81**: p. 37-47.
152. Rajaraman, R., et al., *Stem cells, senescence, neosis and self-renewal in cancer*. Cancer Cell Int, 2006. **6**: p. 25.
153. Ianzini, F., et al., *Activation of meiosis-specific genes is associated with depolyploidization of human tumor cells following radiation-induced mitotic catastrophe*. Cancer Res, 2009. **69**(6): p. 2296-304.
154. Salmina, K., et al., *"Mitotic Slippage" and Extranuclear DNA in Cancer Chemoresistance: A Focus on Telomeres*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(8).
155. Song, Y., et al., *Stress-Induced Polyploid Giant Cancer Cells: Unique Way of Formation and Non-Negligible Characteristics*. Front Oncol, 2021. **11**: p. 724781.
156. Erenpreisa, J., et al., *Polyploid tumour cells elicit paradiploid progeny through depolyploidizing divisions and regulated autophagic degradation*. Cell Biol Int, 2011. **35**(7): p. 687-95.
157. Dudkowska, M., et al., *The role of autophagy in escaping therapy-induced polyploidy/senescence*. Adv Cancer Res, 2021. **150**: p. 209-247.
158. Gasek, N.S., et al., *Strategies for targeting senescent cells in human disease*. Nature Aging, 2021. **1**(10): p. 870-879.
159. Bousset, L. and J. Gil, *Targeting senescence as an anticancer therapy*. Molecular Oncology, 2022. **16**(21): p. 3855-3880.
160. Tchkonina, T., et al., *Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities*. J Clin Invest, 2013. **123**(3): p. 966-72.
161. Xu, M., T. Tchkonina, and J.L. Kirkland, *Perspective: Targeting the JAK/STAT pathway to fight age-related dysfunction*. Pharmacol Res, 2016. **111**: p. 152-154.
162. Zhu, Y., et al., *The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs*. Aging Cell, 2015. **14**(4): p. 644-58.
163. Wang, E., *Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved*. Cancer Res, 1995. **55**(11): p. 2284-92.
164. Zhu, Y., et al., *New agents that target senescent cells: the flavone, fisetin, and the BCL-X(L) inhibitors, A1331852 and A1155463*. Aging (Albany NY), 2017. **9**(3): p. 955-963.
165. Zhu, Y., et al., *Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors*. Aging Cell, 2016. **15**(3): p. 428-35.

166. Wilson, W.H., et al., *Navitoclax, a targeted high-affinity inhibitor of BCL-2, in lymphoid malignancies: a phase I dose-escalation study of safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumour activity*. *Lancet Oncol*, 2010. **11**(12): p. 1149-59.
167. Afreen, S., et al., *BCL-XL expression is essential for human erythropoiesis and engraftment of hematopoietic stem cells*. *Cell Death Dis*, 2020. **11**(1): p. 8.
168. Chaib, S., T. Tchkonja, and J.L. Kirkland, *Cellular senescence and senolytics: the path to the clinic*. *Nature Medicine*, 2022. **28**(8): p. 1556-1568.
169. Dörr, J.R., et al., *Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy*. *Nature*, 2013. **501**(7467): p. 421-5.
170. Yun, C.W. and S.H. Lee, *The Roles of Autophagy in Cancer*. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(11).
171. Lu, G., et al., *Autophagy in health and disease: From molecular mechanisms to therapeutic target*. *MedComm*, 2022. **3**(3): p. e150.
172. Jung, S., H. Jeong, and S.-W. Yu, *Autophagy as a decisive process for cell death*. *Experimental & Molecular Medicine*, 2020. **52**(6): p. 921-930.
173. Gewirtz, D.A., *Autophagy and senescence*. *Autophagy*, 2013. **9**(5): p. 808-812.
174. Gewirtz, D.A., *Autophagy and senescence in cancer therapy*. *J Cell Physiol*, 2014. **229**(1): p. 6-9.
175. Mulcahy Levy, J.M. and A. Thorburn, *Autophagy in cancer: moving from understanding mechanism to improving therapy responses in patients*. *Cell Death & Differentiation*, 2020. **27**(3): p. 843-857.
176. Alers, S., et al., *Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks*. *Mol Cell Biol*, 2012. **32**(1): p. 2-11.
177. Debnath, J., N. Gammoh, and K.M. Ryan, *Autophagy and autophagy-related pathways in cancer*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2023.
178. Badadani, M., *Autophagy Mechanism, Regulation, Functions, and Disorders*. *ISRN Cell Biology*, 2012. **2012**: p. 927064.
179. Kumar, A.V., J. Mills, and L.R. Lapierre, *Selective Autophagy Receptor p62/SQSTM1, a Pivotal Player in Stress and Aging*. *Front Cell Dev Biol*, 2022. **10**: p. 793328.
180. Zaffagnini, G., et al., *p62 filaments capture and present ubiquitinated cargos for autophagy*. *Embo j*, 2018. **37**(5).
181. Yu, L., Y. Chen, and S.A. Tooze, *Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms*. *Autophagy*, 2018. **14**(2): p. 207-215.
182. Das, G., B.V. Shrivastava, and E.H. Baehrecke, *Regulation and function of autophagy during cell survival and cell death*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012. **4**(6).
183. Loos, B., A. du Toit, and J.H. Hofmeyr, *Defining and measuring autophagosome flux-concept and reality*. *Autophagy*, 2014. **10**(11): p. 2087-96.
184. Ueno, T. and M. Komatsu, *Monitoring Autophagy Flux and Activity: Principles and Applications*. *Bioessays*, 2020. **42**(11): p. e2000122.
185. Yun, H., et al., *Assessing Rheumatoid Arthritis Disease Activity With Patient-Reported Outcomes Measurement Information System Measures Using Digital Technology*. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2020. **72**(4): p. 553-560.
186. Sharma, K., et al., *Cytotoxic autophagy in cancer therapy*. *Int J Mol Sci*, 2014. **15**(6): p. 10034-51.
187. Bishop, E. and T.D. Bradshaw, *Autophagy modulation: a prudent approach in cancer treatment?* *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2018. **82**(6): p. 913-922.

188. Turcotte, S., et al., *A molecule targeting VHL-deficient renal cell carcinoma that induces autophagy*. *Cancer Cell*, 2008. **14**(1): p. 90-102.
189. Anbalagan, S., et al., *Radiosensitization of renal cell carcinoma in vitro through the induction of autophagy*. *Radiother Oncol*, 2012. **103**(3): p. 388-93.
190. Liu, D., et al., *Inhibition of autophagy by 3-MA potentiates cisplatin-induced apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells*. *Medical Oncology*, 2011. **28**(1): p. 105-111.
191. Chude, C.I. and R.K. Amaravadi, *Targeting Autophagy in Cancer: Update on Clinical Trials and Novel Inhibitors*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(6).
192. Marinkovic, M., et al., *Autophagy Modulation in Cancer: Current Knowledge on Action and Therapy*. *Oxid Med Cell Longev*, 2018. **2018**: p. 8023821.
193. Santos-de-Frutos, K. and N. Djouder, *When dormancy fuels tumour relapse*. *Communications Biology*, 2021. **4**(1): p. 747.
194. Rehman, S.K., et al., *Colorectal Cancer Cells Enter a Diapause-like DTP State to Survive Chemotherapy*. *Cell*, 2021. **184**(1): p. 226-242 e21.
195. Nogueira-Recalde, U., et al., *Fibrates as drugs with senolytic and autophagic activity for osteoarthritis therapy*. *EBioMedicine*, 2019. **45**: p. 588-605.
196. Bharath, L.P., et al., *Metformin Enhances Autophagy and Normalizes Mitochondrial Function to Alleviate Aging-Associated Inflammation*. *Cell Metab*, 2020. **32**(1): p. 44-55.e6.
197. Kucheryavenko, O., et al., *The mTORC1-autophagy pathway is a target for senescent cell elimination*. *Biogerontology*, 2019. **20**(3): p. 331-335.
198. Erenpreisa, J., et al., *Macroautophagy-aided elimination of chromatin*. *Autophagy*, 2012. **8**(12): p. 1877-1881.
199. Olszewska, A., et al., *Escape From Cisplatin-Induced Senescence of Hypoxic Lung Cancer Cells Can Be Overcome by Hydroxychloroquine*. *Front Oncol*, 2021. **11**: p. 738385.
200. Dimri, G.P., et al., *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(20): p. 9363-7.
201. Zhitomirsky, B., H. Farber, and Y.G. Assaraf, *LysoTracker and MitoTracker Red are transport substrates of P-glycoprotein: implications for anticancer drug design evading multidrug resistance*. *J Cell Mol Med*, 2018. **22**(4): p. 2131-2141.
202. Maxwell, P.H., et al., *The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis*. *Nature*, 1999. **399**(6733): p. 271-5.
203. Schokrpur, S., et al., *CRISPR-Mediated VHL Knockout Generates an Improved Model for Metastatic Renal Cell Carcinoma*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 29032.
204. Campisi, J., *Chapter 16 - Cellular Senescence*, in *The Molecular Basis of Cancer (Third Edition)*, J. Mendelsohn, et al., Editors. 2008, W.B. Saunders: Philadelphia. p. 221-228.
205. Giacinti, C. and A. Giordano, *RB and cell cycle progression*. *Oncogene*, 2006. **25**(38): p. 5220-5227.
206. Morgan, D.O., *The cell cycle: principles of control*. 2007: New science press.
207. Engeland, K., *Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling*. *Cell Death & Differentiation*, 2022. **29**(5): p. 946-960.
208. Brandmaier, A., S.Q. Hou, and W.H. Shen, *Cell Cycle Control by PTEN*. *J Mol Biol*, 2017. **429**(15): p. 2265-2277.
209. Wilkinson, R.D.A., et al., *Cathepsin S: therapeutic, diagnostic, and prognostic potential*. *Biological Chemistry*, 2015. **396**(8): p. 867-882.



210. Runwal, G., et al., *LC3-positive structures are prominent in autophagy-deficient cells*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 10147.
211. Mizushima, N. and T. Yoshimori, *How to interpret LC3 immunoblotting*. *Autophagy*, 2007. **3**(6): p. 542-5.
212. Liu, W.J., et al., *p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation*. *Cell Mol Biol Lett*, 2016. **21**: p. 29.
213. Blommaert, E.F., et al., *Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(5): p. 2320-6.
214. Bojko, A., et al., *Improved Autophagic Flux in Escapers from Doxorubicin-Induced Senescence/Polyploidy of Breast Cancer Cells*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(17).
215. Abdel-Aziz, A.K., et al., *A Critical Review of Chloroquine and Hydroxychloroquine as Potential Adjuvant Agents for Treating People with Cancer*. *Future Pharmacology*, 2022. **2**(4): p. 431-443.
216. Schrezenmeier, E. and T. Dörner, *Mechanisms of action of hydroxychloroquine and chloroquine: implications for rheumatology*. *Nature Reviews Rheumatology*, 2020. **16**(3): p. 155-166.
217. Wang, R., et al., *Molecular basis of V-ATPase inhibition by bafilomycin A1*. *Nat Commun*, 2021. **12**(1): p. 1782.
218. Tripathi, G., et al., *Chapter 10 - Combined targeting autophagy and metabolism for cancer therapy*, in *Autophagy and Metabolism*, D. Kumar and S. Asthana, Editors. 2022, Academic Press. p. 215-238.
219. Xu, R., et al., *The clinical value of using chloroquine or hydroxychloroquine as autophagy inhibitors in the treatment of cancers: A systematic review and meta-analysis*. *Medicine (Baltimore)*, 2018. **97**(46): p. e12912.
220. Shippey, E.A., V.D. Wagler, and A.N. Collamer, *Hydroxychloroquine: An old drug with new relevance*. *Cleve Clin J Med*, 2018. **85**(6): p. 459-467.
221. Karasic, T.B., et al., *Effect of Gemcitabine and nab-Paclitaxel With or Without Hydroxychloroquine on Patients With Advanced Pancreatic Cancer: A Phase 2 Randomized Clinical Trial*. *JAMA Oncol*, 2019. **5**(7): p. 993-998.
222. Jekaterina, E., S. Kristine, and C. Mark Steven, *Accelerated Senescence of Cancer Stem Cells: A Failure to Thrive or a Route to Survival?*, in *Senescence*, D. Jolanta and K. Wojciech, Editors. 2017, IntechOpen: Rijeka. p. Ch. 4.
223. Gschwind, A., et al., *Tight association of autophagy and cell cycle in leukemia cells*. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2022. **27**(1): p. 32.
224. Mauthe, M., et al., *Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion*. *Autophagy*, 2018. **14**(8): p. 1435-1455.
225. Yang, M., et al., *Cathepsin S-mediated autophagic flux in tumor-associated macrophages accelerate tumor development by promoting M2 polarization*. *Mol Cancer*, 2014. **13**: p. 43.
226. Kang, C. and S.J. Elledge, *How autophagy both activates and inhibits cellular senescence*. *Autophagy*, 2016. **12**(5): p. 898-9.
227. Pastorekova, S. and R.J. Gillies, *The role of carbonic anhydrase IX in cancer development: links to hypoxia, acidosis, and beyond*. *Cancer Metastasis Rev*, 2019. **38**(1-2): p. 65-77.
228. El-Galley, R., T.E. Keane, and C. Sun, *Camptothecin analogues and vinblastine in the treatment of renal cell carcinoma: an in vivo study using a human orthotopic renal cancer xenograft*. *Urol Oncol*, 2003. **21**(1): p. 49-57.

229. Sato, H., et al., *Connexin 32 potentiates vinblastine-induced cytotoxicity in renal cell carcinoma cells*. Mol Carcinog, 2007. **46**(3): p. 215-24.
230. Otto, U., et al., *Transplantation of Human Renal Cell Carcinoma Into NMRI NU/NU Mice. II. Evaluation of Response to Vinblastine Sulfate Monotherapy*. The Journal of Urology, 1984. **131**(1): p. 134-138.
231. Silva-Santana, G., et al., *Clinical hematological and biochemical parameters in Swiss, BALB/c, C57BL/6 and B6D2F1 Mus musculus*. Animal Model Exp Med, 2020. **3**(4): p. 304-315.
232. *BALB/C Mouse Hematology - Charles River Laboratories*. 2012 [cited 2023 06.2023]; Available from: [https://www.criver.com/sites/default/files/resources/doc\\_a/BALBcMouseClinicalPathologyData.pdf](https://www.criver.com/sites/default/files/resources/doc_a/BALBcMouseClinicalPathologyData.pdf).
233. Sullivan, R., et al., *Hypoxia-induced resistance to anticancer drugs is associated with decreased senescence and requires hypoxia-inducible factor-1 activity*. Mol Cancer Ther, 2008. **7**(7): p. 1961-73.
234. Zhou, P., et al., *Comprehensive Analysis of Senescence Characteristics Defines a Novel Prognostic Signature to Guide Personalized Treatment for Clear Cell Renal Cell Carcinoma*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 901671.
235. Wang, Q., et al., *Polyploidy road to therapy-induced cellular senescence and escape*. International Journal of Cancer, 2013. **132**(7): p. 1505-1515.
236. Aqbi, H.F., et al., *Autophagy-deficient breast cancer shows early tumor recurrence and escape from dormancy*. Oncotarget, 2018. **9**(31): p. 22113-22122.
237. Khil, L.Y., et al., *Effects of brazilin on GLUT4 recruitment in isolated rat epididymal adipocytes*. Biochem Pharmacol, 1999. **58**(11): p. 1705-12.
238. Ngan, V.K., et al., *Mechanism of Mitotic Block and Inhibition of Cell Proliferation by the Semisynthetic *Vinca* Alkaloids Vinorelbine and Its Newer Derivative Vinflunine*. Molecular Pharmacology, 2001. **60**(1): p. 225-232.
239. Jordan, M.A. and L. Wilson, *Microtubules as a target for anticancer drugs*. Nature Reviews Cancer, 2004. **4**(4): p. 253-265.
240. Fu, J., et al., *Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis*. Mol Cancer Res, 2007. **5**(1): p. 1-10.
241. Iliaki, S., R. Beyaert, and I.S. Afonina, *Polo-like kinase 1 (PLK1) signaling in cancer and beyond*. Biochem Pharmacol, 2021. **193**: p. 114747.
242. Willems, E., et al., *The functional diversity of Aurora kinases: a comprehensive review*. Cell Division, 2018. **13**(1): p. 7.
243. Driscoll, D.L., et al., *Plk1 inhibition causes post-mitotic DNA damage and senescence in a range of human tumor cell lines*. PLoS One, 2014. **9**(11): p. e111060.
244. Chang, B.D., et al., *Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs*. Oncogene, 1999. **18**(34): p. 4808-18.
245. Huck, J.J., et al., *MLN8054, an inhibitor of Aurora A kinase, induces senescence in human tumor cells both in vitro and in vivo*. Mol Cancer Res, 2010. **8**(3): p. 373-84.
246. Klein, L.E., et al., *The microtubule stabilizing agent discodermolide is a potent inducer of accelerated cell senescence*. Cell Cycle, 2005. **4**(3): p. 501-7.

247. Nakayama, Y. and T. Inoue, *Antiproliferative Fate of the Tetraploid Formed after Mitotic Slippage and Its Promotion; A Novel Target for Cancer Therapy Based on Microtubule Poisons*. *Molecules*, 2016. **21**(5): p. 663.
248. Bene, A. and T.C. Chambers, *p21 functions in a post-mitotic block checkpoint in the apoptotic response to vinblastine*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **380**(2): p. 211-7.
249. Tagal, V. and M.G. Roth, *Loss of Aurora Kinase Signaling Allows Lung Cancer Cells to Adopt Endoreplication and Form Polyploid Giant Cancer Cells That Resist Antimitotic Drugs*. *Cancer Res*, 2021. **81**(2): p. 400-413.
250. Liu, Y., et al., *Targeting aurora kinases limits tumour growth through DNA damage-mediated senescence and blockade of NF- $\kappa$ B impairs this drug-induced senescence*. *EMBO Mol Med*, 2013. **5**(1): p. 149-66.
251. GUO, X., et al., *Cell Cycle Perturbation and Acquired 5-Fluorouracil Chemoresistance*. *Anticancer Research*, 2008. **28**(1A): p. 9-14.
252. Bojko, A., et al., *Diversity of the Senescence Phenotype of Cancer Cells Treated with Chemotherapeutic Agents*. *Cells*, 2019. **8**(12).
253. Kim, W.Y. and W.G. Kaelin, *Role of VHL gene mutation in human cancer*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(24): p. 4991-5004.
254. Russell, S., et al., *Chapter 4 - Pseudohypoxia: Life at the Edge*, in *Ecology and Evolution of Cancer*, B. Ujvari, B. Roche, and F. Thomas, Editors. 2017, Academic Press. p. 57-68.
255. Hayashi, Y., et al., *Hypoxia/pseudohypoxia-mediated activation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in cancer*. *Cancer Sci*, 2019. **110**(5): p. 1510-1517.
256. Warren, H.R. and M. Hejmadi, *Effect of hypoxia on chemosensitivity to 5-fluorouracil in SH-SY5Y neuroblastoma cells*. *Bioscience Horizons: The International Journal of Student Research*, 2016. **9**.
257. Kim, H.G., et al., *Quinacrine-Mediated Inhibition of Nrf2 Reverses Hypoxia-Induced 5-Fluorouracil Resistance in Colorectal Cancer*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(18).
258. Li, J.Q., et al., *Hypoxia induces universal but differential drug resistance and impairs anticancer mechanisms of 5-fluorouracil in hepatoma cells*. *Acta Pharmacol Sin*, 2017. **38**(12): p. 1642-1654.
259. GOTO, T., et al., *Expression Levels of Thymidylate Synthase, Dihydropyrimidine Dehydrogenase, and Thymidine Phosphorylase in Patients with Colorectal Cancer*. *Anticancer Research*, 2012. **32**(5): p. 1757-1762.
260. Wang, G.L., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(12): p. 5510-4.
261. Welford, S.M., et al., *HIF1 $\alpha$  delays premature senescence through the activation of MIF*. *Genes Dev*, 2006. **20**(24): p. 3366-71.
262. Rohwer, N., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  determines gastric cancer chemosensitivity via modulation of p53 and NF- $\kappa$ B*. *PLoS One*, 2010. **5**(8): p. e12038.
263. Culver, C., et al., *HIF-1 $\alpha$  depletion results in SP1-mediated cell cycle disruption and alters the cellular response to chemotherapeutic drugs*. *Cell Cycle*, 2011. **10**(8): p. 1249-60.
264. Parrinello, S., et al., *Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts*. *Nat Cell Biol*, 2003. **5**(8): p. 741-7.

265. Tsai, C.C., et al., *Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST*. *Blood*, 2011. **117**(2): p. 459-69.
266. Chédotal, A., G. Kerjan, and C. Moreau-Fauvarque, *The brain within the tumor: new roles for axon guidance molecules in cancers*. *Cell Death & Differentiation*, 2005. **12**(8): p. 1044-1056.
267. Jiang, Z., et al., *Targeting the SLIT/ROBO pathway in tumor progression: molecular mechanisms and therapeutic perspectives*. *Ther Adv Med Oncol*, 2019. **11**: p. 1758835919855238.
268. Harburg, G., et al., *SLIT/ROBO2 signaling promotes mammary stem cell senescence by inhibiting Wnt signaling*. *Stem Cell Reports*, 2014. **3**(3): p. 385-93.
269. Gara, R.K., et al., *Slit/Robo pathway: a promising therapeutic target for cancer*. *Drug Discov Today*, 2015. **20**(1): p. 156-64.
270. Mastrantonio, R., H. You, and L. Tamagnone, *Semaphorins as emerging clinical biomarkers and therapeutic targets in cancer*. *Theranostics*, 2021. **11**(7): p. 3262-3277.
271. Dhanabal, M., et al., *Recombinant semaphorin 6A-1 ectodomain inhibits in vivo growth factor and tumor cell line-induced angiogenesis*. *Cancer Biol Ther*, 2005. **4**(6): p. 659-68.
272. Liu, H., et al., *Identifying mRNA targets of microRNA dysregulated in cancer: with application to clear cell Renal Cell Carcinoma*. *BMC Syst Biol*, 2010. **4**: p. 51.
273. Szenajch, J., et al., *Transcriptome Remodeling in Gradual Development of Inverse Resistance between Paclitaxel and Cisplatin in Ovarian Cancer Cells*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(23).
274. Kirkland, J.L. and T. Tchkonja, *Senolytic drugs: from discovery to translation*. *J Intern Med*, 2020. **288**(5): p. 518-536.
275. Punnonen, E.-L. and H. Reunanen, *Effects of vinblastine, leucine, and histidine, and 3-methyladenine on autophagy in ehrlich ascites cells*. *Experimental and Molecular Pathology*, 1990. **52**(1): p. 87-97.
276. Krøl, T., et al., *Vinblastine-induced autophagy in mouse liver*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 1994. **107**(1): p. 165-169.
277. Köchl, R., et al., *Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes*. *Traffic*, 2006. **7**(2): p. 129-45.
278. Tian, Y.-T., et al., *Autophagy regulates X-ray radiation-induced premature senescence through STAT3-Beclin1-p62 pathway in lung adenocarcinoma cells*. *International Journal of Radiation Biology*, 2022. **98**(9): p. 1432-1441.
279. Deleyto-Seldas, N. and A. Efeyan, *The mTOR-Autophagy Axis and the Control of Metabolism*. *Front Cell Dev Biol*, 2021. **9**: p. 655731.
280. Lerner, C., et al., *Reduced mammalian target of rapamycin activity facilitates mitochondrial retrograde signaling and increases life span in normal human fibroblasts*. *Aging Cell*, 2013. **12**(6): p. 966-77.
281. Duran, A., et al., *p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway*. *Mol Cell*, 2011. **44**(1): p. 134-46.
282. Kang, H.T., et al., *Autophagy impairment induces premature senescence in primary human fibroblasts*. *PLoS One*, 2011. **6**(8): p. e23367.

283. Huang, Y.H., et al., *Autophagy promotes radiation-induced senescence but inhibits bystander effects in human breast cancer cells*. *Autophagy*, 2014. **10**(7): p. 1212-28.
284. Saleh, T., et al., *Studies of Non-Protective Autophagy Provide Evidence that Recovery from Therapy-Induced Senescence is Independent of Early Autophagy*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(4).
285. Goehle, R.W., et al., *The autophagy-senescence connection in chemotherapy: must tumor cells (self) eat before they sleep?* *J Pharmacol Exp Ther*, 2012. **343**(3): p. 763-78.
286. Xu, T., et al., *Distinct requirements of Autophagy-related genes in programmed cell death*. *Cell Death & Differentiation*, 2015. **22**(11): p. 1792-1802.
287. L'Hôte, V., et al., *Ouabain and chloroquine trigger senolysis of BRAF-V600E-induced senescent cells by targeting autophagy*. *Aging Cell*, 2021. **20**(9): p. e13447.
288. McNeal, A.S., et al., *BRAF(V600E) induces reversible mitotic arrest in human melanocytes via microRNA-mediated suppression of AURKB*. *Elife*, 2021. **10**.
289. Niu, N., I. Mercado-Uribe, and J. Liu, *Dedifferentiation into blastomere-like cancer stem cells via formation of polyploid giant cancer cells*. *Oncogene*, 2017. **36**(34): p. 4887-4900.
290. Jiang, Q., et al., *A Fraction of CD133+ CNE2 Cells Is Made of Giant Cancer Cells with Morphological Evidence of Asymmetric Mitosis*. *J Cancer*, 2015. **6**(12): p. 1236-44.
291. Wheatley, D., *Growing evidence of the repopulation of regressed tumours by the division of giant cells*. *Cell Biol Int*, 2008. **32**(9): p. 1029-30.
292. Almacellas, E., et al., *Lysosomal degradation ensures accurate chromosomal segregation to prevent chromosomal instability*. *Autophagy*, 2021. **17**(3): p. 796-813.
293. White-Gilbertson, S., et al., *Genetic and pharmacological inhibition of acid ceramidase prevents asymmetric cell division by neosis*. *J Lipid Res*, 2019. **60**(7): p. 1225-1235.
294. Fu, J., et al., *Research Progress of Bile Acids in Cancer*. *Front Oncol*, 2021. **11**: p. 778258.
295. Hamsanathan, S. and A.U. Gurkar, *Lipids as Regulators of Cellular Senescence*. *Front Physiol*, 2022. **13**: p. 796850.
296. Kim, K.S., et al., *Regulation of replicative senescence by insulin-like growth factor-binding protein 3 in human umbilical vein endothelial cells*. *Aging Cell*, 2007. **6**(4): p. 535-545.
297. Grkovic, S., et al., *IGFBP-3 binds GRP78, stimulates autophagy and promotes the survival of breast cancer cells exposed to adverse microenvironments*. *Oncogene*, 2013. **32**(19): p. 2412-2420.
298. Budzik, M.P. and A.M. Badowska-Kozakiewicz, *The multidirectional role of osteopontin in cancer*. *Nowotwory. Journal of Oncology*, 2018. **68**(4): p. 176-183.
299. Papworth, K., et al., *Osteopontin but not parathyroid hormone-related protein predicts prognosis in human renal cell carcinoma*. *Acta Oncol*, 2013. **52**(1): p. 159-65.
300. Matusan, K., et al., *Osteopontin expression correlates with prognostic variables and survival in clear cell renal cell carcinoma*. *Journal of Surgical Oncology*, 2006. **94**(4): p. 325-331.

301. Nallasamy, P., et al., *Pancreatic Tumor Microenvironment Factor Promotes Cancer Stemness via SPP1-CD44 Axis*. *Gastroenterology*, 2021. **161**(6): p. 1998-2013.e7.
302. Qian, J., et al., *Cancer-associated mesothelial cells promote ovarian cancer chemoresistance through paracrine osteopontin signaling*. *J Clin Invest*, 2021. **131**(16).
303. Lamour, V., et al., *Targeting osteopontin suppresses glioblastoma stem-like cell character and tumorigenicity in vivo*. *Int J Cancer*, 2015. **137**(5): p. 1047-57.
304. Liu, G., et al., *Osteopontin induces autophagy to promote chemo-resistance in human hepatocellular carcinoma cells*. *Cancer Letters*, 2016. **383**(2): p. 171-182.
305. Cao, L., et al., *Osteopontin promotes a cancer stem cell-like phenotype in hepatocellular carcinoma cells via an integrin-NF- $\kappa$ B-HIF-1 $\alpha$  pathway*. *Oncotarget*, 2015. **6**(9): p. 6627-40.
306. Chien, Y., et al., *Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- $\kappa$ B promotes senescence and enhances chemosensitivity*. *Genes Dev*, 2011. **25**(20): p. 2125-36.
307. Zakaria, N., et al., *Inhibition of NF- $\kappa$ B Signaling Reduces the Stemness Characteristics of Lung Cancer Stem Cells*. *Front Oncol*, 2018. **8**: p. 166.
308. Wang, L., et al., *NF- $\kappa$ B maintains the stemness of colon cancer cells by downregulating miR-195-5p/497-5p and upregulating MCM2*. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2020. **39**(1): p. 225.
309. Borkowska, A., et al., *High Hemin Concentration Induces Escape from Senescence of Normoxic and Hypoxic Colon Cancer Cells*. *Cancers (Basel)*, 2022. **14**(19).
310. Qian, X., et al., *Link between cardiac function and the antioxidative defense mechanism in aged rats*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019. **513**(4): p. 1100-1105.
311. Pósa, A., et al., *Endogenous Estrogen-Mediated Heme Oxygenase Regulation in Experimental Menopause*. *Oxid Med Cell Longev*, 2015. **2015**: p. 429713.
312. Roh, M., R. van der Meer, and S.A. Abdulkadir, *Tumorigenic polyploid cells contain elevated ROS and ARE selectively targeted by antioxidant treatment*. *J Cell Physiol*, 2012. **227**(2): p. 801-12.
313. Henson, S.M. and A.N. Akbar, *KLRG1--more than a marker for T cell senescence*. *Age (Dordr)*, 2009. **31**(4): p. 285-91.
314. Greenberg, S.A., et al., *Co-inhibitory T cell receptor KLRG1: human cancer expression and efficacy of neutralization in murine cancer models*. *Oncotarget*, 2019. **10**(14): p. 1399-1406.
315. Yang, X., et al., *Functions and clinical significance of KLRG1 in the development of lung adenocarcinoma and immunotherapy*. *BMC Cancer*, 2021. **21**(1): p. 752.
316. Wang, H., et al., *Overexpression of PSAT1 regulated by G9A sustains cell proliferation in colorectal cancer*. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2020. **5**(1): p. 47.
317. Gao, S., et al., *PSAT1 is regulated by ATF4 and enhances cell proliferation via the GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenin/cyclin D1 signaling pathway in ER-negative breast cancer*. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2017. **36**(1): p. 179.
318. Baguley, B.C., et al., *Inhibition of growth of colon 38 adenocarcinoma by vinblastine and colchicine: evidence for a vascular mechanism*. *Eur J Cancer*, 1991. **27**(4): p. 482-7.

319. Tazi, A., et al., *Vinblastine chemotherapy in adult patients with langerhans cell histiocytosis: a multicenter retrospective study*. Orphanet Journal of Rare Diseases, 2017. **12**(1): p. 95.
320. Bouffet, E., et al., *Phase II study of weekly vinblastine in recurrent or refractory pediatric low-grade glioma*. J Clin Oncol, 2012. **30**(12): p. 1358-63.
321. Harding, K., et al., *Response rate to a single dose of vinblastine administered to dogs with treatment-naïve multicentric lymphoma*. Veterinary and Comparative Oncology, 2018. **16**(4): p. 636-641.
322. Evens, A.M., et al., *The efficacy and tolerability of adriamycin, bleomycin, vinblastine, dacarbazine and Stanford V in older Hodgkin lymphoma patients: a comprehensive analysis from the North American intergroup trial E2496*. British Journal of Haematology, 2013. **161**(1): p. 76-86.
323. Ribatti, D., et al., *Vinblastine inhibits the angiogenic response induced by adrenomedullin in vitro and in vivo*. Oncogene, 2003. **22**(41): p. 6458-61.
324. Abrahamsen, A.F., et al., *Transient vinblastine-induced thrombocytopenia during chemotherapy with vinblastine, cis-platinum and bleomycin*. Scand J Haematol, 1986. **37**(1): p. 44-9.
325. Watson, N. and H. Al-Samkari, *Thrombotic and bleeding risk of angiogenesis inhibitors in patients with and without malignancy*. J Thromb Haemost, 2021. **19**(8): p. 1852-1863.
326. Lubos, E., J. Loscalzo, and D.E. Handy, *Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities*. Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(7): p. 1957-97.
327. Satyavarapu, E.M., et al., *Autophagy-independent induction of LC3B through oxidative stress reveals its non-canonical role in anoikis of ovarian cancer cells*. Cell Death & Disease, 2018. **9**(10): p. 934.
328. Wei, R., et al., *Expression and prognostic potential of GPX1 in human cancers based on data mining*. Ann Transl Med, 2020. **8**(4): p. 124.
329. Jiang, X., B.R. Stockwell, and M. Conrad, *Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2021. **22**(4): p. 266-282.
330. Liao, C.M., et al., *Induction of ferroptosis selectively eliminates senescent tubular cells*. American Journal of Transplantation, 2022. **22**(9): p. 2158-2168.
331. Gao, M., et al., *Ferroptosis is an autophagic cell death process*. Cell Res, 2016. **26**(9): p. 1021-32.
332. Nakagami, H., *Cellular senescence and senescence-associated T cells as a potential therapeutic target*. Geriatrics & Gerontology International, 2020. **20**(2): p. 97-100.
333. te Poele, R.H., et al., *DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo*. Cancer research, 2002. **62**(6): p. 1876-1883.
334. Buj, R., et al., *Suppression of p16 alleviates the senescence-associated secretory phenotype*. Aging (Albany NY), 2021. **13**(3): p. 3290-3312.
335. Khatiwala, R.V., et al., *Inhibition of p16(INK4A) to Rejuvenate Aging Human Cardiac Progenitor Cells via the Upregulation of Anti-oxidant and NFκB Signal Pathways*. Stem Cell Rev Rep, 2018. **14**(4): p. 612-625.

## **12. Zgoda komisji etycznej**



## UCHWAŁA NR 1184/2021

z dnia 27 kwietnia 2021 r.

I Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Warszawie

### § 1

Na podstawie art. 48 pkt. 1 ustawy z dnia 15 stycznia 2015r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266) zwanej dalej „ustawą” po rozpatrzeniu wniosku pt. „**Rola autofagii i niedotlenienia w chemooporności związanej ze starzeniem komórkowym w raku płuca i raku nerki,**” z dnia 02.04.2019 r. złożonego przez Instytut Biologii Doświadczalnej im. M Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa zaplanowanego przez Dr Halinę Waś lokalna komisja etyczna

### WYRAŻA ZGODĘ

Na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

### § 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku o którym mowa w § 1, Lokalna Komisja Etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy przypisać do kategorii: **Badania podstawowe.**
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: **Umiarkowana**
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków: **mysz, liczba zwierząt 99.**
4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: **Halina Waś, Anna Mietelska - Porowska, Grażyna Hoser, Karolina Hajdukiewicz, Anna Kiryk – Jaśkiewicz, Agata Klejman, Bartosz Zglinicki, Dagmara Siwkowska, Agata Borkowska, Aleksandra Olszewska**
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie<sup>1</sup>: **01.05.2021 – 01.10.2023 r.**
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku: w: -
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem w: -
8. Użyte do procedur zwierzęta dzikie zostaną odłowione przez: -
9. Doświadczenie zostanie poddane ocenie retrospektywnej.

---

<sup>1</sup> Nie dłużej niż 5 lat

### § 3

#### **Uzasadnienie:**

Komisja oceniła wniosek zgodnie z kryteriami zawartymi w art. 47.1 ustawy z dnia 15 stycznia 2015r o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266). Po zapoznaniu się z problematyką zawartą we wniosku komisja stwierdza, że pod względem etycznym przedstawiony wniosek spełnia zasady dopuszczenia doświadczeń na zwierzętach. Na podstawie art. 107 § 4 ustawy z dnia 14 czerwca 1960r – Kodeks postępowania administracyjnego z późniejszymi zmianami (Dz. U. 2017 poz. 1257) odstąpiono od sporządzenia uzasadnienia decyzji, gdyż uwzględnia ona w całości żądanie strony.

Niniejsza uchwała wchodzi w życie z dniem wydania i jest ważna do 01.10.2023 r.


§ 4

Integralną część niniejszej uchwały stanowi kopia wniosku, o którym mowa w § 1

(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

I LOKALNA KOMISJA ETYCZNA  
ds. Doświadczeń na Zwierzętach  
przy Wydziale Biologii UW  
ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa  
tel. 022 5541028, e-mail: lke1waw@biol.uw.edu.pl

Podpisy przewodniczącego komisji



Pouczenie:

Zgodnie z art. 33 ust. 3 i art. 40 ustawy w zw. z art. 127 § 1 i 2 oraz 129 § 2 ustawy z dnia 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. 2017, poz. 1257 – t.j.; dalej KPA) od uchwały Lokalnej Komisji Etycznej strona może wnieść, za jej pośrednictwem, odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 14 od dnia doręczenia uchwały.

Na podstawie art. 127a KPA w trakcie biegu terminu do wniesienia odwołania strona może zrzec się prawa do jego wniesienia, co należy uczynić wobec Lokalnej Komisji Etycznej, która wydała uchwałę. Z dniem doręczenia Lokalnej Komisji Etycznej oświadczenia o zrzeczeniu się prawa do wniesienia odwołania przez ostatnią ze stron postępowania, decyzja staje się ostateczna i prawomocna.

Otrzymuje:

- 1) Użytkownik,
- 2) Organizacja społeczna dopuszczona do udziału w postępowaniu (jeśli dotyczy)
- 3) a/a

Użytkownik kopie przekazuje:

- Osoba planująca doświadczenie
- Zespół ds. dobrostanu

Nr wniosku	
Data wpłynięcia	

(pieczęć lokalnej komisji etycznej)

## WNIOSEK O UDZIELENIE ZGODY NA PRZEPROWADZENIE DOŚWIADCZENIA NA ZWIERZĘTACH pt.

Rola autofagii i niedotlenienia w chemooporności związanej ze starzeniem  
komórkowym w raku płuca i raku nerki

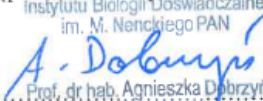
Projekt doświadczenia na zwierzętach objęty wnioskiem (lub jego część):

- nie był wcześniej rozpatrywany przez żadną lokalną komisję etyczną ds. doświadczeń na zwierzętach,
- jest ponowną lub zmodyfikowaną wersją projektu, który był już złożony do ... lokalnej komisji etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach w ..... i był procedowany pod numerem .....

### 1. DANE UŻYTKOWNIKA

Nazwa użytkownika <sup>2</sup>	Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN	Nr użytkownika: 0005
Adres użytkownika <sup>3</sup>	ul. L. Pasteura 3, 02-093 Warszawa	
<b>Osoba do kontaktu<sup>4</sup></b>		
Nazwisko: Mietelska-Porowska	Imię: Anna	Stanowisko: Specjalista II
Telefon: 22 589 25 77, 503 016 669	Fax: -	E-mail: a.mietelska@nencki.edu.pl

Wyrażam zgodę na doręczanie pism związanych z postępowaniem w sprawie składanego wniosku za pomocą poczty elektronicznej na adres:

Dyrektor  
 Instytutu Biologii Doświadczalnej  
 im. M. Nenckiego PAN  
  
 Prof. dr hab. Agnieszka Dobrzyń  
 (data, pieczęćka imienna,  
 podpis kierownika jednostki)

<sup>1</sup> Niepotrzebne skreślić.

<sup>2</sup> Należy podać nazwę użytkownika, z tym, że w przypadku, gdy użytkownikiem jest osoba fizyczna wykonująca działalność gospodarczą, zamiast nazwy należy podać jej imię i nazwisko.

<sup>3</sup> Należy podać adres i miejsce zamieszkania albo adres i siedzibę użytkownika, z tym, że w przypadku, gdy użytkownikiem jest osoba fizyczna wykonująca działalność gospodarczą, zamiast adresu i miejsca zamieszkania tej osoby – adres i miejsce wykonywania działalności, jeżeli są inne niż adres i miejsce zamieszkania tej osoby.

<sup>4</sup> Należy wpisać osobę, z którą ma się kontaktować LKE w razie wątpliwości dotyczących wniosku.

Upoważniam panią Annę Mietelska-Porowską do działania w sprawie ww. wniosku, w tym udzielania wszelkich wyjaśnień oraz reprezentowania wnioskodawcy w postępowaniu przed lokalną komisją etyczną ds. doświadczeń na zwierzętach.

Instytut Biologii Doświadczalnej  
im. M. Nenckiego PAN  
*A. Dobrzyń*  
Prof. dr hab. Annażka Dobrzyń  
(data, pieczęć i imienna  
podpis kierownika jednostki)

## 2. Dane osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia

Nazwisko: Waś	Imię: Halina	Stanowisko: starszy specjalista
Kwalifikacje Planowanie doświadczeń	Nr wyznaczenia: 5060/2019 numer certyfikatu ukończenia szkolenia	Termin ważności: 2024
Wykształcenie: wyższe, doktor nauk biologicznych, specjalizacja: biochemia	Szkolenie <sup>6</sup> : Szkolenie dla osób odpowiedzialnych za planowanie i wykonywanie procedur i doświadczeń oraz uśmiercających zwierzęta. Polskie Towarzystwo Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych - Pollasa 2019	Staż : 10 lat

### Proszę o wydanie zgody na przeprowadzenie doświadczenia zgodnie z wnioskiem.

Zobowiązuję się, że po uzyskaniu zgody na przeprowadzenie procedur przedstawionych w tym wniosku, wykonam je zgodnie z obowiązującym prawem oraz uchwałą komisji, mając na względzie w szczególności obowiązki wynikające z realizacji zasad zastąpienia, ograniczenia i udoskonalenia.

Zobowiązuję się także do zaniechania przeprowadzenia procedur lub ich natychmiastowego przerwania, jeśli w okresie obowiązywania zgody komisji w Unii Europejskiej zostaną zwalidowane metody alternatywne dla procedur przedstawionych w tym wniosku<sup>8</sup>.

.....  
(data, podpis)

## 3. MIEJSCE PRZEPROWADZANIA DOŚWIADCZEŃ U UŻYTKOWNIKA<sup>5</sup>

<sup>5</sup> Wskazanie osoby upoważnionej nie jest obowiązkowe.

<sup>6</sup> Należy wpisać tytuł, rok i organizatora szkolenia. (Rozporządzenie MNiSW DU 8.05.2015 poz. 628)

<sup>7</sup> Należy podać całkowity czas pracy ze zwierzętami doświadczalnymi

<sup>8</sup> Dotyczy procedur, których obowiązek przeprowadzenia wynika z przepisów lub wykorzystuje się w nich zwierzęta do celów produkcyjnych lub diagnostycznych za pomocą ustalonych metod.

Upoważniam panią Annę Mietelska-Porowską do działania w sprawie ww. wniosku, w tym udzielania wszelkich wyjaśnień oraz reprezentowania wnioskodawcy w postępowaniu przed lokalną komisją etyczną ds. doświadczeń na zwierzętach<sup>5</sup>.

.....  
(data, pieczęćka imienna,  
podpis kierownika jednostki)

**2. Dane osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia**

Nazwisko: Waś	Imię: Halina	Stanowisko: starszy specjalista
Kwalifikacje Planowanie doświadczeń	Nr wyznaczenia: 5060/2019 numer certyfikatu ukończenia szkolenia planujący 183P/2021/IBD wykonujący 183W/2021/IBD uśmiercający 183/2021/IBD	Termin ważności: 31.03.2026
Wykształcenie: wyższe, doktor nauk biologicznych, specjalizacja: biochemia	Szkolenie <sup>6</sup> : Szkolenie dla osób odpowiedzialnych za planowanie i wykonywanie procedur i doświadczeń oraz uśmiercających zwierzęta. Polskie Towarzystwo Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych - Pollasa 2019	Staż <sup>7</sup> : 10 lat

**Proszę o wyrażenie zgody na przeprowadzenie doświadczenia zgodnie z wnioskiem.**

Zobowiązuję się, że po uzyskaniu zgody na przeprowadzenie procedur przedstawionych w tym wniosku, wykonam je zgodnie z obowiązującym prawem oraz uchwałą komisji, mając na względzie w szczególności obowiązki wynikające z realizacji zasad zastąpienia, ograniczenia i udoskonalenia.

Zobowiązuję się także do zaniechania przeprowadzenia procedur lub ich natychmiastowego przerwania, jeśli w okresie obowiązywania zgody komisji w Unii Europejskiej zostaną zwalidowane metody alternatywne dla procedur przedstawionych w tym wniosku<sup>8</sup>.

31.03.2021 Halina Waś  
.....  
(data, podpis)

<sup>5</sup> Wskazanie osoby upoważnionej nie jest obowiązkowe.

<sup>6</sup> Należy wpisać tytuł, rok i organizatora szkolenia. (Rozporządzenie MNiSW DU 8.05.2015 poz. 628)

<sup>7</sup> Należy podać całkowity czas pracy ze zwierzętami doświadczalnymi

<sup>8</sup> Dotyczy procedur, których obowiązek przeprowadzenia wynika z przepisów lub wykorzystuje się w nich zwierzęta do celów produkcyjnych lub diagnostycznych za pomocą ustalonych metod.

### 3. MIEJSCE PRZEPROWADZANIA DOŚWIADCZEŃ U UŻYTKOWNIKA<sup>9</sup>

<b>Nazwa ośrodka:</b>		
Ulica, nr	Miejscowość:	Kod:

### 4. MIEJSCE PRZEPROWADZANIA DOŚWIADCZEŃ POZA OŚRODKIEM UŻYTKOWNIKA

Nazwa ośrodka innego użytkownika <sup>10</sup> :		
Ulica, nr	Miejscowość:	Kod:
<b>Uzasadnienie konieczności wykonywania doświadczeń w ośrodku innego użytkownika:</b>		
<b>Przeprowadzanie doświadczeń w miejscu przebywania zwierząt<sup>11</sup>:</b>		
Ulica, nr	Miejscowość:	Kod:
<b>Uzasadnienie konieczności wykonywania doświadczeń w miejscu przebywania zwierząt:</b>		
<b>Miejsce przeprowadzania doświadczeń<sup>12</sup>:</b>		
Ulica, nr	Miejscowość:	Kod:
<b>Uzasadnienie konieczności wykonywania doświadczeń poza siedzibą użytkownika ze wskazaniem, która procedura lub czynność będzie tam przeprowadzona:</b>		
<b>Dane miejsc przeprowadzania doświadczeń w terenie<sup>13</sup></b>		
Województwo:	Miejscowość:	
Dane osoby, która pozyska zwierzęta w przypadku zwierząt dzikich		
Nazwisko:	Imię:	
Sposób pozyskania zwierząt		

<sup>9</sup> Należy wypełnić w przypadku przeprowadzania doświadczeń w ośrodku użytkownika, jeśli adres ośrodka jest inny niż adres użytkownika wskazany w pkt 1.

<sup>10</sup> Należy wypełnić, jeżeli doświadczenia przeprowadzane będą w ośrodku innego użytkownika, ze wskazaniem uzasadnienia.

<sup>11</sup> Należy wypełnić w przypadku wykonywania procedur poza ośrodkiem użytkownika, w szczególności w gospodarstwach rolnych, ogrodach zoologicznych.

<sup>12</sup> Należy wypełnić, jeżeli procedury lub czynności przeprowadzane będą w jednostce niebędącej użytkownikiem, ze wskazaniem uzasadnienia. Wariant ten dopuszczalny jest jedynie w sytuacji, gdy zwierzęta nie są utrzymywane we wskazanym miejscu, ale przebywają w nim czasowo.

<sup>13</sup> Należy wypełnić w przypadku wykonywania procedur poza ośrodkiem użytkownika w środowisku naturalnym.

## 5. CEL I OGÓLNY OPIS DOŚWIADCZENIA<sup>14 15 16</sup>

A. Opis doświadczenia ze wskazaniem celu naukowego lub edukacyjnego, jaki planuje się osiągnąć w wyniku jego przeprowadzenia<sup>17</sup>

Starzenie komórkowe jest jedną z odpowiedzi komórek nowotworowych na chemioterapię (therapy-induced senescence, TIS). Podstawową cechą komórek starych jest trwała utrata zdolności do proliferacji [1-6]. Jednakże najnowsze badania, w tym nasze, obalają ten paradygmat. Komórki stare w pewnych warunkach mogą wznowić aktywność podziałową i generować komórki potomne [7-11]. Postulujemy zatem, że jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za wznowę choroby nowotworowej po chemioterapii jest podjęcie aktywności proliferacyjnej przez stare komórki rakowe. Szczegółowe mechanizmy ucieczki komórek nowotworowych od starzenia nie są jednak znane. Nasze dotychczasowe badania sugerują, że jednym z mechanizmów, który pozwala wznowić aktywność podziałową przez komórki TIS jest autofagia [7, 12]. Autofagia jest to proces kataboliczny, który zwiększa odporność komórek rakowych na czynniki stresowe tj. chemioterapia, czy niedotlenienie. Według naszych danych *in vitro* także samo niedotlenienie może zwiększać ucieczkę od starzenia indukowanego chemioterapią (Olszewska A, ..., Was H, w przygotowaniu). Dlatego **celem proponowanych przez nas doświadczeń *in vivo* jest zbadanie, jak inhibitor autofagii – hydroksychlorokina (HCQ) oraz związek zwiększający utlenianie tkanek - trispyrofosforan mio-inozytolu (ITPP) wpływają na efektywność chemioterapii w kontekście starzenia.** Eksperymenty przeprowadzimy z użyciem komórek raka płuca i raka nerki. Proponowany eksperyment będzie polegał na podaniu komórek rakowych podskórnice, a następnie zastosowaniu odpowiedniej chemioterapii (procedura nr 1). W momencie stabilizacji wzrostu guza po leczeniu, czyli w domyśle indukcji starzenia, rozpoczniemy podawanie HCQ lub ITPP (procedura nr 2). Pobrane po zakończeniu eksperymentu tkanki posłużą ocenie skuteczności obu związków w kontekście eliminacji starych komórek rakowych i/ lub zahamowania ucieczki od starzenia. Jesteśmy przekonani, że nasze badania, będące badaniami podstawowymi, pozwolą opisać nowe mechanizmy oporności na chemioterapie i staną się podstawą do zaproponowania narzędzi, aby je przewyciężyć. Będą miały zatem znaczenie nie tylko poznawcze, ale w przyszłości i kliniczne.

Klasyfikacja celu procedur: [PB1] (badania podstawowe) Onkologia, niezależnie od badanego układu

B. Planowany termin realizacji doświadczenia<sup>18</sup>

Data rozpoczęcia doświadczenia	01.05.2021
Data zakończenia doświadczenia	01.10.2023

<sup>14</sup> Opis doświadczenia ze wskazaniem celu naukowego lub edukacyjnego, jaki planuje się osiągnąć w wyniku jego przeprowadzenia, tekst musi być napisany w sposób zrozumiały dla niespecjalisty, nie więcej niż 250 słów. W tekście nie opisywać szczegółowo planowanych procedur i czynności, należy odwoływać się do procedur poprzez podanie ich numerów, zgodnie z pkt 6 wniosku.

<sup>15</sup> W przypadku planowania procedur, o których mowa w art. 5 ust. 3 ustawy, należy wskazać uzasadnienie oraz cel.

<sup>16</sup> Podać również klasyfikację celu procedury lub procedur planowanych do wykonania w ramach doświadczenia zgodnie z instrukcją. Poza opisową klasyfikacją celu dozwolone jest wskazanie zamieszczonych tam oznaczeń literowo-cyfrowych.

<sup>17</sup> W sytuacji, kiedy doświadczenie przeprowadzane jest na podstawie przepisu prawa lub zgodnie z ustalonymi metodami konieczne jest najbardziej precyzyjne przywołanie ustalonych metod wraz ze wskazaniem roku publikacji i źródła wykorzystywanej metody (w celu zweryfikowania, że nie pojawiła się metoda alternatywna). Opcjonalnie można dołączyć do wniosku w formie załącznika wydruk z opisem danej metody.

<sup>18</sup> Maksymalnie 5 lat



## 6. UZASADNIENIE WYKORZYSTANIA ZWIERZĄT W DOŚWIADCZENIU

### A. Uzasadnienie wykorzystania w planowanym doświadczeniu gatunków i liczby zwierząt<sup>19,20,21,22</sup>

---

<sup>19</sup> W przypadku zwierząt laboratoryjnych należy podać rasę, szczerp, linię, stado.

<sup>20</sup> Należy podać uzasadnienie liczebności grup, z powołaniem się na prawidłowości statystyczne.

<sup>21</sup> W przypadku planowanego ponownego wykorzystania zwierząt, o którym mowa w art. 12 ust.2 pkt 2 ustawy, należy podać uzasadnienie.

<sup>22</sup> W przypadku wykorzystania zwierząt, o których mowa w art. 7 oraz 8 ust. 1 pkt 2 i 3 należy podać uzasadnienie naukowe.

Eksperymenty zostaną przeprowadzone na mysich modelach syngenicznych – BALB/c dla linii raka nerki Renca oraz C57BL6/c dla linii raka płuca LLC1. Myszy tych szczepów są najczęściej stosowane w badaniach nad chorobami nowotworowymi. Charakteryzują się łatwością w rozmnażaniu, hodowli i przeprowadzaniu procedur eksperymentalnych. Wszczepianie myszom mysich komórek linii nowotworowych, pochodzących z hodowli *in vitro*, stanowi od wielu lat dostępny i standardowy model doświadczalny. Jest on stosowany w badaniach nad procesem nowotworowym, w tym nad mechanizmem wzrostu guza pierwotnego i tworzenia przerzutów, jak również do testowania związków przeciwnowotworowych. Dodatkowo, użycie myszy immunokompetentnych w badaniach nowotworowych pozwala odtworzyć całą złożoność organizmu żywego i roli jego poszczególnych układów dla wzrostu i progresji nowotworu [13]. Także w kontekście zaproponowanych przez nas badań, czyli zbadania efektów zastosowania inhibitora autofagii - HCQ oraz cząsteczki zwiększającej utlenianie tkanek - ITPP w kontekście eliminacji komórek starych i/ lub zahamowania ucieczki od starzenia komórek rakowych obecność funkcjonalnego układu odpornościowego oraz krwionośnego ma kluczowe znaczenie.

W modelu raka nerki użyte zostaną myszy BALB/ccmdb. Szczep ten został rozwinięty w 1913 z inwentarza zwierząt domowych przez H. J. Bagg. Szczep jest hodowany wsobnie od 1923. Od 1974 roku szczep hodowany jest w Charles River skąd sprowadzane są przez Centrum Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Celem indukcji guza wykorzystana zostanie mysia linie komórkowa Renca (ATCC® CRL-2947™), która została indukowana i wyizolowana przy użyciu szczepu Balb/cCr.

Drugim modelem wykorzystanym w badaniu będzie model syngeniczny raka płuca. W tym przypadku zostaną wykorzystane zwierzęta C57BL6/ccmdb. Szczep sprowadzony do Centrum Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z The Jackson Laboratory. Szczep ten charakteryzuje się małą podatnością na występowanie spontanicznych mutacji. Celem indukcji guza wykorzystana zostanie mysia linia raka płuca LL/2 (LLC1) (ATCC® CRL-1642™), która została wyindukowana i wyizolowana ze szczepu C57BL.

W eksperymentach planowane jest wykorzystanie 55 zwierząt szczepu BALB/ccmdb i 44 myszy szczepu C57BL6/ccmdb.

Liczebność grup została oszacowana na podstawie analiz statystycznych, w których założono, że zaobserwowane pomiędzy grupami różnice będą statystycznie istotne, a wartość p wyniesie  $p \leq 0,05$ . Przy szacowaniu liczebności grup trzymano się zasad 3R.

W określeniu liczebności ustalonych już grup ustosunkowaliśmy się do wytycznych statystycznych, pozwalających oszacować liczbę zwierząt przeznaczoną do doświadczenia, w oparciu o odpowiednie założenia statystyczne (Dell Ralph B. et al.; 2002).

$n = 1 + 2C \left(\frac{s}{d}\right)^2$  - wzór wyliczający liczbę zwierząt w badanej grupie

C (liczba reprezentująca moc testu statystycznego i przedział ufności) = 10,51;

s (oczekiwane odchylenie standardowe w poszczególnych eksperymentach) = 0,35;

d (oczekiwane różnice w wynikach między badanymi grupami) = 0,5;

n (szacunkowa liczba zwierząt na badaną grupę i płęć) = 11

Zaproponowane przez nas schematy podawania leków, czy ich dawkowanie opiera się na danych literaturowych oraz naszych wcześniejszych badaniach *in vitro* oraz *in vivo* [7, 14-18]. Eksperymenty przeprowadzimy na grupach składających się z 11 osobników zgodnie w powyższymi wyliczeniami.

Całkowita liczba myszy potrzebna do realizacji projektu jest następująca:

BALB/ccmdb – 55 sztuk

C57BL6/ccmdb – 44 sztuki

Liczba: 99 zwierząt (obydwa szczepy)

### B. Informacja dotycząca zwierząt

Gatunek/stado/szczep	Wiek/stadium rozwoju	Liczba	Pochodzenie <sup>23</sup>	Nr w rejestrze hodowców/dostawców <sup>24</sup>
Mysz BALB/ cndb	Samce 8-9 tygodni	55	Centrum Medycyny Doświadczalnej w Białymstoku	043
Mysz C57BL6/cndb	Samce 8-9 tygodni	44	Centrum Medycyny Doświadczalnej w Białymstoku	043

### C. Opis warunków, w jakich będą utrzymywane zwierzęta w doświadczeniu<sup>25 26</sup>

Będą utrzymywane w jałowym pomieszczeniu, w standardzie SPF (Specific Pathogen Free) w indywidualnie wentylowanych klatkach (75 wymian/h), w grupach socjalnych po 5 osobników w klatce o powierzchni 530 cm<sup>2</sup> i wysokości 14 cm, ze wzbogaconym środowiskiem (drewniane klocki, kartonowe rurki), z nieograniczonym dostępem do jałowego pożywienia i wody. Klatki będą umieszczone w regałach IVC (Techniplast), z zachowaniem warunków nadciśnienia w pomieszczeniach bytowych, temperaturą pomieszczenia  $\pm 22^{\circ}\text{C}$ , wilgotnością  $\pm 55\%$  oraz cyklem dobowym 12/12h. Po dostarczeniu do placówki, myszy będą poddane aklimatyzacji, przez co najmniej 5-8 dni podczas których zwierzęta będą oswajane z osobą wykonującą doświadczenia poprzez handling.

31.03.2022  
.....  
(data, podpis osoby odpowiedzialnej  
za dobrostan zwierząt w jednostce)  
POLSKA AKADEMIA NAUK  
INSTYTUT BIOLOGII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. M. NENCKIEGO  
Warszawa, ul. Pasteura 3  
ZWIERZĘTARNIA

<sup>23</sup> Należy podać hodowcę lub dostawcę zwierząt

<sup>24</sup> W odniesieniu do zwierząt nie pochodzących z hodowli zwierząt laboratoryjnych (w szczególności zwierząt gospodarskich) należy wpisać numer hodowcy w rejestrze powiatowego lekarza weterynarii.

<sup>25</sup> Należy wpisać warunki, w jakich będą utrzymywane zwierzęta (w szczególności: temperatura, wilgotność, cykl świetlny, liczbę wymian powietrza na godzinę, oraz opisać i uzasadnić, odejście od standardowych warunków utrzymania zwierząt (np. utrzymanie gatunków społecznych pojedynczo w klatce, niestosowanie wzbogacenia środowiska)

<sup>26</sup> Sekcję C należy skopiować i wypełnić odpowiednio do liczby ośrodków, w których utrzymywane będą zwierzęta w ramach doświadczenia. Wymagane jest podpisanie sekcji C przez osobę odpowiedzialną za dobrostan zwierząt w każdej jednostce.

**7. OPIS PLANOWANYCH PROCEDUR ORAZ PROPONOWANA KATEGORIA DOTKLIWOŚCI<sup>27</sup>**

Nazwa procedury: Ocena wzrostu implantowanych komórek nowotworowych po podaniu chemioterapeutyków				Kategoria dotkliwości	Umiarkowana		
Gatunek: Mysz BALB/ ccmdb oraz mysz C57BL6/ccmdb			Liczba zwierząt: 33				
<p><b>Uzasadnienie potrzeby przeprowadzenia procedury i użytych w niej czynności:</b>                  Podczas badań <i>in vitro</i> z wykorzystaniem modelu raka nerki i rak płuca stwierdzono, że niektóre chemioterapeutyki indukują starzenie komórek nowotworowych efektywniej niż inne. Lekiem, który skutecznie indukował starzenie w raku nerki była winblastyna (Borkowska A., ..., Was H., w przygotowaniu). Natomiast cisplatyna okazała się być skuteczna w raku płuca (Olszewska A., ..., Was H., w przygotowaniu).</p> <p>Doświadczenie <i>in vivo</i> ma na celu:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- ocenę wpływu winblastyny na indukcję starzenia komórek raka nerki <i>in vivo</i>,</li> <li>- ocenę, czy rozpuszczalnik dla winblastyny – DMSO – nie indukuje starzenia lub nie ma efektów toksycznych,</li> <li>- ocenę wpływu cisplatyny na indukcję starzenia komórek raka płuca <i>in vivo</i>.</li> </ul> <p><b>Wersja A)</b> badanie, czy terapia winblastyną wpływa na indukcję starzenia (stabilizację choroby nowotworowej). Myszy zostaną nastrzyknięte komórkami raka nerki. Kiedy guz osiągnie wielkość ok. 100 mm<sup>3</sup>, rozpoczniemy podawanie winblastyny. Winblastyna będzie podawana przez 3 tygodnie (21 dni), a następnie myszy zostaną poddane eutanazji.</p> <p><b>Wersja B)</b> badanie, czy podanie nośnika dla winblastyny – DMSO wpływa na indukcję starzenia (stabilizację choroby nowotworowej). Myszy zostaną nastrzyknięte komórkami raka nerki. Kiedy guz osiągnie wielkość ok. 100 mm<sup>3</sup>, rozpoczniemy podawanie DMSO. DMSO będzie podawana przez 3 tygodnie (21 dni), a następnie myszy zostaną poddane eutanazji.</p> <p><b>Wersja C)</b> badanie, czy terapia cisplatyną wpływa na indukcję starzenia (stabilizację choroby nowotworowej). Myszy zostaną nastrzyknięte komórkami raka płuca. Kiedy guz osiągnie wielkość ok. 100 mm<sup>3</sup>, rozpoczniemy podawanie cisplatyny. Cisplatyna będzie podawana przez 3 tygodnie (21 dni), a następnie myszy zostaną poddane eutanazji.</p>							
<b>Schemat grup eksperymentalnych w doświadczeniu</b>							
Szczep myszy	Komórki	Związek	Sposób podania	Dawka	Liczba osobników		
					A	B	C
BALB/ ccmdb	Renca	DMSO	i.p.	-	+	-	-
BALB/ ccmdb	Renca	Winblastyna	i.p.	1,5 mg/kg	-	+	-
C57BL6/ccmdb	LLC1	cisplatyna	i.p.	1 mg/kg	-	-	+
				Liczba	11	11	11
				Razem	33		
<p><b>1. Nazwa czynności:</b> Podanie komórek mysiej linii raka nerki Renca lub raka płuca LLC1 w iniekcji podskórnej.</p>							

<sup>27</sup> W razie potrzeby (gdy liczba stosowanych procedur lub etapów jest większa) należy tabelkę lub jej fragment dotyczący jednej czynności skopiować odpowiednią liczbę razy

<b>Opis:</b> Zwierzęta zostaną poddane anestezji wziewnej przez podanie izofluranu a następnie zabiegowi wszczepienia komórek mysiej linii Renca lub mysiej linii LLC1 poprzez iniekcję podskórną 100 µl (stanowi to około 0,5% masy zwierząt) zawiesiny 10 <sup>5</sup> komórek nowotworowych w zawieszonych w PBS. Komórki zostaną zaimplementowane w okolicę łądźwiową lub szyjną. Podanie igłą G 25-27 x 13,25 mm.		
Planowany do zastosowania rodzaj znieczulenia <sup>28</sup> :		
Środek	Sposób podania	Dawka
Izofluran (Aerane, Baxter)	Wziewna	0,5% (opary)
Planowane do zastosowania produkty lecznicze lub produkty lecznicze weterynaryjne o działaniu przeciwbólowym lub środki uspokajające <sup>29</sup> : nie planuje się		
Środek	Sposób podania	Dawka
Uzasadnienie dla odstąpienia od zastosowania znieczulenia i/lub zastosowania produktów leczniczych lub produktów leczniczych weterynaryjnych o działaniu przeciwbólowym lub środków uspokajających: po wybudzeniu zwierzęta nie odczuwają dyskomfortu z powodu wcześniejszego zastrzyku i nie jest konieczne dodatkowe znieczulenie.		
<b>2. Nazwa czynności:</b> Pomiar wzrostu guza, kontrola masy ciała i obserwacja ogólna zwierząt		
<b>Opis:</b> Przed rozpoczęciem pomiaru zwierzęta będą poddane anestezji wziewnej przez podanie izofluranu. Celem dokonania dokładnego pomiaru guza, skóra zwierzęcia w tym obszarze będzie musiała być pozbawiona owłosienia. Skóra zwierząt będzie golona przy użyciu maszynki do golenia. Zabieg będzie powtarzany w zależności od szybkości odrastania sierści – średnio raz na tydzień. Rozmiar guza będzie mierzony 2 razy w tygodniu przy pomocy cyfrowego miernika, a jego objętość będzie obliczana według wzoru: (objętość) = (szerokość) <sup>2</sup> x (długość)/2. Zawsze po wykonaniu pomiaru zwierzęta będą ważone na wadze elektronicznej w celu monitorowania masy ciała.		
Planowany do zastosowania rodzaj znieczulenia <sup>26</sup> :		
Środek	Sposób podania	Dawka
Izofluran (Aerane, Baxter)	Wziewna	0,5% (opary)
Planowane do zastosowania produkty lecznicze lub produkty lecznicze weterynaryjne o działaniu przeciwbólowym lub środki uspokajające <sup>27</sup> : nie planuje się		
Środek	Sposób podania	Dawka
Uzasadnienie dla odstąpienia od zastosowania znieczulenia i/lub zastosowania produktów leczniczych lub produktów leczniczych weterynaryjnych o działaniu przeciwbólowym lub środków uspokajających: po wybudzeniu zwierzęta nie odczuwają dyskomfortu i nie jest konieczne dodatkowe znieczulenie.		
<b>3. Nazwa czynności:</b> Podawanie leków		

<sup>28</sup> W przypadku odstąpienia od zastosowania znieczulenia ogólnego lub miejscowego podczas wykonywania czynności mogącej powodować ból lub cierpienie należy podać uzasadnienie dla odstąpienia od zastosowania takiego znieczulenia.

<sup>29</sup> W przypadku zastosowania produktów leczniczych lub produktów leczniczych weterynaryjnych, które uniemożliwiają lub utrudniają okazywanie bólu, pomimo jego odczuwania, należy podać uzasadnienie dla ich zastosowania i sposób monitorowania stanu zwierzęcia.

<p><b>Opis:</b>                  Po osiągnięciu przez guz wielkości 100 mm<sup>3</sup> 11 myszy BALB/ ccmdb (wersja doświadczeń A) rozpocznie terapię winblastyną (1,5 mg/kg) rozpuszczaną w DMSO, 11 myszy BALB/ ccmdb rozpocznie terapię DMSO (nośnik dla winblastyny, wersja B), a 11 myszy C57BL6/ccmdb rozpocznie terapię cisplatyną (1 mg/kg) rozpuszczaną w PBS (wersja C). Winblastyna lub DMSO będą podawane dootrzewnowo 1 raz na tydzień, a cisplatyna będzie podawana dootrzewnowo co 3 dni w objętości 200 µl (1% masy ciała), igłą G 25-27 x 13, 25 mm. Kuracja będzie trwała 3 tygodnie lub dłużej, jeśli choroba nie ulegnie stabilizacji. Poprzez stabilizację choroby uznajemy zahamowanie wzrostu guza (+/- 2 mm w obu osiach guza) przez przynajmniej 1 tydzień (7 dni). Po ustabilizowaniu choroby myszy zostaną poddana eutanazji.</p>		
<p>Planowany do zastosowania rodzaj znieczulenia<sup>26</sup>:</p>		
Środek	Sposób podania	Dawka
<p>Planowane do zastosowania produkty lecznicze lub produkty lecznicze weterynaryjne o działaniu przeciwbólowym lub środki uspokajające<sup>27</sup>: nie planuje się</p>		
Środek	Sposób podania	Dawka
<p>Uzasadnienie dla odstąpienia od zastosowania znieczulenia i/lub zastosowania produktów leczniczych lub produktów leczniczych weterynaryjnych o działaniu przeciwbólowym lub środków uspokajających: zwierzęta odczuwają dyskomfort tylko podczas iniekcji, nie jest konieczne podanie dodatkowego znieczulenia</p>		
<p><b>4. Nazwa czynności: Eutanazja</b></p>		
<p><b>Opis:</b>                  Zwierzęta zostaną uśpione w oparach 4% izofluranu i znieczulone mieszaniną medetomidyny z ketaminą w 0,9% NaCl w dawce anestetycznej na drodze iniekcji dootrzewnowej (250 µl). Po sprawdzeniu braku odruchów przy ścisaniu paliczków i płatków uszu po otwarciu klatki piersiowej zwierzęta zostaną uśmiercone przez skrwawienie - pobrana zostanie krew z serca w objętości około 500 µl do analizy hematologicznej i biochemicznej. Po pobraniu próbki krwi bez wybudzania z narkozy zostanie wykonana perfuzja transkardialna roztworem PBS z dodatkiem 0,1% heparyny o temperaturze 0-4°C w celu wypłukania krwi z organizmu. Po wykonanej perfuzji do dalszych analiz histopatologicznych i molekularnych izolowane będą guzy jak i wybrane organy (płuca, wątroba, śledziona, nerki).</p>		
<p>Planowany do zastosowania rodzaj znieczulenia<sup>26</sup>:</p>		
Środek	Sposób podania	Dawka
Izofluran (Aerane, Baxter)	Wziewna	0,5% (opary)
Ketamina 100mg/ml	Iniekcja dootrzewnowa	75 mg/kg
Dexdomitor (medetomidyna) 0,5mg/ml	Iniekcja dootrzewnowa	1 mg/kg
<p>Planowane do zastosowania produkty lecznicze lub produkty lecznicze weterynaryjne o działaniu przeciwbólowym lub środki uspokajające<sup>27</sup>: nie planuje się</p>		
Środek	Sposób podania	Dawka
<p>Uzasadnienie dla odstąpienia od zastosowania znieczulenia i/lub zastosowania produktów leczniczych lub produktów leczniczych weterynaryjnych o działaniu przeciwbólowym lub środków uspokajających: nie ma zastosowania</p>		

<b>Nazwa procedury:</b> Ocena wzrostu implantowanych komórek nowotworowych Rencia i LLC1 po podaniu badanych związków: HCQ i ITPP		<b>Kategoria dotkliwości</b>	<b>Umiarkowana</b>
<b>Gatunek:</b> Mysz BALB/ ccmdb oraz mysz C57BL6/ccmdb		<b>Liczba zwierząt:</b> 66	

**Uzasadnienie potrzeby przeprowadzenia procedury i użytych w niej czynności:**

W badaniach *in vitro* na modelu raka płuca stwierdzono, że komórki w warunkach hipoksji wykazują oporność na chemioterapię z użyciem cisplatyny poprzez ucieczkę od starzenia. Wykazano również, że inhibitor autofagii – hydroksychlorokina (HCQ) pozwala przezwyciężyć tę oporność poprzez zahamowanie proliferacji komórek (Olszewska A, ..., Was H, w przygotowaniu). HCQ była również skuteczna w przypadku hamowania ucieczki od starzenia w komórkach raka nerki (Borkowska A, ..., Was H, w przygotowaniu). Drugim związkiem, który może być skuteczny w tym układzie jest trispyrofosforan mio-inozytolu (ITPP). Nasze badania *in vitro* wykazały, że może on hamować ucieczkę od starzenia komórek raka nerki, być może na drodze zależnej od białka supresorowego nowotworzenia PTEN (Zglinicki B, ..., Was H, w przygotowaniu). Druga funkcja ITPP to zwiększenie uwalnianie tlenu z hemoglobiny i redukcja hipoksji [19-22]. Jednak ta cecha jest możliwa to przetestowania tylko w układzie *in vivo*.

Doświadczenie *in vivo* ma na celu:

- ocenę wpływu inhibicji autofagii przez HCQ na komórki raka płuc i komórek raka nerki indukowanych do starzenia chemioterapeutykami,
- ocenę wpływu zniwelowania hipoksji i indukcje białka supresorowego nowotworzenia PTEN przez ITPP na komórki raka płuc i komórek raka nerki indukowanych do starzenia chemioterapeutykami.

**Wersja 1)** badanie, czy terapia chemioterapeutykami wpływa na ucieczkę komórek raka płuc lub raka nerki od starzenia. Myszy zostaną nastrzyknięte komórkami raka płuc lub komórek raka nerki. Kiedy guz osiągnie wielkość ok. 100 mm<sup>3</sup>, rozpoczniemy podawanie chemioterapeutyków - cisplatyny w raku płuca lub winblastyny w raku nerki. Po zakończeniu terapii lekami zwierzęta te będą nastrzykiwane roztworem soli fizjologicznej w schemacie czasowym odpowiadającym grupom 2 i 3. Następnie przez 2 tygodnie (14 dni) myszom podawana będzie sól fizjologiczna. Ta wersja będzie stanowiła też grupę kontrolną dla podawania HCQ (**wersja 2**) i ITPP (**wersja 3**). Eksperyment od rozpoczęcia terapii będzie trwał 9 tygodni (63 dni) lub krócej, jeśli guzy przekroczą 15 mm w swojej dłuższej osi.

**Wersja 2)** badanie, czy inhibitor autofagii - HCQ ma wpływ na ucieczkę od starzenia komórek rakowych traktowanych chemioterapeutykami. Myszy zostaną nastrzyknięte komórkami raka płuc lub komórek raka nerki. Kiedy guz osiągnie wielkość ok. 100 mm<sup>3</sup>, rozpoczniemy podawanie chemioterapeutyków - cisplatyny w raku płuca lub winblastyny w raku nerki. Następnie przez 2 tygodnie (14 dni) myszom podawana będzie HCQ. Po zakończeniu traktowania zwierzęta zostaną pozostawione do obserwacji przez kolejne 4 tygodnie. Eksperyment od rozpoczęcia terapii będzie trwał 9 tygodni (63 dni) lub krócej, jeśli guzy przekroczą 15 mm w swojej dłuższej osi.

**Wersja 3)** badanie, czy związek zwiększający utlenowanie tkanek i indukujący PTEN - ITPP ma wpływ na ucieczkę od starzenia komórek rakowych traktowanych chemioterapeutykami. Myszy zostaną nastrzyknięte komórkami raka płuc lub komórek raka nerki. Kiedy guz osiągnie wielkość ok. 100 mm<sup>3</sup>, rozpoczniemy podawanie chemioterapeutyków - cisplatyny w raku płuca lub winblastyny w raku nerki. Następnie przez 2 tygodnie (14 dni) myszom podawany będzie ITPP. Po zakończeniu traktowania zwierzęta zostaną pozostawione do obserwacji przez kolejne 4 tygodnie. Eksperyment od rozpoczęcia terapii będzie trwał 9 tygodni (63 dni) lub krócej, jeśli guzy przekroczą 15 mm w swojej dłuższej osi.

Schemat grup eksperymentalnych w doświadczeniu							
Szczep myszy	Komórki	Związek	Sposób podania	Dawka	Liczba osobników		
					Wersja 1	Wersja 2	Wersja 3

Użytkownik: Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk  
 Tytuł wniosku: Rola autofagii i niedotlenienia w chemooporności związanej ze starzeniem komórkowym w raku płuca i raku nerki

BALB	Renca	Sól fizjologiczna	i.p.	-	+	-	-
BALB	Renca	HCQ	i.p.	30 mg/kg	-	+	-
BALB	Renca	ITPP	i.p.	1,5 g/kg	-	-	+
C57BL6	LLC1	Sól fizjologiczna	i.p.	-	+	-	-
C57BL6	LLC1	HCQ	i.p.	30 mg/kg	-	+	-
C57BL6	LLC1	ITPP	i.p.	1,5 g/kg	-	-	+
				Liczba	22	22	22
				Razem	66		

**1. Nazwa czynności:** Podanie komórek mysiej linii raka nerki Renca lub raka płuc LLC1 w iniekcji podskórnej.

**Opis:**

Zwierzęta zostaną poddane anestezji wziewnej przez podanie izofluranu a następnie zabiegowi wszczepienia komórek mysiej linii Renca lub mysiej linii LLC1 poprzez iniekcję podskórną 100 µl (stanowi to około 0,5% masy zwierząt) zawiesiny 10<sup>5</sup> komórek nowotworowych w zawieszonych w PBS. Komórki zostaną zaimplementowane w okolicę łędźwiową lub szyjną. Podanie igłą G 25-27 x 13,25 mm.

Planowany do zastosowania rodzaj znieczulenia<sup>30</sup>:

Środek	Sposób podania	Dawka
Izofluran (Aerane, Baxter)	Wziewna	0,5% (opary)

Planowane do zastosowania produkty lecznicze lub produkty lecznicze weterynaryjne o działaniu przeciwbólowym lub środki uspokajające<sup>31</sup>: nie planuje się

Środek	Sposób podania	Dawka

Uzasadnienie dla odstąpienia od zastosowania znieczulenia i/lub zastosowania produktów leczniczych lub produktów leczniczych weterynaryjnych o działaniu przeciwbólowym lub środków uspokajających: po wybudzeniu zwierzęta nie odczuwają dyskomfortu z powodu wcześniejszego zastrzyku i nie jest konieczne dodatkowe znieczulenie.

**2. Nazwa czynności:** Pomiar wzrostu guza, kontrola masy ciała i obserwacja ogólna zwierząt

**Opis:**

Przed rozpoczęciem pomiaru zwierzęta będą poddane anestezji wziewnej przez podanie izofluranu. Celem dokonania dokładnego pomiaru guza, skóra zwierzęcia w tym obszarze będzie musiała być pozbawiona owłosienia. Skóra zwierząt będzie golona przy użyciu maszynki do golenia. Zabieg będzie powtarzany w zależności od szybkości odrastania sierści – średnio raz na tydzień. Rozmiar guza będzie mierzony 2 razy w tygodniu przy pomocy cyfrowego miernika, a jego objętość będzie obliczana według wzoru: (objętość) = (szerokość)<sup>2</sup> x (długość)/2. Zawsze po wykonaniu pomiaru zwierzęta będą ważone na wadze elektronicznej w celu monitorowania masy ciała.

<sup>30</sup> W przypadku odstąpienia od zastosowania znieczulenia ogólnego lub miejscowego podczas wykonywania czynności mogącej powodować ból lub cierpienie należy podać uzasadnienie dla odstąpienia od zastosowania takiego znieczulenia.

<sup>31</sup> W przypadku zastosowania produktów leczniczych lub produktów leczniczych weterynaryjnych, które uniemożliwiają lub utrudniają okazywanie bólu, pomimo jego odczuwania, należy podać uzasadnienie dla ich zastosowania i sposób monitorowania stanu zwierzęcia.



Planowany do zastosowania rodzaj znieczulenia <sup>26</sup> :		
Środek	Sposób podania	Dawka
Izofluran (Aerane, Baxter)	Wziewna	0,5% (opary)
Planowane do zastosowania produkty lecznicze lub produkty lecznicze weterynaryjne o działaniu przeciwbólowym lub środki uspokajające <sup>27</sup> : nie planuje się		
Środek	Sposób podania	Dawka
Uzasadnienie dla odstąpienia od zastosowania znieczulenia i/lub zastosowania produktów leczniczych lub produktów leczniczych weterynaryjnych o działaniu przeciwbólowym lub środków uspokajających: po wybudzeniu zwierzęta nie odczuwają dyskomfortu z powodu wcześniejszego zastrzyku i nie jest konieczne dodatkowe znieczulenie.		
<b>3. Nazwa czynności:</b> Podawanie leków		
<b>Opis:</b>		
Po osiągnięciu przez guz wielkości 100 mm <sup>3</sup> 33 myszy BALB/ ccmdb ( <b>wersja doświadczeń A</b> ) rozpocznie terapię winblastyną (1,5 mg/kg) rozpuszczaną w DMSO, a 33 myszy C57BL6/ccmdb rozpocznie terapię cisplatyną (1 mg/kg) rozpuszczaną w PBS ( <b>wersja B</b> ). Winblastyna będzie podawana dootrzewnowo 1 raz na tydzień, a cisplatyna będzie podawana dootrzewnowo co 3 dni w objętości 200 µl (1% masy ciała), igłą G 25-27 x 13, 25 mm. Kuracja będzie trwała 3 tygodnie lub dłużej, jeśli choroba nie ulegnie stabilizacji. Poprzez stabilizację choroby uznajemy zahamowanie wzrostu guza (+/- 2 mm w obu osiach guza) przez przynajmniej 1 tydzień (7 dni). Po ustabilizowaniu choroby myszy zostaną losowo przypisane do 3 grup.		
<b>4. Nazwa czynności:</b> Podawanie badanych związków: HCQ i ITPP		
<b>Opis:</b>		
<b>Zwierzętom będzie podawany dootrzewnowo badany związek lub jego nośnik</b> w objętości 200 µl (1% masy ciała), igłą G 25-27 x 13, 25 mm.		
<b>W grupie 1</b>		
Po zakończeniu terapii winblastyną (11 myszy BALB/ ccmdb) lub cisplatyną (11 myszy C57BL6/ccmdb) zwierzęta będą nastrzykiwane roztworem soli fizjologicznej w schemacie czasowym odpowiadającym grupom 2 i 3.		
<b>W grupie 2</b>		
Po zakończeniu terapii winblastyną (11 myszy BALB/ ccmdb) lub cisplatyną (11 myszy C57BL6/ccmdb) zwierzęta te będą nastrzykiwane inhibitorem autofagii - HCQ (30 mg/kg). Lek będzie implementowany w dwóch cyklach jeden raz dziennie przez 5 dni, między którymi będzie 2-dniowa przerwa.		
<b>W grupie 3</b>		
Po zakończeniu terapii winblastyną (11 myszy BALB/ ccmdb) lub cisplatyną (11 myszy C57BL6/ccmdb) zwierzęta będą nastrzykiwane związkiem zwiększającym utlenowanie tkanek - ITPP (1,5 g/kg). Lek będzie podawany dootrzewnowo jeden raz dziennie co 2-3 dni przez okres 2 tygodni (14 dni). Zwierzęta po podaniu ostatniej dawki soli fizjologicznej, lub HCQ lub ITPP zostaną pozostawione do obserwacji przez 4 tygodnie lub krócej, jeśli guzy przekroczą 15 mm w swojej dłuższej osi.		
Planowany do zastosowania rodzaj znieczulenia <sup>26</sup> :		
Środek	Sposób podania	Dawka

Planowane do zastosowania produkty lecznicze lub produkty lecznicze weterynaryjne o działaniu przeciwbólowym lub środki uspokajające <sup>27</sup> : nie planuje się		
Środek	Sposób podania	Dawka
Uzasadnienie dla odstąpienia od zastosowania znieczulenia i/lub zastosowania produktów leczniczych lub produktów leczniczych weterynaryjnych o działaniu przeciwbólowym lub środków uspokajających: podczas iniekcji zwierzęta odczuwają dyskomfort związany w ukuciem. Podanie dodatkowego znieczulenia wydłużyłoby czas czynności i zwiększyło stres zwierząt.		
<b>5. Nazwa czynności: Eutanazja</b>		
<b>Opis:</b>		
Po zakończeniu podawania badanych związków będzie miała miejsce obserwacja zwierząt trwająca 4 tygodnie lub krócej, jeśli guzy przekroczą 15 mm w swojej dłuższej osi. Następnie zwierzęta zostaną uśpione w oparach 4% izofluranu i znieczulone mieszaniną medetomidyny z ketaminą w 0,9% NaCl w dawce anestetycznej na drodze iniekcji dootrzewnowej (250 µl). Po sprawdzeniu braku odruchów przy ścisnieniu paliczków i płatków uszu oraz odruchu rogówkowego po otwarciu klatki piersiowej nastąpi uśmiercenie przez skrwawienie. Zostanie pobrana krew z serca w objętości około 500 µl do analizy hematologicznej i biochemicznej. Po pobraniu próbki krwi bez wybudzania z narkozy zostanie wykonana perfuzja transkardialna roztworem PBS z dodatkiem 0,1% heparyny o temperaturze 0-4°C w celu wypłukania krwi z organizmu. Po wykonanej perfuzji do dalszych analiz histopatologicznych i molekularnych izolowane będą guzy jak i wybrane organy (płuca, wątroba, śledziona, nerki).		
Planowany do zastosowania rodzaj znieczulenia <sup>26</sup> :		
Środek	Sposób podania	Dawka
Izofluran (Aerane, Baxter)	Wziewna	0,5% (opary)
Ketamina 100mg/ml	Iniekcja dootrzewnowa	75 mg/kg
Dexdomitor (medetomidyna) 0,5mg/ml	Iniekcja dootrzewnowa	1 mg/kg
Planowane do zastosowania produkty lecznicze lub produkty lecznicze weterynaryjne o działaniu przeciwbólowym lub środki uspokajające <sup>27</sup> : nie planuje się		
Środek	Sposób podania	Dawka
Uzasadnienie dla odstąpienia od zastosowania znieczulenia i/lub zastosowania produktów leczniczych lub produktów leczniczych weterynaryjnych o działaniu przeciwbólowym lub środków uspokajających: nie ma zastosowania.		

### 8. WYKAZ OSÓB PRZEPROWADZAJĄCYCH I UCZESTNICZĄCYCH W DOŚWIADCZENIU

#### Wykaz osób przeprowadzających doświadczenie i uczestniczących w nim

L.p.	Nazwisko i imię	Rodzaj wyznaczenia <sup>32</sup>	Nr wyznaczenia	Data ważności	Kwalifikacje		
					Stopień /tytuł naukowy	Szkolenie <sup>33</sup>	Staż <sup>34</sup>
1.	Halina Waś	planujący wykonujący uśmiercający	183P/2021/IBD 183W/2021/IBD 183/2021/IBD	2026	dr	Szkolenie dla osób odpowiedzialnych za planowanie i wykonywanie procedur i doświadczeń oraz uśmiercających zwierzęta. PolLASA, 2019	10 lat
2.	Anna Mietelska-Porowska	planujący wykonujący uśmiercający	246P/2020/IBD 246W/2020/IBD 246/2020/IBD	2025	dr	Szkolenie dla osób odpowiedzialnych za planowanie i wykonywanie procedur i doświadczeń oraz uśmiercających zwierzęta. PolLasa, 2015	15 lat
3.	Grażyna Hoser	wykonujący	81W/2020/IBD	2025	dr	Szkolenie dla osób wykonujących procedury w doświadczeniach na zwierzętach. Instytut Nenckiego PAN 2015 r.	> 45 lat
4.	Karolina Hajdukiewicz	wykonujący uśmiercający	79W/2020/IBD 79/2020/IBD	2025	mgr	Szkolenie dla osób wykonujących procedury w doświadczeniach na zwierzętach. Instytut Nenckiego PAN 2015	11 lat

<sup>32</sup> Należy wpisać nazwę rodzaju wyznaczenia: planujący, wykonujący, uczestniczący, uśmiercający.

<sup>33</sup> Należy wpisać tytuł, rok i organizatora szkolenia. (Rozporządzenie MNiSW DU 8.05.2015 poz. 628)

<sup>34</sup> Należy podać całkowity czas pracy ze zwierzętami doświadczalnymi.

Użytkownik: Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk  
 Tytuł wniosku: Rola autofagii i niedotlenienia w chemooporności związanej ze starzeniem komórkowym w raku płuca i raku nerki

5.	Anna Kiryk-Jaśkiewicz	wykonujący	90W/2017/IBD	2022	dr	Szkolenie dla osób wykonujących procedury w doświadczeniach na zwierzętach. Instytut Nenckiego PAN 2017	10 lat
6.	Agata Klejman	wykonujący	91W/2020/IBD	2025	dr	Szkolenie dla osób wykonujących procedury w doświadczeniach na zwierzętach. Instytut Nenckiego PAN 2015	17 lat
7.	Bartosz Zglinicki	wykonujący	207W/2020/IBD	2025	mgr	Szkolenie dla osób wykonujących procedury w doświadczeniach na zwierzętach. Instytut Nenckiego PAN 2015	9 lat
8.	Dagmara Siwkowska	uśmiercający	460/2020/IBD	2025	mgr	Szkolenie dla osób wykonujących procedury w doświadczeniach na zwierzętach. Instytut Nenckiego PAN 2020	1 rok
9.	Agata Borkowska	uczestniczący	numer certyfikatu ukończenia szkolenia 5053/2019 (nadanie wyznaczenia w jednostce Użytkownika w toku, do uzupełnienia)	2024	mgr	Szkolenie dla osób odpowiedzialnych za planowanie i wykonywanie procedur i doświadczeń oraz uśmiercających zwierzęta. PolLASA ,2019	0
10.	Aleksandra Olszewska	uczestniczący	numer certyfikatu ukończenia szkolenia 5058/2019 (nadanie wyznaczenia w jednostce Użytkownika w toku, do uzupełnienia)	2024	mgr	Szkolenie dla osób odpowiedzialnych za planowanie i wykonywanie procedur i doświadczeń oraz uśmiercających zwierzęta. PolLASA, 2019	0

## 9. OPIS UWZGLĘDNIENIA W DOŚWIADCZENIU ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA (3R)

Projektując badanie sprawdziliśmy piśmiennictwo dotyczące planowanego eksperymentu z wykorzystaniem słów kluczowych: murine, Balbc, C57BL6, Renca, LLC1, Cisplatin, Vinblastine, HCQ, ITPP, murine tumor models, senescence, autophagy.

Na podstawie przeczytanego piśmiennictwa stwierdzamy, że nie ma w literaturze światowej badań, które tłumaczyłyby wpływ HCQ i ITPP na starzenie komórek/ ucieczki od starzenia w raku płuc i nerki. Przed zaplanowaniem badań na zwierzętach zostały przeprowadzone badania *in vitro* oraz badania *in vivo* z użyciem innego typu nowotworu – raka jelita grubego [7, 14]. Należy on podobnie jak rak płuca i rak nerki do nowotworów epithelialnych. Wykazaliśmy, że komórki stare komórki raka jelita grubego traktowane inhibitorem autofagii – bafylomycyną A1 (BAF A1) ze znacznym opóźnieniem generują komórki potomne w hodowli *in vitro*. Jednakże w modelu myszy NOD/ SCID stare komórki raka jelita grubego potraktowane BAF A1 utworzyły guzy znacznie szybciej niż komórki kontrolne. Dalsze badania molekularne wykazały, że przejściowe hamowanie autofagii przy pomocy BAF A1 może prowadzić do silnej reaktywacji autofagii w subpopulacji komórek starych i być może jest to przyczyną ich zwiększonej aktywności proliferacyjnej [7]. Wobec tych obiecujących, ale wymagających dalszego wyjaśnienia wyników pozyskaliśmy grant Sonata Bis 7 z Narodowego Centrum Nauki na szczegółowe zbadanie tych mechanizmów. Nasze badania rozszerzyliśmy o dwa dodatkowe typy nowotworów, które charakteryzują się odmienną wrażliwością na chemioterapie. Rak płuca podobnie jak rak jelita grubego stosunkowo dobrze odpowiada na chemioterapie, podczas gdy rak nerki wykazuje wysoką chemooporność. Prowadzone przez nas przez kolejne 2 lata badania *in vitro* wskazują, że zarówno w raku płuca, jak i w raku nerki stosując konkretne chemioterapeutyki możemy wyeliminować starzenie komórkowe. Co więcej, w obu przypadkach hamowanie autofagii może zmniejszać ucieczkę od starzenia indukowanego chemioterapią. Z kolei, nasze eksperymenty prowadzone w warunkach niedotlenienia (czyli hipoksji sugerują), że niedotlenienie może zwiększać ucieczkę od starzenia. Zachodzi to jednak w bardzo konkretnych układach: typ nowotworu/ konkretny lek (Olszewska A, ..., Was H, w przygotowaniu; Borkowska A, ..., Was H, w przygotowaniu). Uzyskany przez nas obszerny materiał badawczy *in vitro* wymaga teraz weryfikacji w modelach zwierzęcych. Dlatego na bazie naszych doświadczeń i wyników, a także na bazie dostępnej literatury zaprojektowaliśmy obecne badanie *in vivo*.

Poniżej przedstawiono wykonane wcześniej analizy oraz inne działania, które pozwalają istotnie zastąpić, ograniczyć lub udoskonalić procedury z wykorzystaniem zwierząt w zaplanowanym projekcie:

- Przeprowadzenie badań *in vitro* nad rolą inhibitorów autofagii (BAF A1 i HCQ) i modulatora utlenienia tkanek ITPP na trzech typach nowotworów: rak jelita grubego, rak płuca i rak nerki,
- Przeprowadzenie eksperymentu *in vivo* na myszach NOD/ SCID w celu oceny zdolności starych komórek raka jelita grubego do inicjacji nowotworzenia *in vivo* i roli BAF A1 w tym procesie,
- Przeprowadzenie badań *in vitro* nie tylko w warunkach normoksji, ale także w warunkach hipoksji, która jest istotnym elementem mikrośrodowiska guza nowotworowego. Niektóre doświadczenia przeprowadzono także w kulturach trójwymiarowych (sferoidy 3D). Takie podejście pozwala na bardziej wiarygodne i zbliżone do sytuacji *in vivo* oszacowania odpowiedzi komórek rakowych na leki (dobór: leków, dawek, schematu podawania).
- Przeprowadzenie badań *in vitro* mających na celu wyłonienie najbardziej skutecznej strategii nakierowanej na usuwanie komórek starych i/ lub hamowanie ucieczki od starzenia (zbadanie roli genów związanych z autofagią oraz metabolizmem beztlenowym z użyciem techniki siRNA, zastosowanie inhibitorów farmakologicznych). Taka strategia pozwoliła wybrać nam najbardziej obiecujący układ eksperymentalny do badań *in vivo*.

W naszym projekcie zgodnie z zasadą **Refinement** (zmniejszyć cierpienie, zapewnić dobrostan) zapewnimy myszom przebywanie w trakcie doświadczenia w klatce ze wzbogaconym środowiskiem z nieograniczonym dostępem do paszy i wody. Zapewnimy także myszom przebywanie w trakcie doświadczenia po maksymalnie 5 osobników w klatce. Opiekę codzienną oraz eksperymenty będą prowadzić wyznaczone osoby, aby nie wprowadzać dodatkowych stresorów. Zwierzęta będą utrzymywane w standardzie SPF, co zagwarantuje im czyste

klatki i brak kontaktu z potencjalnymi patogenami. Dodatkowo stan ogólny zwierząt będzie cyklicznie i w razie potrzeby konsultowany z lekarzem weterynarii.

W myśl zasady **Reduement** (zredukować) zaplanowaliśmy liczbę zwierząt na podstawie wyliczeń statystycznych do 11 osobników w grupie. Dodatkowo, zadaliśmy o zaprojektowanie prawidłowych grup kontrolnych, które zapewnią nam możliwość rzetelnej analizy uzyskanych wyników. Zgodnie z zasadą **Repalacement** (ulepszyć, zastąpić) wykonaliśmy szereg badań *in vitro* (w tym badania w hipoksji i w kulturach 3D), a także badanie *in vivo* z użyciem innego typu nowotworu epithelialnego (opis powyżej).

Jednakże, nie jesteśmy w stanie całkowicie zastąpić doświadczeń z udziałem zwierząt laboratoryjnych eksperymentami *in vitro*. W hodowlach *in vitro* nie możemy odtworzyć całej złożonej sytuacji panującej w żywym organizmie oraz czynników fizjologicznych mających wpływ na badane procesy. W badaniach dt. nowotworów odtworzenie dynamicznych interakcji komórek nowotworowych z komórkami gospodarza (komórki odpornościowe, komórki naczyń krwionośnych i komórki podścieliska) ma kluczowe znaczenie dla wzrostu i progresji nowotworu, a także dla efektywności stosowanego leczenia. Zgromadzony przez nasz zespół materiał badawczy wskazuje na zasadność zaplanowanych badań. Uzyskane wyniki na zwierzętach mogą pomóc w wyjaśnieniu zależności pomiędzy starzeniem, a autofagią oraz niedotlenieniem dla rozwoju nowotworu oraz ich znaczenia dla oporności na chemioterapie. Rezultaty naszych eksperymentów *in vivo* mogą dać podstawy do dalszych badań na etapie prób klinicznych.

#### Literatura:

1. Campisi, J., *Aging, cellular senescence, and cancer*. Annu Rev Physiol, 2013. **75**: p. 685-705.
2. Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna, *Cellular senescence: when bad things happen to good cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(9): p. 729-40.
3. Campisi, J., et al., *Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection*. Exp Gerontol, 2001. **36**(10): p. 1619-37.
4. Ewald, J.A., et al., *Therapy-induced senescence in cancer*. J Natl Cancer Inst, 2010. **102**(20): p. 1536-46.
5. Gewirtz, D.A., S.E. Holt, and L.W. Elmore, *Accelerated senescence: an emerging role in tumor cell response to chemotherapy and radiation*. Biochem Pharmacol, 2008. **76**(8): p. 947-57.
6. Kuilman, T., et al., *The essence of senescence*. Genes Dev, 2010. **24**(22): p. 2463-79.
7. Was, H., et al., *Bafilomycin A1 triggers proliferative potential of senescent cancer cells in vitro and in NOD/SCID mice*. Oncotarget, 2017. **8**(6): p. 9303-9322.
8. Sliwinska, M.A., et al., *Induction of senescence with doxorubicin leads to increased genomic instability of HCT116 cells*. Mech Ageing Dev, 2009. **130**(1-2): p. 24-32.
9. Zhang, S., et al., *Generation of cancer stem-like cells through the formation of polyploid giant cancer cells*. Oncogene, 2014. **33**(1): p. 116-28.
10. Sundaram, M., et al., *Neosis: a novel type of cell division in cancer*. Cancer Biol Ther, 2004. **3**(2): p. 207-18.
11. Erenpreisa, J. and M.S. Cragg, *Three steps to the immortality of cancer cells: senescence, polyploidy and self-renewal*. Cancer Cell Int, 2013. **13**(1): p. 92.
12. Bojko, A., et al., *Improved Autophagic Flux in Escapers from Doxorubicin-Induced Senescence/Polyploidy of Breast Cancer Cells*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(17).
13. Chulpanova, D.S., et al., *Mouse Tumor Models for Advanced Cancer Immunotherapy*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(11).
14. Was, H., et al., *Some chemotherapeutics-treated colon cancer cells display a specific phenotype being a combination of stem-like and senescent cell features*. Cancer Biol Ther, 2018. **19**(1): p. 63-75.
15. Iwata, H., et al., *A demethylating agent enhances chemosensitivity to vinblastine in a xenograft model of renal cell carcinoma*. Int J Oncol, 2011. **38**(6): p. 1653-61.
16. Sato, H., et al., *Connexin 32 potentiates vinblastine-induced cytotoxicity in renal cell carcinoma cells*. Mol Carcinog, 2007. **46**(3): p. 215-24.
17. Chuang, M.H., et al., *The Chinese medicine JC-001 enhances the chemosensitivity of Lewis lung tumors to cisplatin by modulating the immune response*. BMC Complement Altern Med, 2017. **17**(1): p. 210.
18. Hsu, H.Y., et al., *Fucoidan inhibition of lung cancer in vivo and in vitro : role of the Smurf2-dependent ubiquitin proteasome pathway in TGFbeta receptor degradation*. Oncotarget, 2014. **5**(17): p. 7870-85.

19. Fornvik, K., et al., *ITPP Treatment of RG2 Glioblastoma in a Rat Model*. *Anticancer Res*, 2016. **36**(11): p. 5751-5755.

20. Norman, M.Z., et al., *Hypoxia: a key player in antitumor immune response. A Review in the Theme: Cellular Responses to Hypoxia*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2015. **309**(9): p. C569-79.

21. Okninska, M., et al., *Treatment of hypoxia-dependent cardiovascular diseases by myo-inositol trispyrophosphate (ITPP)-enhancement of oxygen delivery by red blood cells*. *J Cell Mol Med*, 2020. **24**(3): p. 2272-2283.

22. Kieda, C., et al., *Stable tumor vessel normalization with pO(2) increase and endothelial PTEN activation by inositol trispyrophosphate brings novel tumor treatment*. *J Mol Med (Berl)*, 2013. **91**(7): p. 883-99.

#### 10. PLANOWANE METODY UŚMIERCANIA ZWIERZĄT<sup>35</sup>

W projekcie planuje się poddanie myszy eutanazji po zakończonym doświadczeniu (procedura 1 /czynność 4, procedura 2, czynność 5) i następnie pobranie narządów do dalszych analiz. Eutanazja zostanie przeprowadzona z zastosowaniem skrwawienia i perfuzji transkardialnej po uprzednim uśpieniu wziewną dawką izofluranu i dalszemu uśpieniu oraz znieczuleniu zwierząt mieszaniną medetomidyny z ketaminą zawieszoną w 0,9% NaCl w dawce anestetycznej na drodze iniekcji dootrzewnowej.

Jeśli u myszy wystąpią poniższe objawy wskazujące na cierpienie zbliżające się do niedopuszczalnego poziomu po ich zaobserwowaniu uruchomiana zostanie procedura humanitarnego zakończenia eksperymentu.

Spadek masy ciała powyżej 20%	Wystąpienie jednego z objawów
Teoretyczna objętość guza powyżej 1,5 ml (objętość guza = (szerokość <sup>2</sup> x długość/ 2)	
Jeśli guz przekształci się w wrzód	
Piloerekcja	Wystąpienie minimum trzech objawów równocześnie
Widoczne utrudnienia w oddychaniu	
Cofnięte wibrysy	
Zmrużone oczy	
Biegunka	

<sup>35</sup> W przypadku planowania zastosowania wczesnego, humanitarnego zakończenia procedury szczegółowo opisać (np. w formie tabeli) objawy będące podstawą decyzji o uśmierceniu zwierzęcia.

Użytkownik: Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk

Tytuł wniosku: Rola autofagii i niedotlenienia w chemooporności związanej ze starzeniem komórkowym w raku płuca i raku nerki

**Załączniki:**

L.p.	Nazwa załącznika	T/N
1.	Streszczenie nietechniczne	T
2.	Zgoda lekarza weterynarii na ponowne wykorzystanie zwierzęcia, (jeśli planowane doświadczenie ma być przeprowadzone z wykorzystaniem zwierzęcia w sposób określony w art. 12 Ustawy (DU 26.02.2015 poz. 266))	N
3.	Oświadczenie o działaniach podjętych w celu uzyskaniu zezwolenia, o którym mowa w art. 56 ustawy z dnia 16 kwietnia 2004 r. o ochronie przyrody; (w przypadku zwierząt dzikich objętych ochroną gatunkową)	N
4.	Oświadczenie o działaniach podjętych w celu uzyskaniu zezwolenia, o którym mowa w ustawie z dnia 22 czerwca 2001r. (Dz. U. z 2007 nr 36 poz. 233, 2009 nr. 18 poz. 97, oraz 2015r poz. 277) o mikroorganizmach i organizmach genetycznie zmodyfikowanych	N
5.	Szczegółowe uzasadnienie konieczności wykorzystania większej niż planowana liczby myszy w badaniach pilotażowych na podstawie otrzymanych wyników.	N



### STRESZCZENIE NIETECHNICZNE

Wzór Służący Przekazywaniu Nietechnicznych Streszczeń Projektów, o Których mowa w Art. 43 Ust. 1 Dyrektywy 2010/63/UE

<b>Tytuł projektu</b>	Rola autofagii i niedotlenienia w chemooporności związanej ze starzeniem komórkowym w raku płuca i raku nerki	
<b>Czas trwania projektu</b> (w miesiącach)	30 miesięcy	
<b>Słowa kluczowe</b> (maksymalnie 5) <sup>(1)</sup>	Rak, chemioterapia, starzenie, autofagia, niedotlenienie	
<b>Cel projektu</b> <sup>(2)</sup> (można wybrać więcej niż jedną odpowiedź)	— Badania podstawowe (3)	
<b>Cele i przewidywane korzyści projektu</b>		
Proszę opisać cele projektu (na przykład zbadanie pewnych niewiadomych naukowych lub odpowiedzenie na potrzeby naukowe lub kliniczne).	<p>Głównym celem proponowanych przez nas doświadczeń <i>in vivo</i> jest zbadanie, jak możemy zwiększyć efektywność chemioterapii. Chemioterapia jest wciąż najczęściej stosowanym typem terapii przeciwnowotworowej. Jednym z mechanizmów oporności na chemioterapie jest starzenie komórkowe. Jest to zjawisko potencjalnie korzystne – komórka nowotworowa przestaje się dzielić. Jednak najnowsze badania, w tym nasze, sugerują, że stare komórki nowotworowe mogą przełamywać tę barierę i wznowiać aktywność podziałową. Nasze dotychczasowe badania wskazują, że dwa procesy/ zjawiska mogą odgrywać rolę w tzw. ucieczce od starzenia komórkowego – autofagia i niedotlenienie. Autofagia to proces kataboliczny, który zwiększa odporność komórek rakowych na różne czynniki stresowe tj. chemioterapeutyki i niedotlenienie. Z kolei, niedotlenie występuje w guzach nowotworowych i zwiększa ich chemooporność. Z związku z tym proponowane przez nas doświadczenie <i>in vivo</i> ma na celu zbadanie, czy inhibitor autofagii – hydroksychlorokina (HCQ) oraz związek zwiększający utlenowanie tkanek - trispyrofosforan mio-inozytolu (ITPP) wpływają na efektywność chemioterapii w kontekście starzenia komórek rakowych i wznowy po leczeniu. Cel ten osiągniemy poprzez pomiar wielkości guzów w trakcie trwania eksperymentu, a także analizy molekularne (badanie markerów: starzenia, proliferacji, autofagii, niedotlenienia) pobranych tkanek po zakończeniu badania.</p>	
Jakie są potencjalne korzyści wynikające z tego projektu? Należy wyjaśnić, w jaki sposób	Korzyści z proponowanych przez nas doświadczeń mogą mieć wymiar nie tylko poznawczy, ale i	

<p>projekt może przyczynić się do postępów w nauce, lub też jakie ostateczne korzyści mogą z niego czerpać ludzie, zwierzęta lub środowisko. W stosownych przypadkach należy wprowadzić rozróżnienie między korzyściami krótkoterminowymi (w czasie trwania projektu) i długoterminowymi (które mogą się pojawić po zakończeniu projektu).</p>		<p>kliniczny. Po pierwsze, przeprowadzone przez nas badania mogą pogłębić wiedzę w dziedzinie biologii starzenia komórek nowotworowych i jego powiązań z procesem autofagii i niedotlenienia. Dodatkowo, w naszych badaniach uwzględniamy zjawisko niedotlenienia, które ma kluczowe znaczenie dla chemooporności komórek nowotworowych. Nasze badania wykonujemy na dwóch typach najczęściej występujących nowotworów: raku płuc i raku nerki. Testujemy też różne typy chemioterapeutyków. Stąd nasze badania mogą dostarczyć bardzo uniwersalnych wniosków i posłużyć do opracowania bardziej skutecznych metod czy schematów terapeutycznych. Co ważne, nasze badania dotyczą nowotworów, które stosunkowo dobrze odpowiadają na chemioterapie (rak płuc), jak i tych, które wykazują wysoką chemooporność (rak nerki). Jednak, w obu przypadkach efektywność leczenia chemicznego nie jest zadawalająca i wymaga optymalizacji. Wyniki naszych badań będziemy rozpowszechniać w postaci publikacji naukowych w czasopismach o dużym międzynarodowym zasięgu oraz wystąpień na konferencjach naukowych, a także podczas działalności popularnonaukowej, dzięki której wyniki naszych prac mogą dotrzeć do szerokiej opinii publicznej.</p>				
<p><b>Przewidywane szkody</b></p>						
<p>W jakich procedurach będą zazwyczaj stosowane zwierzęta (na przykład wstrzykiwanie, zabiegi chirurgiczne)? Proszę wskazać liczbę i czas trwania tych procedur.</p>		<p>Podskórne (jednorazowe) wstrzyknięcie komórek nowotworowych raka nerki lub raka płuc oraz dootrzewnowe iniekcje leków – chemioterapeutyków (winblastyna w raku nerki: 1 raz w tygodniu, przez 3 tygodnie – 3 iniekcje; cisplatna w raku płuca – co 3 dni, przez 3 tygodnie – 7 iniekcji) i badanych związków – HCQ (10 razy w ciągu 14 dni) oraz ITPP (5 razy w ciągu 14 dni) Czas trwania całego projektu około 9-11 tygodni.</p>				
<p>Jakie są przewidywane/szkodliwe skutki dla zwierząt, na przykład ból, utrata masy ciała, brak aktywności/ograniczona mobilność, stres, nietypowe zachowania i czas trwania tych skutków?</p>		<p>Ból i utrata masy ciała w wyniku rozwoju guza, stres związany z iniekcją komórek nowotworowych, a następnie z iniekcjami chemioterapeutyków i badanych związków. Dyskomfort związany z mierzaniem wielkości guza i pomiarami wagi zwierząt. Śmierć zwierząt.</p>				
<p>Zgodnie z przewidywaniami jakie gatunki i jaka liczba zwierząt będą wykorzystywane? Jaka jest oczekiwana</p>	<p>Gatunki<sup>(4)</sup></p>	<p>Szacunkowa całkowita liczba</p>	<p>Szacunkowa liczba dla każdej kategorii dotkliwości</p>			
	<p>Mysz</p>	<p>99</p>	<p>Terminalne</p>	<p>Łagodne</p>	<p>Umiarkowane</p>	<p>Dotkliwe</p>
					<p>99</p>	

dotkliwość i liczba zwierząt w każdej kategorii dotkliwości (w podziale na gatunki)?						
Co stanie się ze zwierzętami utrzymanymi przy życiu po zakończeniu procedury? <sup>(1)</sup> <sup>(6)</sup>	Szacunkowa liczba do ponownego wykorzystania 0	Szacunkowa liczba, jaka ma zostać przywrócona do siedliska przyrodniczego lub systemu hodowlanego  0	Szacunkowa liczba zwierząt objętych programami znajdowania nowego domu  0			
Proszę podać powody planowanego losu zwierząt po zakończeniu procedury.		Eutanazja zwierząt po zakończeniu eksperymentu celem pobrania tkanek (guz pierwotny, krew, inne narządy pod kątem ewentualnych przerzutów: płuca, śledziona, nerki, wątroba) i ich analizy molekularnej i histologicznej.				
<b>Stosowanie zasady 3R</b>						
<b>1. Zastąpienie</b> Proszę wskazać, jakie alternatywne rozwiązania bez wykorzystania zwierząt są dostępne w tej dziedzinie i dlaczego nie mogą być wykorzystane do celów projektu.		Biologiczne metody alternatywne obejmują wykonanie doświadczeń w hodowlach <i>in vitro</i> , z uwzględnieniem warunków niedotlenienia oraz struktury trójwymiarowej guza nowotworowego (sferoidy 3D). W naszym projekcie zgodnie z zasadą <b>zastąpienie</b> wszystkie te metody zostały przez nas wykorzystane w początkowej fazie projektu i pozwoliły nam wybrać najbardziej przemyślany i obiecujący schemat doświadczeń <i>in vivo</i> . Jednak żadna z tych metod nie pozwala odtworzyć w pełni złożoności układu biologicznego, który występuje w guzie nowotworowym. Bo guz nowotworowy to nie tylko komórki nowotworowe, ale także komórki odpornościowe, komórki naczyń krwionośnych oraz komórki podścieliska, które pozostają ze sobą w dynamicznej interakcji. Do tego dochodzą zjawiska fizyczne, takie jak niedotlenie, czy ciśnienie wewnątrz guza, które mają kluczowe znaczenie dla jego wzrostu, przerzutowania i odpowiedzi na terapie przeciwnowotworowe. Również w naszych badaniach dotyczących starzenia i ucieczki od starzenia komórek nowotworowych dopiero uwzględnienie wszystkich elementów układu daje szanse na uzyskanie wiarygodnych i				

	<p>miarodajnych wyników, które będzie można przełożyć na sytuację kliniczną.</p> <p>W naszym projekcie zgodnie z zasadą <b>ograniczenie</b> plan eksperymentu <i>in vivo</i> został przez nas opracowany na podstawie długotrwałych eksperymentów <i>in vitro</i>, które pozwoliły nam wyłonić najbardziej skuteczny i obiecujący układ eksperymentalny. Temu celowi służyły też przeprowadzone przez nas eksperymenty w warunkach niedotlenienia i w kulturach 3D. Minimalną liczbę zwierząt niezbędną do tego eksperymentu (11 osobników na grupę) oszacowano na podstawie wyliczeń statystycznych, w których założono, że zaobserwowane pomiędzy grupami różnice mają osiągnąć istotność statystyczną (<math>p &lt; 0,05</math>). W naszym badaniu przewidzieliśmy także kilka grup kontrolnych, które pozwolą nam odpowiednio zinterpretować uzyskane wyniki. Podczas eutanazji zabezpieczymy odpowiednio nie tylko krew i guzy nowotworowe, ale także inne narządy badanych zwierząt (płuca, wątrobę, śledzionę i nerki) pod kątem planowanych przez nas badań biochemicznych i histologicznych markerów starzenia, proliferacji, autofagii i niedotlenienia (RNA, białko, preparaty mrożeniowe i preparaty parafinowe). Pozwoli nam to uzyskać maksymalną ilość danych z tego eksperymentu, a także stworzyć biobank tkanek pod kątem przyszłych projektów.</p>
<p><b>2. Ograniczenie</b></p> <p>Proszę wyjaśnić, w jaki sposób określono liczbę zwierząt koniecznych do celów tego projektu. Proszę opisać kroki podjęte w celu ograniczenia liczby wykorzystywanych zwierząt oraz zasady zastosowane przy projektowaniu badania. W stosownych przypadkach, proszę opisać praktyki, które będą stosowane w całym projekcie w celu zminimalizowania liczby wykorzystywanych zwierząt zgodnie z celami naukowymi. Praktyki te mogą obejmować np. badania pilotażowe, modelowanie komputerowe, dzielenie się tkankami i ponowne wykorzystywanie.</p>	
<p><b>3. Udoskonalenie</b></p> <p>Proszę podać przykłady konkretnych środków (np. wzmożone monitorowanie, opieka kooperacyjna, terapie przeciwbólowe, trening zwierząt), które należy podjąć w związku z procedurami w celu zminimalizowania szkód dla dobrostanu zwierząt. Proszę opisać mechanizmy wprowadzania technik w zakresie łagodzenia szkód pojawiających się w czasie trwania projektu.</p>	<p>W naszym projekcie zgodnie z zasadą <b>udoskonalenie</b> zapewnimy myszom przebywanie w trakcie doświadczenia w klatce ze wzbogaconym środowiskiem z nieograniczonym dostępem do paszy i wody. Zapewnimy także myszom przebywanie w trakcie doświadczenia po maksymalnie 5 osobników w klatce. Opiekę codzienną oraz eksperymenty będą prowadzić wyznaczone osoby, aby nie wprowadzać dodatkowych stresorów. Zwierzęta będą utrzymywane w standardzie SPF, co zagwarantuje im czyste klatki i brak kontaktu z potencjalnymi patogenami. Dodatkowo stan ogólny zwierząt będzie cyklicznie i w razie potrzeby konsultowany z lekarzem weterynarii. Wszystkie procedury będą wykonywane z najwyższą starannością, a także z szacunkiem oraz empatią wobec badanych zwierząt. Zwierzęta będą regularnie monitorowane pod kątem zmian w masie ciała,</p>

	<p>wyglądzie i zachowaniu. Wszystkie przeprowadzane na nich procedury będą polegały na iniekcjach podskórnych lub dootrzewnowych oraz pomiarach guzów, które będą wykonywane przez wyspecjalizowany personel. Procedury wymagające unieruchomienia zwierząt (golenie, mierzenie guzów, iniekcje komórek nowotworowych) będą wykonywane z wykorzystaniem anestezji wziewnej (izofluran). Eutanazja zwierząt nastąpi poprzez zastosowaniem iniekcji dootrzewnowej mieszaniny związków usypiająco-znieczulających po uprzednim uśpieniu wziewnym. Jeśli u myszy wystąpią objawy wskazujące na cierpienie zbliżające się do niedopuszczalnego poziomu po ich zaobserwowaniu uruchomiana zostanie procedura humanitarnego zakończenia eksperymentu.</p>
<p>Proszę wyjaśnić wybór gatunków i powiązanych etapów życia.</p>	<p>Ekspertyzy zostaną przeprowadzone na mysich modelach syngenicznych – BALB/c dla linii raka nerki oraz C57BL6/c dla linii raka płuca. Myszy tych szczepów są najczęściej stosowane w badaniach nad chorobami nowotworowymi. Charakteryzują się łatwością w rozmnażaniu, hodowli i przeprowadzaniu procedur eksperymentalnych. Wszczepianie myszom mysich komórek linii nowotworowych, pochodzących z hodowli <i>in vitro</i>, stanowi od wielu lat dostępny i standardowy model doświadczalny. Jest on stosowany w badaniach nad procesem nowotworowym, w tym nad mechanizmem wzrostu guza pierwotnego i tworzenia przerzutów, jak również do testowania związków przeciwnowotworowych. Dodatkowo, użycie myszy immunokompetentnych w badaniach nowotworowych pozwala odtworzyć całą złożoność organizmu żywego i roli jego poszczególnych układów dla wzrostu i progresji nowotworu. Także w kontekście zaproponowanych przez nas badań, czyli zbadania efektów zastosowania inhibitora autofagii - HCQ oraz cząsteczki zwiększającej utlenowanie tkanek - ITPP w kontekście eliminacji komórek starych i/ lub zahamowania ucieczki od starzenia komórek rakowych</p>

obecność funkcjonalnego układu odpornościowego oraz krwionośnego ma kluczowe znaczenie.				
<b>Projekt wybrany do oceny retrospektywnej (*)</b>	Termin	Obejmuje dotkliwe procedury	Wykorzystuje zwierzęta z rządu naczelnych	Inna przyczyna
<p>( 1 ) W tym terminy naukowe, które mogą składać się z więcej niż pięciu pojedynczych słów, z wyłączeniem nazw gatunków i celów wprowadzonych w innym miejscu w dokumencie.</p> <p>( 2 ) Proszę zawrzeć w rozwijanym menu.</p> <p>( 3 ) Wykaz celów zgodnie z kategoriami i podkategoriami sprawozdawczości statystycznej w załączniku III do niniejszej decyzji.</p> <p>( 4 ) Gatunki zgodnie z kategoriami sprawozdawczości statystycznej określonymi w załączniku III do niniejszej decyzji, z dodatkową opcją „nieokreślonego ssaka” w celu zachowania anonimowości w wyjątkowych przypadkach.</p> <p>( 5 ) Gatunki, które należy wpisać w związku z poprzednią odpowiedzią, do wyboru spośród odpowiednich kategorii (proporcje).</p> <p>( 6 ) Możliwy wybór wielu opcji dla każdego gatunku.</p> <p>( 7 ) Można wybrać więcej niż jedną odpowiedź. Ma zastosowanie do tych państw członkowskich, w których takie informacje są wymagane zgodnie z przepisami.</p>				