

---

**mgr Aleksandra Olszewska-Banach**

**Rola autofagii i starzenia w chemooporności raka płuca:  
analiza *in vitro*, *in vivo* i materiału klinicznego**

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

Promotor: prof. dr hab. Claudine Kieda

Promotor pomocniczy: dr n. biol. 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 2023 r.

---

Słowa kluczowe: Starzenie komórkowe, autofagia, hipoksja, rak płuca

Key words: Cellular senescence, autophagy, hypoxia, lung cancer

---

Badania prezentowane w rozprawie były finansowane w ramach projektu badawczego  
Sonata Bis 7 numer 2017/26/E/NZ3/00434 Narodowego Centrum Nauki.  
Kierownik projektu: dr Halina Waś.

Część wyników i danych zaprezentowanych w tej pracy została zawarta w publikacji:  
**Olszewska A**, Borkowska A, Granica M, Karolczak J, Zglinicki B, Kieda C, Was H.  
Escape From Cisplatin-Induced Senescence of Hypoxic Lung Cancer Cells Can Be  
Overcome by Hydroxychloroquine. *Front Oncol.* 2022 Jan 21;11:738385.  
doi: 10.3389/fonc.2021.738385. eCollection 2021.



---

Pragnę serdecznie podziękować  
promotorowi prof. dr hab. Claudine Kieda  
za życzliwość, poświęcony czas oraz  
udzielenie cennych wskazówek w pracy naukowej,  
promotorowi pomocniczemu dr Halinie Waś  
za pomoc merytoryczną i cenne uwagi przy pisaniu tej pracy.

Ogromne podziękowania składam również całemu zespołowi  
Laboratorium Onkologii Molekularnej i Terapii Innowacyjnych, a w szczególności  
dr Robertowi Zdanowskiemu, dr Klaudii Brodaczewskiej, dr Agnieszce Synowiec oraz  
mgr Agacie Borkowskiej za wszechstronną pomoc i niepowtarzalną atmosferę pracy.

Dziękuję również prof. dr hab. Urszuli Wojdzie,  
dr Annie Mietelskiej-Porowskiej oraz dr Grażynie Hoser  
z Pracowni Badań Przedklinicznych o Podwyższonym Standardzie  
Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie  
za przeprowadzenie eksperymentów na zwierzętach laboratoryjnych,  
dr Sławomirowi Gołdzie oraz mgr Dżesice Hoinkis  
z firmy Intelliseq za wykonanie analiz NGS,  
dr n. med. Tomaszowi Gilowi z Oddziału Klinicznego  
Chirurgii Klatki Piersiowej i Chirurgii Onkologicznej  
Krakowskiego Specjalistycznego Szpitala im. Jana Pawła II w Krakowie  
za udostępnienie materiału tkankowego od pacjentów z rakiem płuca  
oraz wszystkim osobom zaangażowanym  
w otrzymanie wyników zaprezentowanych w tej rozprawie.



---

Mojemu wyjątkowemu Mężowi,  
za cierpliwość i ogromne wsparcie  
od początku do samego końca tej drogi.





---

## Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów: .....	4
Streszczenie .....	9
Abstract.....	12
1 Wstęp.....	14
1.1 Rak płuca.....	14
1.1.1 Drobnokomórkowy rak płuca.....	14
1.1.2 Niedrobnokomórkowy rak płuca.....	15
1.1.2.1 Leczenie.....	17
1.1.2.1.1 Leczenie chirurgiczne .....	17
1.1.2.1.2 Radioterapia.....	17
1.1.2.1.3 Chemioterapia.....	19
1.1.2.1.4 Inne terapie .....	20
1.2 Starzenie komórkowe.....	23
1.2.1 Rodzaje starzenia komórkowego .....	23
1.2.2 Ścieżki molekularne indukujące starzenie komórkowe .....	24
1.2.2.1 p53/p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> .....	25
1.2.2.2 p16 <sup>INK4a</sup> /pRB .....	26
1.2.3 Cechy komórek starych.....	26
1.2.3.1 Zahamowanie cyklu komórkowego.....	27
1.2.3.2 Zmiany morfologii komórek.....	27
1.2.3.3 SA-β-gal.....	28
1.2.3.4 SASP.....	28
1.2.3.5 Poliploidia.....	29
1.2.3.6 SAHF.....	31
1.2.4 Rola starzenia komórkowego w nowotworach .....	31
1.3 Fenotyp macierzysty .....	32
1.4 Tranzycja epithelialno-mezenchymalna.....	33
1.5 Autofagia.....	37

---

1.5.1	Etapy procesu autofagii .....	37
1.5.1.1	Inicjacja.....	38
1.5.1.2	Nukleacja .....	38
1.5.1.3	Elongacja.....	38
1.5.1.4	Fuzja i degradacja .....	39
1.5.2	Znaczenie autofagii dla komórek nowotworowych.....	39
1.6	Hipoksja.....	41
1.6.1	Molekularne mechanizmy adaptacyjne komórek w odpowiedzi na hipoksję .	42
1.6.2	Znaczenie hipoksji dla mikrośrodowiska komórek nowotworowych .....	44
1.7	Metabolizm beztlenowy .....	46
2	Założenia i cel pracy .....	49
3	Materiały i metody.....	50
3.1	Użyte odczynniki.....	50
3.2	Zastosowane metody badawcze .....	50
3.2.1	Hodowle komórkowe .....	50
3.2.2	Ogólny schemat eksperymentalny.....	51
3.2.3	Wyciszanie genów metodą siRNA.....	51
3.2.4	Hamowanie aktywności LDH za pomocą oksamatu sodu .....	52
3.2.5	Hamowanie autofagii z zastosowaniem hydroksychlorokiny .....	52
3.2.6	Aktywacja p53 przy użyciu Nutliny-3 .....	53
3.2.7	Pomiar aktywności metabolicznej- test MTT.....	53
3.2.8	Pomiar proliferacji komórek- test BrdU.....	54
3.2.9	Oznaczanie aktywności SA-β-galaktozydazy .....	54
3.2.10	Pomiar stężenia białka całkowitego w lizatach komórkowych- test BCA .....	55
3.2.11	Oznaczanie hipertrofii komórek .....	56
3.2.12	Badanie ekspresji białek z użyciem hybrydyzacji western-blot.....	56
3.2.13	Analiza wielkości i ziarnistości komórek oraz ich rozkładu w cyklu komórkowym z użyciem cytometrii przepływownej.....	58
3.2.14	Izolacja RNA.....	59

---

3.2.15	Odwrotna transkrypcja .....	60
3.2.16	Ilościowa reakcja łańcuchowej polimerazy- qPCR.....	61
3.2.17	Sekwencjonowanie następnej generacji- NGS.....	62
3.2.18	Eksperymenty <i>in vivo</i> .....	63
3.2.19	Pobieranie materiału od pacjentów .....	64
3.2.20	Analiza statystyczna.....	64
4	Wyniki .....	66
4.1	Wyznaczenie dawek chemioterapeutyków powodujących zahamowanie proliferacji 66	
4.2	Badanie wpływu hipoksji na starzenie komórek nowotworowych indukowane chemioterapeutykami.....	69
4.2.1	Hipoksja zmniejsza fenotyp starzeniowy komórek leczonych cisplatyną .....	69
4.2.2	Hipoksja zmienia rozkład w cyklu komórkowym po leczeniu cisplatyną .....	74
4.2.3	Hipoksja powoduje wzrost ekspresji białek promujących cykl komórkowy po leczeniu cisplatyną.....	76
4.2.4	Ucieczce od starzenia komórek leczonych cisplatyną w hipoksji towarzyszy zmniejszenie sygnalizacji p53/p21 .....	77
4.2.5	Hipoksja promuje fenotyp mezenchymalny komórek starych niezależnie od użytego leku.....	81
4.3	Badanie wpływu hamowania aktywności LDH na ucieczkę od starzenia komórek leczonych cisplatyną w hipoksji .....	82
4.3.1	Wyciszenie genów LDHA i LDHB nie zmienia aktywności metabolicznej i proliferacyjnej.....	82
4.3.2	Inhibicja LDH poprzez użycie oksamatu sodu nie wpływa na aktywność proliferacyjną.....	84
4.4	Ocena inhibicji autofagii w zahamowaniu ucieczki od starzenia komórek leczonych cisplatyną w hipoksji .....	85
4.4.1	Wyciszenie genów autofagicznych powoduje zmiany aktywności metabolicznej i proliferacyjnej .....	87
4.4.2	Hydroksychlorokina powoduje zahamowanie proliferacji komórek traktowanych CIS w hipoksji.....	90

---

4.4.3	Hydroksychlorokina nie zmienia ekspresji białek związanych ze ścieżką starzeniową p53/p21, ale zmniejsza ekspresję białek związanych z progresją cyklu komórkowego .....	92
4.5	Badanie ekspresji czynników indukowanych niedotlenieniem oraz E-kadheryny w komórkach leczonych cisplatiną i hydroksychlorokina .....	95
4.6	Badanie ekspresji genów i białek związanych z macierzystością .....	96
4.7	Badanie wpływu hydroksychlorokiny na ekspresję genów z zastosowaniem metody sekwencjonowania następnej generacji.....	98
4.8	Eksperyment pilotażowy <i>in vivo</i> .....	108
4.9	Markery niedotlenienia i macierzystości w guzach od pacjentów z NDRP .....	110
5	Dyskusja.....	113
6	Wnioski.....	130
7	Bibliografia .....	132
8	Opinia Komisji Bioetycznej lub Etycznej.....	147
8.1	Opinia Komisji Bioetycznej .....	147
8.2	Opinia Komisji Etycznej .....	148

---

## Spis rycin i tabel

Ryc. 1.1. Typy histologiczne raka płuca oraz podtypy NSCLC. ....	16
Ryc. 1.2. Główne szlaki molekularne prowadzące do starzenia komórkowego. ....	26
Ryc. 1.3. Regulacja cyklu komórkowego. ....	27
Ryc. 1.4. Mechanizmy prowadzące do poliploidii. ....	30
Ryc. 1.5. Schemat tranzycji epithelialno-mezenchymalnej (EMT) oraz procesu odwrotnego (MET). ....	34
Ryc. 1.6. Etapy autofagii. ....	37
Ryc. 1.7. Niedotlenienie komórek nowotworowych, w zależności od ich położenia względem naczyń krwionośnych. ....	41
Ryc. 1.8. Mechanizm regulacji ekspresji genów związanych z niedotlenieniem w zależności od dostępności tlenu. ....	43
Ryc. 4.1. Podstawowy schemat eksperymentalny. ....	66
Ryc. 4.2. Wpływ chemioterapeutyków na aktywność metaboliczną (MTT) oraz proliferacyjną komórek A549 w normoksji i hipoksji. ....	67
Ryc. 4.3. Wpływ CIS na aktywność metaboliczną oraz proliferacyjną komórek LLC1 w normoksji. ....	68
Ryc. 4.4. Wpływ chemioterapeutyków na aktywność SA- $\beta$ -gal w normoksji i hipoksji. ....	70
Ryc. 4.5. Wpływ chemioterapeutyków na ziarnistość i hipertrofię komórek A549 w normoksji i hipoksji. ....	71
Ryc. 4.6. Wpływ chemioterapeutyków na zmiany liczby komórek A549 w normoksji i hipoksji. ....	72
Ryc. 4.7. Wpływ CIS na starzenie komórek LLC1 w normoksji i hipoksji. ....	73
Ryc. 4.8. Wpływ chemioterapeutyków oraz warunków tlenowych na dystrybucję ludzkich komórek raka płuca A549 w cyklu komórkowym. ....	75
Ryc. 4.9. Wpływ chemioterapii na ekspresję białek proliferacyjnych ludzkich komórek raka płuca A549 w normoksji i hipoksji. ....	76
Ryc. 4.10. Wpływ chemioterapii na ekspresję białek starzeniowych ludzkich komórek raka płuca A549 w normoksji i hipoksji. ....	78
Ryc. 4.11. Wpływ NUT na morfologię oraz liczbę komórek A549 traktowanych CIS w niedotlenieniu. ....	79
Ryc. 4.12. Wpływ NUT na ekspresję białek starzeniowych i proliferacyjnych komórek A549 traktowanych CIS w niedotlenieniu. ....	80
Ryc. 4.13. Wpływ chemioterapeutyków na tranzycję epithelialno-mezenchymalną komórek A549 w normoksji i hipoksji. ....	81
Ryc. 4.14. Schemat eksperymentów z wyciszaniem genów. ....	83

---

Ryc. 4.15. Wpływ wyciszania genów dehydrogenaz mleczanowych (LDH) na aktywność metaboliczną i proliferacyjną komórek A549 leczonych CIS w normoksji i hipoksji. ....	83
Ryc. 4.16. Wpływ inhibitora dehydrogenazy mleczanowej (SO) na proliferację komórek A549 leczonych CIS w normoksji i hipoksji. ....	84
Ryc. 4.17. Wpływ chemioterapeutyków na ekspresję białek autofagicznych oraz białek szlaku kinazy mTOR komórek A549 w normoksji i hipoksji. ....	86
Ryc. 4.18. Ocena skuteczności wyciszania genów autofagicznych w komórkach raka płuca A549 leczonych CIS w normoksji i hipoksji. ....	88
Ryc. 4.19. Wpływ wyciszania genów autofagicznych na aktywność metaboliczną, proliferacyjną i liczbę komórek A549 leczonych CIS w normoksji i hipoksji. ....	89
Ryc. 4.20. Wpływ inhibitora autofagii (HCQ) na aktywność metaboliczną i proliferację komórek A549 leczonych CIS w normoksji i hipoksji. ....	90
Ryc. 4.21. Wpływ inhibitora autofagii (HCQ) na liczbę komórek ludzkiego i mysiego raka płuca leczonych CIS w normoksji i hipoksji. ....	91
Ryc. 4.22. Wpływ HCQ na ekspresję białek autofagicznych komórek A549 w normoksji i hipoksji. ....	92
Ryc. 4.23. Wpływ HCQ na aktywność SA- $\beta$ -gal komórek A549 leczonych CIS w normoksji i hipoksji. ....	93
Ryc. 4.24. Wpływ HCQ na ekspresję białek starzeniowych i proliferacyjnych komórek A549 leczonych CIS w normoksji i hipoksji. ....	94
Ryc. 4.25. Wpływ HCQ na ekspresję E-kadheryny i genów związanych z odpowiedzią na hipoksję w komórkach A549 leczonych CIS w normoksji i hipoksji. ....	95
Ryc. 4.26. Wpływ HCQ na ekspresję genów związanych z fenotypem macierzystym komórek A549 leczonych CIS w normoksji i hipoksji. ....	96
Ryc. 4.27. Wpływ HCQ na ekspresję białek związanych z fenotypem macierzystym komórek A549 leczonych CIS w normoksji i hipoksji. ....	97
Ryc. 4.29. Volcano plot CIS H vs CIS 5+HCQ H. ....	99
Ryc. 4.30. Mapa cieplna przedstawiająca geny o statystycznie istotnych różnicach dla porównania CIS H vs CIS +HCQ H. ....	100
Ryc. 4.31. Diagram Venna genów o zwiększonej ekspresji komórek leczonych CIS w porównaniu z dodatkowym leczeniem HCQ w hipoksji i normoksji. ....	101
Ryc. 4.32. Analiza terminów bazy KEGG wśród genów o zwiększonej ekspresji w komórkach leczonych CIS w porównaniu z dodatkowym leczeniem HCQ w hipoksji. ....	102
Ryc. 4.33. Analiza terminów bazy KEGG wśród genów o zwiększonej ekspresji w komórkach leczonych CIS w porównaniu z dodatkowym leczeniem HCQ w normoksji. ....	103

---

Ryc. 4.34. Analiza terminów bazy KEGG wśród genów o zwiększonej ekspresji w komórkach leczonych CIS w porównaniu z dodatkowym leczeniem HCQ w obu warunkach tlenowych. ....	104
Ryc. 4.35. Diagram Venna genów o zmniejszonej ekspresji komórek leczonych CIS w porównaniu z dodatkowym leczeniem HCQ w hipoksji i normoksji. ....	105
Ryc. 4.36. Analiza terminów bazy KEGG wśród genów o zmniejszonej ekspresji w komórkach leczonych CIS w porównaniu z dodatkowym leczeniem HCQ w hipoksji. ....	106
Ryc. 4.37. Analiza terminów bazy KEGG wśród genów o zmniejszonej ekspresji w komórkach leczonych CIS w porównaniu z dodatkowym leczeniem HCQ w obu warunkach tlenowych. ....	107
Ryc. 4.38 Wpływ leczenia CIS na objętość i masę guzów. ....	109
Ryc. 4.39. Analiza ekspresji genów związanych z niedotlenieniem w tkankach pacjentów z rakiem płuc. ....	111
Ryc. 4.40. Analiza ekspresji genów związanych z macierzystością w tkankach pacjentów z rakiem płuc. ....	112
Tab. 1.1. Stopnie zaawansowania NSCLC). ....	18
Tab. 3.1. Skład 2 x stężonej mieszaniny reakcyjnej do odwrotnej transkrypcji, na podstawie instrukcji producenta. ....	60
Tab. 3.2. Profil temperaturowy reakcji odwrotnej transkrypcji, na podstawie instrukcji producenta. ....	61
Tab. 3.3. Wykaz starterów użytych do reakcji qPCR. ....	61
Tab. 3.4. Profil temperaturowy reakcji qPCR, na podstawie instrukcji producenta. ....	62
Tab. 4.1. Charakterystyka RNA użytego do sekwencjonowania. ....	98
Tab. 4.2. Charakterystyka RNA wyizolowanego z guzów od pacjentów z NDRP użytego do odwrotnej transkrypcji. ....	110

---

### Wykaz stosowanych skrótów:

3-MA	– 3-metyloadenina
ALK	– (ang. Anaplastic Lymphoma Kinase) kinaza chłoniaka anaplastycznego
AMPK	– (ang. AMP-activated protein kinase) kinaza białkowa aktywowana przez AMP
APS	– (ang. Ammonium persulfate) nadsiarcezan amonu
ASCO	– (ang. American Society of Clinical Oncology) Amerykańskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej
ASF1a	– (ang. Anti-silencing factor 1a) czynnik przeciw wyciszeniu 1a
ATGs	– (ang. Autophagy-Related Genes) geny związane z autofagią
ATM	– (ang. Ataxia Telangiectasia Mutated) zmutowana kinaza ataksji teleangiektazji
ATR	– (ang. Ataxia Telangiectasia Rad 3-related) kinaza związana z kinazą ATM i helikazą Rad3
BCA	– (ang. Bicinchoninic acid) kwas dwucynchoninowy
Bcl-2	– (ang. B-cell leukaemia/lymphoma 2) białko 2 związane z białaczką limfocytów B
BCN1	– (ang. Beclin 1) beklina 1
BRAF	– (ang. V-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B) homolog B wirusa mysiego mięsaka V-Raf
BrdU	– (ang. 5-Bromo-2-deoxyUridine) 5-bromo-2'-deoksyurydyna
BSA	– (ang. Bovine serum albumin) albumina surowicy bydłowej
CCND2	– (ang. Cyclin D2) cyklina D2
CDK	– (ang. Cyclin dependent kinase) kinaza cyklinozależna
CDKN1A	– (ang. Cyclin dependent kinase inhibitor 1A) inhibitor kinazy cyklinozależnej 1A
CDKN2A	– (ang. Cyclin dependent kinase inhibitor 2A) inhibitor kinazy cyklinozależnej 2A
CHK1	– (ang. Checkpoint kinase 1) kinaza punktu kontrolnego 1
CHK2	– (ang. Checkpoint kinase 2) kinaza punktu kontrolnego 2
CIS	– cisplatyna
CPM	– (ang. Counts per million) ilość zliczeń na milion
CSCs	– (ang. Cancer stem cells) nowotworowe komórki macierzyste
Ct	– (ang. Threshold cycle) cykl progowy
DAPI	– (ang. 4'-6-diamidino-2-phenylindole) 4',6-diaminoino-2-fenylindol
DDR	– (ang. DNA damage response) odpowiedź na uszkodzenie DNA
DEGs	– (ang. Differentially expressed genes) geny o zmienionej ekspresji
DMSO	– (ang. Dimethyl Sulfoxide) dimetylosulfotlenek
DNA	– (ang. Deoxyribonucleic acid) kwas deoksyrybonukleinowy
dNTP	– (ang. Deoxyribonucleotide triphosphate) trójfosforan deoksyrybonukleotydu
DOC	– docetaxel
E2F	– (ang. E2 transcription factor) czynnik transkrypcyjny E2
EGFR	– (ang. Epidermal growth factor receptor) receptor naskórkowego czynnika wzrostu
EGLN3	– (ang. Egl-9 family hypoxia inducible factor 3) czynnik indukowany niedotlenieniem 3 z rodziny Egl-9
ELISA	– (ang. Enzyme-linked immunosorbent assay) test immunoenzymatyczny



---

EMT	– (ang. Epithelial to mesenchymal transition) tranzycja epitelialno-mezenchymalna
EPO	– (ang. Erythropoietin) erytropoetyna
ER	– (ang. Endoplasmic reticulum) retikulum endoplazmatyczne
ERCC1	– (ang. Excision repair cross-complementing gene 1) gen naprawy przez wycięcie i uzupełnienie krzyżowe
ES-SCLC	– (Extensive-stage small-cell lung cancer) stadium rozległe drobnokomórkowego raka płuc
FAK	– (ang. Focal adhesion kinase) kinaza adhezji ogniskowej
FBS	– (ang. Fetal bovine serum) wołowa surowica płodowa
FDA	– (ang. Food and Drug Administration) Agencja Żywności i Leków
FDR	– (ang. False discovery rate,) wskaźnik fałszywych wykryć
FGF	– (ang. Fibroblast growth factor) czynnik wzrostu fibroblastów
FGFR1	– (ang. Fibroblast growth factor receptor 1) receptor 1 czynnika wzrostu fibroblastów
FIP200	– (ang. Focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa) białko oddziałujące z rodziną kinaz adhezji ogniskowej 200 kDa
FSC	– (ang. Forward scatter characteristic) charakterystyka rozproszenia od przodu
GLUT-1	– (ang. Glucose transporter 1) transporter glukozy 1
HCQ	– (ang. Hydroxychloroquine) hydroksychlorokina
HIFs	– (ang. Hypoxia-inducible factors) czynniki indukowane niedotlenieniem
HIRA	– (ang. Histone regulator A) regulator histonu A
HP-1	– (ang. Heterochromatin protein 1) białko heterochromatyny 1
HRE	– (ang. Hypoxia Response Element) element odpowiedzi na niedotlenienie
HRP	– (ang. Horseradish peroxidase) peroksydaza chrzanowa
IGFBP7	– (ang. Insulin like growth factor binding protein 7) białko wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu 7
IHC	– (ang. immunohistochemistry) immunohistochemia
IL	– (ang. Interleukin) interleukina
JAK-STAT	– (ang. Janus kinase-signal transducer and activator of transcription) transduktor sygnału kinazy Janus i aktywator transkrypcji
KEGG	– (ang. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Kyoto encyklopedia genów i genomów
KLF4	– (ang. Kruppel-Like Factor 4) czynnik transkrypcyjny 4 podobny do czynników Kruppel
KRAS	– (ang. Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) homolog onkogenu wirusowego mięsaka Kirsten szczura
LC3	– (ang. Microtubule-associated protein light chain 3) związane z mikrotubulami lekkie łańcuchy białka 3
<i>LDH</i>	– (ang. Lactate Dehydrogenase) dehydrogenaza mleczanowa
LS-SCLC	– (ang. Limited-Stage Small-Cell Lung Cancer) stadium ograniczone drobnokomórkowego raka płuc
MDM2	– (ang. Murine double minute 2) białko wiążące p53
MDR1	– (ang. Multidrug resistance 1) gen oporności wielolekowej 1
MDSCs	– (ang. Myeloid derived stromal cells) komórki zrębowe pochodzenia szpikowego

---

MET	– (ang. Mesenchymal to epithelial transition) przejście mezenchymalno-nabłonkowe
MMP	– (ang. Matrix metalloproteinase) metaloproteinaza macierzy
MRP2	– (ang. Multidrug Resistance-Associated Protein 2), związane z opornością wielolekową białko 2
MSC	– (ang. Mesenchymal Stromal Cells) mezenchymalne komórki zrębowe
mTOR	– (ang. Mammalian target of rapamycin) ssaczy cel rapamycyny
mTORC1	– (ang. Mechanistic target of rapamycin complex 1) mechanistyczny cel kompleksu rapamycyny 1
MTT	– (ang. 3-(4,5-diMethyl-2-Thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-Tetrazolium bromide) bromek 3-(4,5- dimetylotiazol-2-yl)-2,5- difenylotetrazolowy
NADPH	– (ang. Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate) fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego
NF-κB	– (ang. Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) czynnik jądrowy oddziałujący ze wzmacniaczem sekwencji lekkiego łańcucha immunoglobuliny w aktywowanych limfocytach B
NGS	– (ang. Next generation sequencing) sekwencjonowania następnej generacji
NK cells	– (ang. Natural Killer cells)- komórki NK
NLR	– (ang. NOD-like receptor) receptor typu NOD
NO	– (ang. Nitric oxide) tlenek azotu
NOD	– (ang. Nucleotide-binding Oligomerization Domain) domena zdolna do wiązania nukleotydów i oligomeryzacji
NOS3	– (ang. Nitric oxide synthase 3) <i>syntaza tlenku azotu 3</i>
NSCLC	– (ang. Non-small-cell lung cancer) niedrobnokomórkowy rak płuca
NTRK	– (ang. Neurotrophic tyrosine receptor kinase) neurotroficzny receptor kinazy tyrozynowej
NUT	– (ang. Nutlin-3) nutlina-3
OCT-3/4	– (ang. Octamer-binding Transcription Factor 4), wiążący octamer czynnik transkrypcyjny 4
OIS	– (ang. Oncogene-induced senescence) starzenie komórkowe indukowane onkogenem
PAD4	– (ang. Peptidyl arginine deiminase 4), deiminaza peptydyloargininowa 4
PAI-1	– (ang. Plasminogen activator inhibitor 1) inhibitor aktywatora plazminogenu 1
PBS	– (ang. Phosphate buffered saline) bufor fosforanowy
PCNA	– (ang. Proliferating cell nuclear antigen) jądrowy antygen dzielącej się komórki
PD-1	– (ang. Programmed death receptor 1) receptor programowanej śmierci komórki 1
PD-L1	– Ligand programowanej śmierci 1
PDGF	– (ang. Platelet-derived growth factor) czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego
PDT	– (ang. Photodynamic therapy) terapia fotodynamiczna
PE	– (ang. Phosphatidylethanolamine) fosfatydyloetanolamina
PET	– (ang. Positron emission tomography) pozytonowa tomografia emisyjna
PFKFB3	– (ang. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3) 6-fosfofrukto-2-kinaza/fruktozo-2,6-bisfosfataza III
PFOB	– (ang. Perfluorooctyl bromide) bromek perfluorooktylu

---

PGCCs	– (ang. Polyploid giant cancer cells) polipoidalne olbrzymie komórki nowotworowe
PI	– (ang. Propidium iodide) jodek propidyny
PI3K	– (ang. Phosphoinositide 3-kinase) 3-kinaza fosfatydyloinozytolu
PI3P	– (ang. Phosphatidylinositol 3-phosphate) 3-fosforan fosfatydyloinozytolu
PIK3CA	– (ang. Phosphatidylinositol-3-kinase catalytic subunit alpha) podjednostka katalityczna $\alpha$ 3-kinazy fosfatydyloinozytolu
PKM2	– (ang. Pyruvate kinase M2) izoforma M2 kinazy pirogronianowej
qPCR	– (ang. quantitative polymerase chain reaction) ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy
RAS	– (ang. Rat sarcoma viral oncogene) onkogen wirusowy mięsaka szczura
Rb	– (ang. Retinoblastoma-associated protein) białko związane z siatkówczakiem
RIN	– (ang. RNA Integrity Number) współczynnik integralności RNA
RNA	– (ang. Ribonucleic acid) kwas rybonukleinowy
ROS	– (ang. Reactive oxygen species) reaktywne formy tlenu
RS	– (ang. Replicative Senescence) starzenie replikacyjne
RT	– (ang. Room temperature) temperatura pokojowa
RZS	– reumatoidalne zapalenie stawów
SAHF	– (ang. Senescence-associated heterochromatin foci) skupiska heterochromatyny związane ze starzeniem
SASP	– (ang. Senescence-associated secretory phenotype) fenotyp wydzielniczy związany ze starzeniem
SA- $\beta$ -gal	– (ang. Senescence-associated $\beta$ -galactosidase) $\beta$ -galaktozydaza związana ze starzeniem
SCLC	– (ang. Small-cell lung cancer) drobnokomórkowy rak płuca
SDS	– (ang. Sodium dodecyl sulphate) siarczan dodecyłu sodu
SEM	– (ang. Standard error of measurement) standardowy błąd pomiaru
SIPS	– (ang. Stress-induced premature senescence) starzenie komórkowe wywołane stresem
SO	– (ang. Sodium oxamate) oksamat sodu
SOX-2	– (ang. sex determining region Y-box 2) region determinujący płęć Y-box 2
SPF	– (ang. Specific pathogen free) wolny od określonych czynników chorobotwórczych
SSC	– (ang. Side scatter characteristic) charakterystyka rozproszenia bocznego
TAM	– (ang. Tumor-associated macrophage) makrofag związany z nowotworem
TBST	– (ang. Tris Buffered Saline with Tween) bufor trisowy z dodatkiem tween
TEMED	– (ang. N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina
TG	– (ang. Tris-glycine) bufor tris-glicyna
TGF- $\beta$ 1	– (ang. Transforming growth factor- $\beta$ 1) transformujący czynnik wzrostu- $\beta$ 1
TGS	– (ang. Tris-glycine-SDS) bufor tris-glicyna-SDS
TIMP1	– (ang. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1) tkankowy inhibitor metaloproteiny 1

---

TIS	– (ang. Therapy-induced senescence) starzenie wywołane terapią
TKI	– (ang. Tyrosine-kinase inhibitor) inhibitor kinazy tyrozynowej
TNF	– (ang. Tumor Necrosis Factor) czynnik martwicy nowotworów
ULK1	– (ang. Unc-51 like autophagy activating kinase 1) Unc-51 typu aktywującej autofagię kinazy 1
UVRAG	– (ang. UV-resistance associated gene) gen związany z odpornością na promieniowanie UV
VEGF	– (ang. Vascular endothelial growth factor) czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego
VEGFR	– (ang. Vascular endothelial growth factor receptor) receptor dla czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego
VHL	– (ang. Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein) białko supresora nowotworu von Hippel-Lindau
X-gal	– (ang. 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -d-galactopyranoside) 5-bromo-4-chloro-3-indolilo-beta-D-galaktopiranozyd
YAP	– (ang. Yes-Associated Protein) białko związane z białkiem YES
ZEB-1	– (ang. Zinc-finger E-box Binding Homeobox 1) palec cynkowy E-box wiążący homeobox 1

---

## Streszczenie

Jedną z najczęściej stosowanych metod leczenia raka płuca w stadium zaawansowanym jest chemioterapia. Jednakże często zastosowana terapia nie przynosi zadowalających efektów i po zakończonym leczeniu dochodzi do nawrotu nowotworu opornego na leczenie. Jednym z możliwych mechanizmów takiego zjawiska jest rozwój starzenia indukowanego terapią (TIS). Komórki stare wykazują szereg charakterystycznych cech takich jak: wzrost aktywności enzymu SA- $\beta$ -galaktozydazy, fenotyp wydzielniczy związany ze starzeniem (SASP), poliploidia, czy zatrzymanie cyklu komórkowego. Ta ostatnia cecha jest korzystna z punktu widzenia terapii pacjentów nowotworowych. Jednakże najnowsze badania sugerują, że komórki TIS mogą powracać do aktywności podziałowej, doprowadzając do wznowy choroby nowotworowej. W kontekście badania odpowiedzi komórkowej na terapie przeciwnowotworowe kluczowe znaczenie ma mikrośrodowisko guza, którego cechą charakterystyczną jest niedotlenienie. Komórki nowotworowe mogą adaptować się do niedotlenionego środowiska poprzez różne mechanizmy, do których należą zmiany metaboliczne oraz modulacja autofagii. Jednakże dokładny związek pomiędzy tymi mechanizmami a TIS w warunkach niedotlenienia pozostaje niejasny. Dlatego też celem tej pracy było zbadanie roli niedotlenienia w rozwoju TIS komórek raka płuca w odpowiedzi na chemioterapię oraz wpływu modulacji metabolizmu beztlenowego i autofagii na ten proces.

W tym celu komórki raka płuca hodowano w warunkach normoksyjnych (~19% O<sub>2</sub>) lub w hipoksji (1% O<sub>2</sub>) oraz poddano chemioterapii. Użyto leków najczęściej stosowanych w terapii pacjentów: uszkadzającej DNA cisplatyny oraz terapeutyków zaburzających dynamikę mikrotubul – docetakselu i winorelbiny. Po zakończeniu eksperymentu zbadano komórki pod kątem markerów TIS.

Otrzymane wyniki wykazały, że warunki niedotlenienia powodowały wzrost oporności na cisplatynę poprzez ucieczkę od starzenia komórkowego, czego nie zaobserwowano podczas zastosowania trucizn mikrotubul. Komórki leczone cisplatyną w niedotlenieniu charakteryzowały się zmniejszoną aktywnością SA- $\beta$ -galaktozydazy oraz zmniejszonym udziałem komórek w fazie G2/M cyklu komórkowego w porównaniu do warunków normoksyjnych. Ponadto niedotlenienie zwiększało aktywność proliferacyjną oraz odsetek komórek w fazie G0/G1. Poszukując mechanizmu molekularnego odpowiedzialnego za ten efekt stwierdzono, że

---

niedotlenienie osłabiało prostarzeniową sygnalizację związaną ze szlakiem p53-p21, a także indukowało tranzycję epithelialno-mezenchymalną.

Podczas badania wpływu modulacji metabolizmu beztlenowego lub autofagii na zaobserwowaną oporność na cisplatynę w niedotlenieniu zastosowano wyciszanie genów związanych z tymi procesami lub farmakologiczne inhibitory. Zahamowanie aktywności enzymu odpowiedzialnego za metabolizm beztlenowy (LDH) nie zmieniło efektu niedotlenienia na ucieczkę komórek przed starzeniem podczas leczenia cisplatyną. Natomiast skuteczne w tym celu okazało się zahamowanie autofagii poprzez użycie farmakologicznego inhibitora, hydroksychlorochiny (HCQ). W perspektywie krótkoterminowej HCQ zmniejszała proliferację niedotlenionych komórek raka płuca leczonych cisplatyną. Dodatkowo analiza NGS wśród genów o zmniejszonej ekspresji pod wpływem HCQ wykazała nadreprezentację genów związanych z terminami cyklu komórkowego, replikacji DNA, ścieżek naprawy DNA bazy KEGG, co może stanowić mechanizmy uwrażliwiające komórki na leczenie oparte na lekach platynowych. Z drugiej strony, geny o zwiększonej ekspresji były nadreprezentowane w terminach związanych z odpowiedzią na infekcje oraz z układem immunologicznym i reakcją zapalną, które mogą potencjalnie odgrywać rolę w progresji nowotworu.

Próba oceny efektu działania HCQ na komórki stare leczone cisplatyną w mysim modelu *in vivo* nie doszła do skutku z powodu gwałtownego wzrostu guzów przed podaniem HCQ. Może to być związane z wystąpieniem niedotlenienia w wyindukowanych guzach i obserwowaną *in vitro* opornością na cisplatynę w niedotlenieniu, jednakże potwierdzenie tej hipotezy wymaga pogłębionych badań.

Ponieważ niedotlenienie okazało się kluczowym czynnikiem w ucieczce przed starzeniem komórek raka płuca leczonych cisplatyną zasadnym jest badanie markerów niedotlenienia przed podaniem tego leku. Z tego względu zbadano ich ekspresję w próbkach pobranych od pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca. U części pacjentów wykazano zróżnicowaną ekspresję czynników indukowanych hipoksją w obu badanych próbkach, wskazując na heterogenność guzów pod względem niedotlenienia. Ponadto wzmożona ekspresja genów HIF częściowo korespondowała ze wzrostem markerów macierzystości, sugerując potencjalną rolę niedotlenienia w promowaniu macierzystego fenotypu komórek raka płuca.

Podsumowując, niedotlenienie sprzyja ucieczce komórek rakowych przed starzeniem się wywołanym cisplatyną. Można ją jednak przezwyciężyć poprzez hamowanie autofagii za pomocą HCQ. Zatem HCQ może stanowić potencjalny

---

terapeutyk zmniejszający chemooporność w niedotlenionych obszarach guza podczas stosowania leków platynowych. Jednakże długotrwały efekt takiej terapii wymaga przetestowania w badaniach przedklinicznych i klinicznych.

---

## Abstract

Chemotherapy is one of the most commonly used treatments for advanced lung cancer. However, often the therapy does not bring satisfactory results and after the treatment is completed, the therapy resistant cancer recurs. One of the possible mechanism for this occurrence is the development of Therapy Induced Senescence (TIS). Senescent cells show a number of characteristic features, such as: an increase in the activity of the specific enzyme SA- $\beta$ -galactosidase, the Senescence Associated Secretory Phenotype (SASP), polyploidy or cell cycle arrest. The last one is beneficial for the treatment of cancer patients, however, recent studies suggest that TIS cells may revert to proliferative activity, leading to relapse of the neoplastic disease. The tumor microenvironment, characterized by hypoxia, is of key importance in the context of studying the cellular response to oncological therapies. Cancer cells can adapt to the hypoxia through various mechanisms including metabolic modifications and autophagy modulation, but the exact relationship between these mechanisms and TIS under hypoxic conditions remains unclear. Therefore, the aim of the study was to investigate the role of hypoxia in TIS development of lung cancer cells in response to chemotherapy and the influence of anaerobic metabolism or autophagy modulation in this process.

For this purpose, lung cancer cells were cultured under normoxic (~ 19% O<sub>2</sub>) or hypoxic (1% O<sub>2</sub>) conditions and received chemotherapy. The drugs most often used in the treatment of patients were applied: cisplatin, which damages DNA and therapeutics that disrupt the microtubules dynamics - docetaxel and vinorelbine. At the end of the experiment, TIS markers were tested.

The obtained results showed, that hypoxic conditions increased resistance to cisplatin by escaping from cellular senescence, which was not observed after microtubule poisons. The cells treated with cisplatin under hypoxia showed a reduced activity of SA- $\beta$ -galactosidase and a decreased proportion of cells in the G<sub>2</sub>/M phase of the cell cycle compared to normoxic conditions. Moreover, hypoxia increased proliferative activity and the percentage of cells in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase. In searching for the molecular mechanism responsible for this effect, it was found that hypoxia caused downregulation of the pro-senescence signaling associated with the p53-p21 pathway, and also induced epithelial to mesenchymal transition.

To study the effect of modulation of anaerobic metabolism or autophagy on the observed cisplatin resistance in hypoxia related to these processes genes silencing or



---

pharmacological inhibitors were used. Inhibition of the enzyme responsible for anaerobic metabolism (LDH) did not change the hypoxia effect on senescence escaping during cisplatin treatment. In contrast, autophagy inhibition through the use of a pharmacological inhibitor, hydroxychloroquine (HCQ), proved to be effective for this purpose. In the short term, HCQ reduces the proliferation of hypoxic lung cancer cells treated with cisplatin. In addition, NGS analysis showed, that among the down-regulated genes under the influence of HCQ revealed an overrepresentation of genes related to the terms of the cell cycle, DNA replication, and DNA repair pathways in KEGG base, which may be mechanisms to sensitize cells to platinum drug treatment. On the other hand, upregulated genes were overrepresented in terms related to infection response, immune system and inflammatory response, which could potentially play a role in tumor progression.

An attempt to evaluate the effect of HCQ on senescent cells treated with cisplatin in an *in vivo* murine model was unsuccessful due to the rapid growth of tumors prior to HCQ administration. This may be related to the occurrence of hypoxia in induced tumors and the observed *in vitro* resistance to cisplatin in hypoxia, however, in-depth research is required to confirm this hypothesis.

Since hypoxia proved to be a key factor in senescence escaping in cisplatin-treated lung cancer cells, it is reasonable to test hypoxia markers before administering this drug. Therefore, their expression was studied in samples from patients with non-small cell lung cancer. In some patients, different expression of hypoxia-induced factors was demonstrated in both tested samples, indicating the lung tumor heterogeneity. Moreover, the increased expression of HIF genes partially corresponded to the increase of stem markers, suggesting the role of hypoxia in promoting the stem phenotype of lung cancer cells.

In summary, hypoxia promotes the escape of cancer cells from cisplatin-induced senescence, which can be overcome by autophagy inhibition with HCQ. Thus, HCQ may be a potential therapeutic to reduce cancer relapses associated with senescence escaping in the response to platinum drugs in hypoxic tumor sites. However, the long-term effect of such therapy requires testing in preclinical and clinical trials.

---

## 1 Wstęp

### 1.1 Rak płuca

Rak płuca jest jednym z najczęściej diagnozowanych nowotworów oraz wiodącą przyczyną zgonów związanych z rakiem na całym świecie. W Stanach Zjednoczonych ponad połowa pacjentów otrzymuje rozpoznanie w przedziale wiekowym pomiędzy 55 a 74 lat. Mediana wieku w momencie diagnozy to 70 lat, a mediana zgonu to 72 lata [1]. Każdego roku przybywa około 2,2 miliona nowych przypadków, natomiast liczba zgonów wynosi 1,79 miliona [2]. Warto podkreślić, że zarówno zapadalność jak i śmiertelność na ten typ nowotworu jest wyższa u mężczyzn. Szacuje się, że w 2018 roku 1,2 miliona zgonów dotyczyło mężczyzn, a około 576 100 kobiet [3].

Palenie tytoniu jest głównym czynnikiem ryzyka, odpowiadającym za 80-90% wszystkich diagnoz raka płuca [3]. Wskaźniki zachorowalności i śmiertelności na raka płuc są ściśle skorelowane z wzorcami palenia papierosów. Można zaobserwować ich wyraźne wzrosty wraz z nasileniem palenia, a następnie spadki po rozpoczęciu kompleksowych programów kontroli tytoniu [4]. Długofalowe skutki palenia papierosów elektronicznych nie są znane, ale myszy wystawione na ich ekspozycję były bardziej podatne na rozwój gruczolakoraka płuc niż myszy kontrolne [5]. Innymi czynnikami ryzyka rozwoju raka płuc jest obciążenie rodzinne, zwłóknienie płuc, zakażenie wirusem niedoboru odporności, alkohol, narażenie na azbest, promieniowanie jonizujące oraz substancje toksyczne takie jak wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, metale ciężkie (nikiel, arsen, chrom) czy radon [6, 7].

Rak płuca jest chorobą niejednorodną pod względem histologicznym i można ją podzielić na 2 główne podtypy: drobnokomórkowy i niedrobnokomórkowy rak płuca. Znakomita większość rozpoznań- około 85% - to rak niedrobnokomórkowy, natomiast pozostałe przypadki dotyczą raka drobnokomórkowego [2].

#### 1.1.1 Drobnokomórkowy rak płuca

Drobnokomórkowy rak płuca (ang. Small-Cell Lung Cancer, SCLC) stanowi 15% wszystkich przypadków raka płuca [2]. Charakteryzuje się szybkim tempem wzrostu oraz wysokim stopniem przerzutowości, przez co wykazuje wysoki wskaźnik śmiertelności. Każdego roku około ćwierć miliona osób zapada na SCLC, a 200 tysięcy umiera z tego powodu [8]. SCLC jest jednym z nowotworów o najsilniejszym związku z paleniem tytoniu, w którym najczęstszymi zmianami molekularnymi jest inaktywacja

---

dwóch supresorów nowotworowych: p53 oraz RB (ang. Retinoblastoma-associated protein) [9, 10].

Biorąc pod uwagę stopień zaawansowania można wyróżnić dwa główne stadia SCLC: stadium ograniczone (ang. Limited-Stage Small-Cell Lung Cancer, LS-SCLC) oraz stadium rozległe (Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer, ES-SCLC), stanowiące około 70% przypadków. Cechą rozgraniczającą oba stadia jest obecność przerzutów odległych (w ES-SCLC) lub ich brak [11]. Przerzuty najczęściej są lokalizowane w przeciwległym płucu, mózgu, wątrobie, nadnerczach i kościach [8].

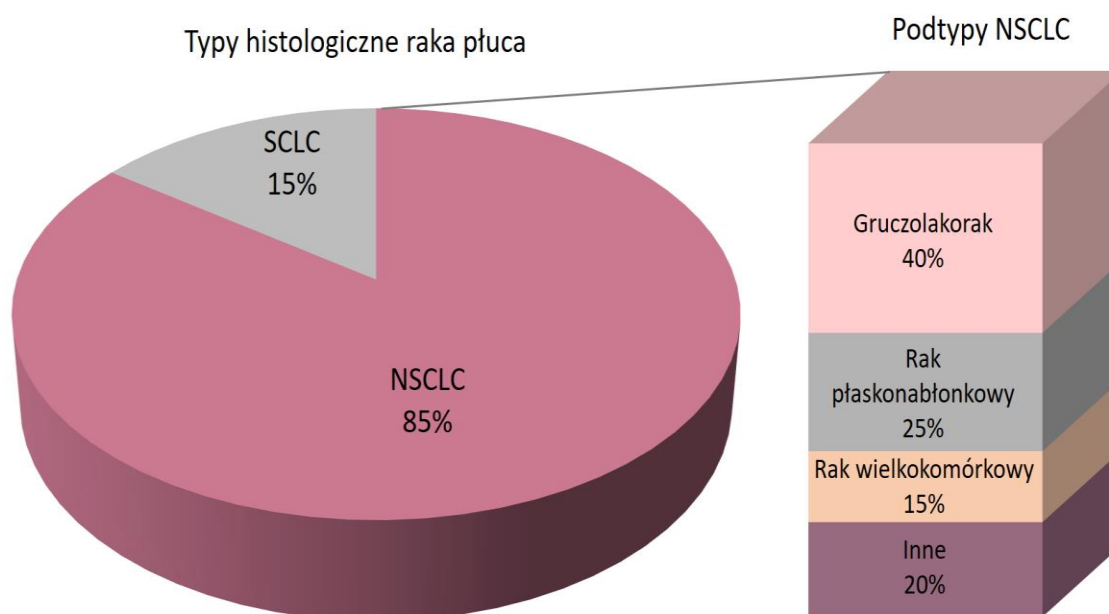
Główny problem w leczeniu SCLC stanowi fakt, że po początkowo wysokim wskaźniku odpowiedzi dochodzi do progresji choroby, często odpornej na dalsze leczenie [12]. Terapia LS-SCLC najczęściej obejmuje skojarzenie radio- oraz chemioterapii, którą standardowo jest połączenie cisplatyny z etopozydem. W bardzo wczesnym stadium wykorzystywana jest również resekcja chirurgiczna [13]. Niestety, zdecydowana większość przypadków to zaawansowany ES-SCLC, dla którego standardowa terapia oparta na platynie z etopozydem charakteryzuje się medianą przeżycia wynoszącą jedynie 10,3 miesiąca. W ostatnich latach do chemioterapii dołączono inhibitory immunologicznych punktów kontrolnych, jednak tylko nieznacznie zwiększyły one medianę przeżycia do 13 miesięcy [14].

### **1.1.2 Niedrobnokomórkowy rak płuca**

Najczęstsza postać raka płuca to rak niedrobnokomórkowy (ang. Non-Small-Cell Lung Cancer, NSCLC). WHO sklasyfikowała NSCLC na 3 główne typy: gruczolakorak, rak płaskonabłonkowy i rak wielkokomórkowy. Istnieje również kilka wariantów oraz kombinacje podtypów klinicznych (Ryc. 1.1.) [7].

Zarówno u palaczy, jak i niepalących pacjentów niezależnie od ich wieku oraz płci najczęstszym podtypem NSCLC jest gruczolakorak, stanowiący 40% wszystkich przypadków raka płuca. Rozwija się z małych komórek nabłonka dróg oddechowych - pęcherzyków płucnych typu II - wydzielających śluz i inne substancje. Gruczolakorak występuje zwykle na obrzeżach płuc i w porównaniu do innych podtypów histologicznych charakteryzuje się wolniejszym tempem wzrostu [15, 16]. Niestety, często jest rozpoznawany w stadium przerzutowym i mimo rozwoju nowych metod leczenia nadal pozostaje bardzo agresywnym nowotworem o całkowitym czasie przeżycia poniżej 5 lat [16]. Szacuje się, że ponad 50% gruczolakoraków jest obarczonych mutacjami warunkującymi obecność aktywnych czynników onkogennych.

Mutacje te są niezbędne do inicjacji i wzrostu guza. Często dotyczą genów kontrolujących proliferację i przeżycie. Do genów najczęściej zmutowanych w przypadku gruczolakoraka należą KRAS, EGFR i ALK [16, 17].



**Ryc. 1.1. Typy histologiczne raka płuca oraz podtypy NSCLC.**

Na podstawie: Schabath, M.B. and M.L. Cote, *Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2019. 28(10): p. 1563-1579.

Rak płaskonabłonkowy obejmuje około 25-30% wszystkich przypadków raka płuca. Powstaje z komórek nabłonka płaskiego w nabłonku dróg oddechowych w oskrzelach oraz w mięszu płuca, przy czym najczęściej lokalizuje się w proksymalnej części płuca. Co ciekawe, morfologicznie charakteryzuje się wyjątkową łuskowatością. Ponadto ten podtyp NSCLC jest silnie skorelowany z paleniem papierosów [15, 18]. Szczególnie powszechne w tym typie nowotworu są zmiany w genach supresorowych, TP53 i CDKN2A, a badania sugerują, że ponad połowa pacjentów z płaskonabłonkowym rakiem płuca nosi mutacje w przynajmniej jednym z nich. Innymi genami często zmutowanymi u tych pacjentów są PTEN, PIK3CA, KEAP1, MLL2, NFE2L2, RB1, SOX-2, CCND2, NOTCH1/2, MET i FGFR1, przy czym subklony guza mogą wykazywać różne kombinacje mutacji [19, 20]. Jednakże w przeciwieństwie do gruczolakoraka mutacje kierujące nie są w tym przypadku częste, dlatego też testowane w raku płaskonabłonkowym terapie celowane wykazywały ograniczoną skuteczność [18].

---

Przypadki raka wielkokomórkowego stanowią około 10% do 15% przypadków NSCLC i są silnie związane z paleniem papierosów [3, 15]. Ten typ raka nie wykazuje dojrzewania płaskonabłonkowego lub gruczołowego, w wyniku czego często jest diagnozowany domyślnie z wykluczeniem innych możliwości. W ostatnich latach częstość jego występowania zmniejsza się dzięki nowszym technikom immunofenotypowania, pozwalającym na lepszą klasyfikację gorzej zróżnicowanych NSCLC poprzednich dwóch typów. Wielkokomórkowy rak płuca jest zazwyczaj słabo zróżnicowany i złożony z dużych komórek z obfitą cytoplazmą i powiększonymi jąderkami. Jego rozwój często zaczyna się w centralnej części płuc, czasami w pobliskich węzłach chłonnych i ścianie klatki piersiowej oraz w odległych narządach [7, 15].

### **1.1.2.1 Leczenie**

Leczenie pacjentów z NSCLC zwykle obejmuje operację, radioterapię, chemioterapię, immunoterapię lub terapię celowaną molekularnie, pojedynczo lub w połączeniu. Dobór odpowiedniej terapii zależy od stadium rozwoju, histologii, zmian genetycznych i stanu pacjenta [5]. Klasyfikacja TNM (Tab. 1.1) określa stopień zaawansowania raka płuca w zależności od wielkości, lokalizacji i rozległości guza pierwotnego (T), obecności i lokalizacji zajęcia węzłów chłonnych (N) oraz obecności lub braku odległej choroby przerzutowej (M) [21].

#### **1.1.2.1.1 Leczenie chirurgiczne**

Pacjenci z NSCLC w stadium IA- IIB mogą odnieść korzyści z chirurgicznej resekcji leczniczej, a dla pacjentów z chorobą w stadium IIIA - IV rzadko ten rodzaj terapii jest korzystny [21]. Nowotwory w stadium IB - IIB bez zajęcia węzłów chłonnych oraz nadające się do całkowitej resekcji chirurgicznej, mogą być leczone chirurgią, po której następuje terapia adiuwantowa. Nowotwory lokalnie inwazyjne lub podejrzane o zajęcie bliskich węzłów chłonnych (N1) powinny zostać poddane chemioterapii neoadjuwantowej, mającej na celu zmniejszenie liczby guzów przed resekcją chirurgiczną [22].

#### **1.1.2.1.2 Radioterapia**

Ten rodzaj terapii może być stosowany we wszystkich stadiach choroby w celu wyleczenia lub jako leczenie paliatywne, które może pomóc kontrolować lub

eliminować guzy w określonych miejscach w ciele [23]. Korzyści z radioterapii mogą odnieść również pacjenci z NSCLC zlokalizowanym w klatce piersiowej, którzy nie kwalifikują się do resekcji chirurgicznej bądź nie reagują na operację lub chemioterapię [15].

<b>Stopień w klasyfikacji TNM</b>	<b>Opis</b>
IA	guzy do 3 cm bez zajęcia węzłów
IB	guzy wielkości 3-5 cm lub posiadające cechy takie jak naciekanie opłucnej trzewnej lub zajęcie oskrzela głównego bez zajęcia węzłów
IIA	guzy wielkości jak w stopniach IA-IB z zajętymi bliskimi węzłami chłonnymi lub guzy 5-7 cm bez zajętych węzłów
IIB	guzy jak w stopniu IIA (5-7 cm) z zajętymi bliskimi węzłami chłonnymi, do tej grupy należą również guzy bez zajętych węzłów takie jak: wielkości powyżej 7 cm, naciekające klatkę piersiową, przeponę lub śródpiersie opłucnej, obejmujące oskrzele główne lub osobny guzek nowotworowy w tym samym płacie
IIIA	guzy z wszystkich poprzednich grup z zajęciem węzłów drugiego stopnia oraz guzy grupy IIB z zajęciem bliskich węzłów chłonnych, ponadto guz dowolnej wielkości z naciekiem serca, dużych naczyń, tchawicy, nerwu krtaniowego wstecznego, przełyku, trzonu kręgu lub ostrogi tchawicy oraz oddzielny guzek lub guzki w innym płacie po tej samej stronie bez zajęcia węzłów lub z zajętymi węzłami bliskimi
IIIB	guzy z poprzednich grup z zajętymi węzłami trzeciego stopnia oraz guz dowolnej wielkości z naciekiem serca, dużych naczyń, tchawicy, nerwu krtaniowego wstecznego, przełyku, trzonu kręgu lub ostrogi tchawicy oraz oddzielny guzek lub guzki w innym płacie po tej samej stronie z zajętymi węzłami drugiego stopnia lub chłonnymi
IV	guzy z dowolnym odległym przerzutem, w tym oddzielne guzki nowotworowe w płacie przeciwległym, guzki opłucnej, złośliwy wysięk lub przerzuty do narządu poza klatką piersiową

**Tab. 1.1. Stopnie zaawansowania NSCLC).**

*Na podstawie: Woodard, G.A., K.D. Jones, and D.M. Jablons, Lung Cancer Staging and Prognosis. Cancer Treat Res, 2016. 170: p. 47-75.*

---

Radioterapia wykorzystuje wysokoenergetyczne wiązki do niszczenia komórek nowotworowych poprzez uszkodzenie ich DNA. Najczęściej w radioterapii wykorzystywane jest promieniowanie X, będące rodzajem promieniowania elektromagnetycznego. Promieniowanie X zwane jest również jonizującym. Wywołuje jonizację tkanek, powstającą w wyniku wybicia elektronu z orbity atomu. W ten sposób tworzone są wolne rodniki o wysokiej reaktywności chemicznej, na które szczególnie wrażliwe są cząsteczki DNA, ulegające uszkodzeniu [24]. Uszkodzenia mogą polegać na: pęknięciach pojedynczej nici, nieprawidłowej naprawie oraz aberracjach chromosomowych. Skutkiem tych zdarzeń jest śmierć komórki w wyniku katastrofy mitotycznej lub starzenie komórkowe [25].

### **1.1.2.1.3 Chemioterapia**

Większość pacjentów z NSCLC w III stopniu zaawansowania to kandydaci niechirurgiczni, dla których aktualnym standardem leczenia jest równoczesna chemioradioterapia, a następnie immunoterapia [5]. Około 40% nowozdiagnozowanych pacjentów z rakiem płuca jest w stadium IV. Dla nich cytotoksyczna chemioterapia skojarzona jest terapią pierwszego rzutu, na którą może mieć wpływ między innymi rozpoznanie histologiczne, wiek czy stan sprawności. Dla pacjentów kwalifikujących się do leczenia Amerykańskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej (ang. American Society of Clinical Oncology, ASCO) zaleca najczęściej schemat dwulekowy platyny (cisplatyna lub karboplatyna) w połączeniu z paklitakselem, gemcytabiną, docetakselem, winorelbiną, irynotekaniem lub pemetreksedem [15].

Przedstawicielem leków opartych na platynie jest cisplatyna. Ze względu na swoją zdolność do sieciowania zasad purynowych w DNA cisplatyna może powodować stres oksydacyjny, uszkodzając w ten sposób DNA i zakłócając jego mechanizmy naprawcze. Najpoważniejsze wady tego leku to wysoka toksyczność i szybkie tempo degradacji [26, 27]. Niższą toksyczność od cisplatyny wykazuje jej pochodna karboplatyna. Charakteryzuje się ona wolniejszą kinetyką, co ma znaczenie szczególnie w łagodzeniu nefrotoksyczności [28].

Gemcytabina również jest chemioterapeutyką, którego działanie zlokalizowane jest w obrębie DNA. Będąc antymetabolitem pirymidynowym wykazuje aktywność przeciwnowotworową poprzez hamowanie syntezy komórkowego DNA [29]. Kolejnym lekiem mającym zastosowanie w leczeniu NSCLC uszkodzającym DNA jest irynotekan. Celem irynotekanu jest topoizomeraza I, której główną funkcją jest

---

usuwanie naprężeń nici DNA, powstałych podczas replikacji oraz transkrypcji. Skutkiem zaburzenia funkcji topoizomerazy I przez irynotekan jest powstawanie pęknięć DNA [30]. Innym lekiem działającym na poziomie DNA jest pemetreksed - analog kwasu foliowego, który hamuje działanie kilku enzymów zależnych od folianów. Enzymy te są zaangażowane w syntezę tymidyny i nukleotydów purynowych będących produktami pośrednimi syntezy DNA i RNA. Skutkiem działania pemetreksedu jest zablokowanie proliferacji komórek rakowych [31].

Taksany, do których należą paklitaksel i docetaksel, to grupa środków przeciwnowotworowych, działających poprzez wspomaganie tworzenia mikrotubul i zapobieganie ich rozpadaniu. Skutkiem wywołanej w ten sposób stabilizacji mikrotubul jest zahamowanie mitozy a w konsekwencji promowanie śmierci komórek. W przypadku NSCLC leczenie skojarzone leku platynowego z taksanem jest podstawą chemioterapii systemowej, a także adiuwantowej i neoadiuwantowej [32]. Przeciwny mechanizm działania prezentuje winorelbina, należąca do grupy związków zwanych alkaloidami Vinca. Winorelbina hamuje polimeryzację mikrotubul, również prowadząc do zablokowania cyklu komórkowego [33].

Stosowanie chemioterapii niesie za sobą wiele ciężkich i różnorodnych efektów ubocznych. Jest to związane z faktem, że leki te celują w cykl komórkowy, przez co są mało specyficzne wobec komórek nowotworowych i mogą uszkadzać również komórki prawidłowe o szybkim tempie proliferacji [34]. Do najpowszechniejszych efektów ubocznych należy: wypadanie włosów, wymioty, biegunka, wysypka, ból, zapalenie błon śluzowych oraz duszności. Ponadto występują długoterminowe skutki chemioterapii związane z niepłodnością, występowaniem wtórnych nowotworów, lekoopornością oraz wznową nowotworu [34, 35].

#### **1.1.2.1.4 Inne terapie**

Odkrycia ostatnich lat, dotyczące występowania mutacji genetycznych w raku płuca pozwoliły na rozwój terapii celowanej [36]. W raku płuca najczęściej wykrywanymi zmianami pozwalającymi na terapię ukierunkowaną dotyczą genów: EGFR (10%–30%), ALK (5%), ROS1 (1%–2%), RET (1%–2%), BRAF V600E (1%–3%), MET Exon 14 (2%–4%) i NTRK (0,2%) [5]. Mutacją, wobec której najszerszej stosowany jest ten typ terapii, dotyczy genu receptora naskórkowego czynnika wzrostu (ang. Epidermal Growth Factor, EGFR). EGFR odgrywa kluczową rolę w regulowaniu proliferacji, apoptozy i innych funkcji komórkowych. Często dochodzi do mutacji



---

aktywujących EGFR, które powodują niekontrolowany wzrost komórek. Lekami specyficznymi blokującymi EGFR są inhibitory kinazy tyrozynowej (TKI) [36, 37]. Terapia celowana poprawiła wyniki kliniczne u znacznej części pacjentów z NDRP z zaawansowaną chorobą. Obecnie jest ona zatwierdzona do leczenia kilku podtypów pacjentów z NSCLC [5]. Zatwierdzonymi przez FDA lekami w tym typie terapii są:

- Gefitynib, Erlotinib, Afatynib, Osymertynib i Dakomitynib (EGFR),
- Kryzotynib, Ceritinib, Alektynib, Brygatynib, Lorlatinib (ALK),
- Kryzotynib, Entrektynib (ROS1),
- Larotrektynib, Entrektynib (NTRK),
- Pralsetinib, Selperkatynib (RET),
- Kapmatynib, Tepotinib (MET) [38].

Poza terapiami celowanymi również immunoterapia radykalnie zmodyfikowała możliwości leczenia NSCLC. Komórki nowotworowe mają wiele mechanizmów immunosupresyjnych, aby uciec przed odpowiedzią immunologiczną organizmu. Dlatego immunoterapia wykorzystuje koncepcję aktywacji lub regulacji układu odpornościowego w celu identyfikacji i zabicia tych komórek [38]. Najszerze zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej znalazły przeciwciała terapeutyczne skierowane w receptor programowanej śmierci komórki 1 (ang. Programmed Death Receptor 1, PD-1) oraz jego ligand (PD-L1). Receptor PD-1 ulega ekspresji na aktywowanych limfocytach T cytotoksycznych, pomocniczych, limfocytach B, monocytach, komórkach NK (ang. Natural Killer cells, NK cells) oraz komórkach dendrytycznych. Po połączeniu receptora PD-1 z jego ligandem na powierzchni komórek nowotworowych dochodzi do aktywacji sygnałów pozwalających im uniknąć nadzoru immunologicznego [39]. Poza rolę immunosupresyjną, ekspresja PD-L1 związana jest z fenotypem macierzystym oraz mezenchymalnym komórek nowotworowych, a także opornością na terapię [40].

Przeciwciała PD1 / PD-L1 są obecnie zatwierdzone do leczenia zaawansowanego NSCLC w monoterapii i w połączeniu z chemioterapią [41]. Do tej grupy leków należą między innymi: atezolizumab, durwalumab, nivolumab czy pembrolizumab. Stosowanie tych środków wymaga specyficznych badań w celu oceny poziomu ekspresji PD-L1 na komórkach nowotworowych za pomocą barwienia IHC [36].

Alternatywą w leczeniu nowotworów jest stosowanie inhibitorów angiogenezy. Angiogeneza stanowi ważny cel w terapii nowotworów, ponieważ poprzez rozwój nowych naczyń krwionośnych sprzyja wzrostowi guza, dostarczając składników

---

odżywczych i tlenu. Złożony proces angiogenezy jest regulowany przez czynniki proangiogenne, takie jak czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF), czynnik wzrostu fibroblastów (ang. Fibroblast Growth Factor, FGF), czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego (Platelet-Derived Growth Factor, PDGF) oraz angiopoetyny. Najbardziej popularna jest terapia anti-VEGF i anti-receptor VEGF (VEGFR). Jednakże terapia antyangiogenna stosowana samodzielnie nie poprawia znacząco wyników pacjentów, ponieważ hamowanie tworzenia się naczyń przekształca komórki nowotworowe w fenotyp oporny na hipoksję. Dlatego też inhibitory angiogenezy łączy się z innymi terapiami [37, 42].

Terapia fotodynamiczna (ang. Photodynamic Therapy, PDT) zabija komórki rakowe poprzez fotouczulanie docelowego guza za pomocą ekspozycji na światło widzialne o określonej długości fali. W przeciwieństwie do radioterapii zapewnia niejonizujące promieniowanie elektromagnetyczne, wywołujące śmierć docelowych komórek nowotworowych bez wywierania ogólnoustrojowych działań niepożądanych [43]. Głównym mechanizmem wywoływania toksyczności w tym przypadku jest apoptoza spowodowana działaniem wysoce reaktywnego tlenu singletowego wytwarzanego podczas PDT. Ten typ terapii jest stosowany w leczeniu różnych nowotworów, w tym minimalnie inwazyjnego raka płuc [43, 44]. Innymi technikami ablacyjnymi wykorzystywanymi przy zajęciu dróg oddechowych są laseroterapia, elektrokoagulacja oraz krioterapia [45].

Terapie przeciwnowotworowe mają na celu wywołanie śmierci komórki na drodze apoptozy. Jednakże środki terapeutyczne obok apoptozy mogą ograniczyć wzrost guza również poprzez starzenie komórkowe. Zjawisko starzenia jest szeroko opisywane jako odpowiedź na terapię komórek nowotworowych, w tym komórek raka płuca [46, 47], jednak znaczenie tego procesu dla efektywności terapii w dużej mierze pozostaje niejasne. Niewątpliwie pozytywną cechą starzenia komórkowego w kontekście nowotworu jest zahamowanie proliferacji komórek. Istnieją jednak kontrowersje, czy w dłuższej perspektywie starzenie komórek nowotworowych jest korzystne, ponieważ komórki te mogą nabierać oporności na bodźce apoptotyczne oraz przyczyniać się do progresji i nawrotów choroby [48]. Z tego powodu badanie starzenia komórkowego może być kluczowe w poznaniu przyczyny powstania chemooporności oraz niepowodzeń terapeutycznych w raku płuca.

---

## 1.2 Starzenie komórkowe

Starzenie komórkowe jest odpowiedzią charakteryzującą się zatrzymaniem cyklu komórkowego oraz specyficznymi zmianami molekularnymi i fenotypowymi [49]. Znaczenie starzenia komórkowego dla organizmu nie jest jednoznaczne. Z jednej strony zapewnia supresję guza nowotworowego oraz odgrywa rolę podczas embriogenezy i gojenia się ran. Z drugiej jednak, utrata zdolności replikacyjnych komórek starych może powodować defekty w regeneracji tkanek, sprzyja utrzymywaniu się stanu zapalnego oraz przyczynia się do chorób związanych z wiekiem [49, 50].

Badania wskazują, że starzenie komórkowe związane jest ze starzeniem całego organizmu, przy czym nie dowiedziono jednoznacznie, czy komórki starzeją się w wyniku starzenia organizmu, czy też organizm starzeje się z powodu zmian na poziomie pojedynczych komórek [51]. Jednakże terapie senolityczne wykazują, że selektywna eliminacja starzejących się komórek może zapobiegać lub opóźniać związane z wiekiem dysfunkcje tkanek. Może to sugerować, że to właśnie zmiany na poziomie komórkowym niosą za sobą zmiany na wyższych poziomach organizacyjnych organizmu [52].

### 1.2.1 Rodzaje starzenia komórkowego

Najwcześniej odkrytym rodzajem starzenia się komórek jest starzenie replikacyjne (ang. Replicative Senescence, RS). Jest ono związane z osiągnięciem maksymalnej liczby podziałów komórkowych nazwane od nazwiska odkrywcy „limitem Hayflicka”. W 1961 roku Hayflick i Moorhead zaobserwowali w hodowli fibroblastów, że komórki po określonej liczbie podziałów przestają się dzielić, pozostając przy tym żywe nawet przez kilka miesięcy. Obalili tym samym panujące do tamtej pory przekonanie o nieograniczonej liczbie podziałów komórek w hodowlach *in vitro* [51, 53].

Główną przyczyną osiągnięcia limitu podziałowego i w konsekwencji starzenia replikacyjnego jest skracanie się telomerów przy każdej rundzie podziałowej. Telomery są to tandemowe powtórzenia nukleotydów, znajdujące się na zakończeniach chromosomów, które zabezpieczają kodujące części materiału genetycznego [54, 55]. Telomery mogą zostać wydłużone przez enzym telomerazę, której aktywność różni się w zależności od typu komórek. U ludzi w komórkach zróżnicowanych ekspresja telomerazy jest ograniczona. Najwyższa jej aktywność występuje w linii zarodkowej oraz w komórkach progenitorowych, zapewniając w ten sposób nieograniczoną liczbę podziałów. Bardzo wysoki poziom telomerazy obserwowany jest w aż 90% ludzkich

---

nowotworów, przez co komórki nowotworowe są określane mianem „nieśmiertelnych” [56].

Również aktywacja onkogenu może powodować starzenie (ang. Oncogene-Induced Senescence, OIS), zapobiegając w ten sposób transformacji onkogennej [57]. Po raz pierwszy ten rodzaj starzenia zaobserwowano w ludzkich fibroblastach, które wykazywały zatrzymanie cyklu komórkowego oraz zwiększeniu markerów komórek starych po ekspresji onkogenu RAS [58].

Do starzenia może dojść również w wyniku ostrej i szybkiej odpowiedzi na stresujące bodźce. Ten typ starzenia określono jako przedwczesne starzenie wywołane stresem (ang. Stress-Induced Premature Senescence, SIPS). Został on opisany przez naukowców, którzy zauważyli fenotyp charakterystyczny dla komórek starych oraz zahamowanie ich cyklu komórkowego przez działanie stresu oksydacyjnego, wywołanego nadtlaniem wodoru [59]. Obok stresu oksydacyjnego czynnikami wywołującymi SIPS są między innymi czynniki uszkadzające DNA czy też wyczerpanie składników odżywczych [60].

Jednym z rodzajów SIPS jest starzenie wywołane terapią (ang. Therapy-Induced Senescence, TIS). Termin ten obejmuje starzenie po ekspozycji komórek na terapie przeciwnowotworowe takie jak chemio- czy radioterapia [60]. Pierwszymi udokumentowanymi lekami przeciwnowotworowymi wywołującymi TIS w hodowlach komórkowych były środki genotoksyczne: cisplatyna i doksorubicyna [61, 62]. Rozwój TIS został również wykazany w wielu badaniach *in vivo*. W najnowszych pracach dowiedziono, że u pacjentów z glejakiem pod wpływem promieniowania jonizującego, czy u pacjentek z rakiem piersi poddanych chemioterapii neoadjuwantowej dochodzi do indukcji fenotypu starzeniowego [63, 64]. To właśnie szczegółowe badanie tego rodzaju starzenia może pomóc w określeniu przyczyn nawrotu choroby nowotworowej odpornej na leczenie, które jest ogromnym zadaniem w celu poprawy przeżycia pacjentów z nowotworami.

### **1.2.2 Ścieżki molekularne indukujące starzenie komórkowe**

Czynniki indukujące stres komórkowy, w tym terapie przeciwnowotworowe wywołują uszkodzenia DNA, które prowadzą do aktywacji sygnalizacji DDR (ang. DNA Damage Response, DDR). Sygnalizacja DDR doprowadza do zatrzymania podziałów komórkowych w celu uniemożliwienia przekazywania uszkodzonego DNA do komórek potomnych. Jeżeli uszkodzenie DNA nie zostanie naprawione, przedłużona

---

aktywacja DDR prowadzi do apoptozy lub starzenia. Sugeruje się, że znaczące, krótkotrwałe uszkodzenie DNA aktywuje apoptozę, podczas gdy długotrwałe i łagodne - starzenie komórkowe [52]. Aktywacja DDR jest inicjowana w wyniku wykrycia podwójnych pęknięć DNA przez kinazę ATM (ang. Ataxia Telangiectasia Mutated) lub w efekcie pęknięć pojedynczej nici przez kinazę ATR (ang. Ataxia Telangiectasia Rad 3-related). Jednym z pierwszych substratów kinaz ATR i ATM jest białko histonowe H2AX, które ulega fosforylacji w pozycji Ser139 tworząc formę  $\gamma$ -H2AX, aktywującą kaskadę sygnałów DDR. Kinazy ATM i ATR następnie fosforylują kinazy punktów kontrolnych CHK1 i CHK2, które stabilizują białko p53 [65, 66]. Niezależnie od bodźców napędzających sygnalizację DDR, prowadzi ona do aktywacji białka p53 indukującego starzenie komórkowe [52].

### 1.2.2.1 p53/p21<sup>WAF1/CIP1</sup>

Ścieżka sygnalizacyjna p53/p21<sup>WAF1/CIP1</sup> może zostać uaktywniona przez uszkodzenia DNA aktywujące szlak DDR. Kinazy CHK1/2 fosforylują białko p53, prowadząc do jego stabilizacji. Następnie aktywny p53 promuje transkrypcję genu CDKN1A, kodującego inhibitor kinaz p21, którego ekspresja powoduje zahamowanie cyklu komórkowego (Ryc. 1.2.) [67, 68].

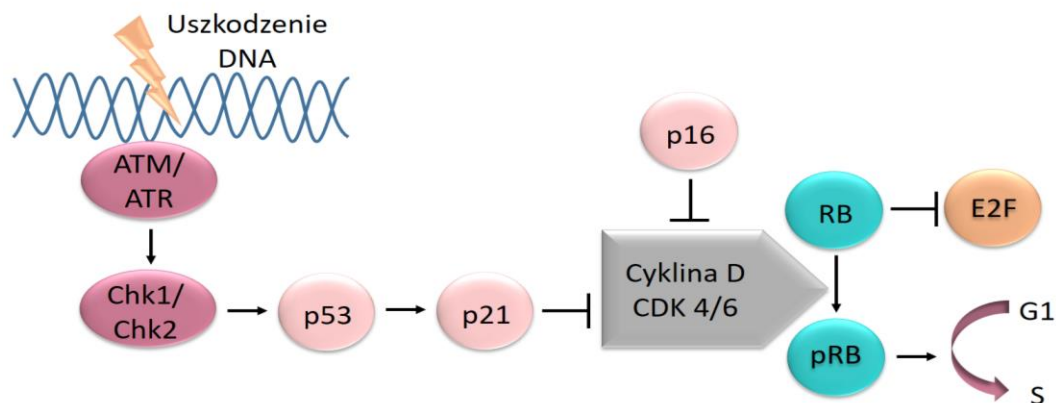
Białko p53 jest supresorem nowotworu, który po uszkodzeniu DNA jest aktywowany na drodze fosforylacji w celu eliminacji lub naprawy uszkodzonych komórek. p53 stymuluje naprawę DNA poprzez aktywację genów zaangażowanych w naprawę DNA. W ten sposób zmniejsza ryzyko rozprzestrzeniania się mutacji materiału genetycznego, przez co zwane jest również „strażnikiem genomu”. Gen TP53 kodujący białko p53 jest najczęściej zmutowanym genem w ludzkich nowotworach [69].

Białko p21<sup>WAF1/CIP1</sup> jest członkiem rodziny inhibitorów kinaz regulujących cykl komórkowy CDK (ang. Cyclin Dependent Kinase), w tym CDK2, CDK4 i CDK6, zapobiegając w ten sposób między innymi fosforylacji białka siatkówcza (RB) [66]. Skutkiem działania białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> jest zatrzymanie cyklu komórkowego w punktach kontrolnych G1/S lub G2/M. Ponadto p21<sup>WAF1/CIP1</sup> promuje starzenie komórkowe poprzez hamowanie apoptozy [52, 67].

### 1.2.2.2 p16<sup>INK4a</sup>/pRB

Produkt genu podatności na siatkówczaka RB1 - białko RB - pełni funkcję regulatora cyklu komórkowego. W formie nieufosforylowanej wiąże się z czynnikami transkrypcyjnymi E2F, powodując zahamowanie cyklu komórkowego. Białko RB nie jest ufosforylowane w komórkach w stanie spoczynku, ale kiedy komórki są stymulowane do wejścia w cykl komórkowy, ulega ono fosforylacji przez kompleksy cykliny D-CDK4/6. Skutkuje to oddysocjowaniem czynników transkrypcyjnych E2F i progresją cyklu komórkowego [70, 71].

p16<sup>INK4A</sup> jest białkiem o masie cząsteczkowej 16 kDa, które pełni rolę inhibitora cyklu komórkowego. p16<sup>INK4A</sup> bezpośrednio wiąże się z CDK4/6 i blokuje tworzenie kompleksów cyklina D - CDK4/6, zapobiegając w ten sposób fosforylacji RB. Hipofosforylowany RB zatrzymuje proliferację komórek poprzez wiązanie z czynnikami transkrypcyjnymi E2F, hamując ekspresję genów zaangażowanych w proliferację komórkową i replikację DNA (Ryc. 1.2.) [52, 72].



**Ryc. 1.2. Główne szlaki molekularne prowadzące do starzenia komórkowego.**

Na podstawie: Lee, M. and J.S. Lee, *Exploiting tumor cell senescence in anticancer therapy*. *BMB Rep*, 2014. 47(2): p. 51-9.

### 1.2.3 Cechy komórek starych

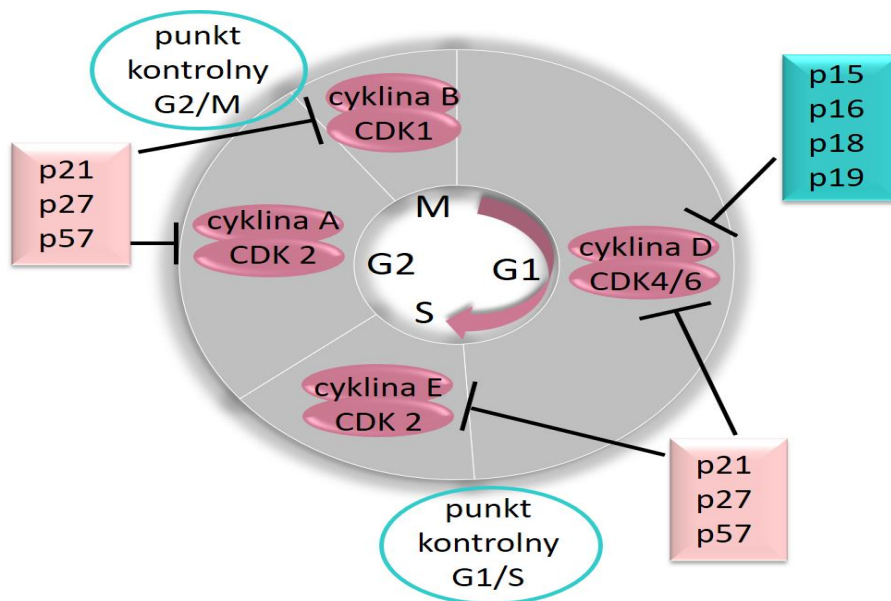
Stare komórki wykazują cechy odmienne od normalnych komórek, jednakże żaden z markerów nie występuje wyłącznie w komórkach starych. Ponadto nie każda starzejąca się komórka posiada wszystkie cechy fenotypu starzeniowego. Z tego powodu komórki te są identyfikowane na podstawie wystąpienia serii cech jednocześnie [57].

### 1.2.3.1 Zahamowanie cyklu komórkowego

Cykl komórkowy jest sekwencją skoordynowanych zdarzeń prowadzących do podziału komórki [52]. W komórkach somatycznych cykl ten obejmuje fazę wzrostu, podczas której dochodzi do produkcji RNA i białek (faza G1), duplikację materiału genetycznego (faza S), przygotowanie do podziału (faza G2) oraz podział komórki podczas którego chromosomy rozchodzą się do komórek potomnych (faza M) [73].

Jedną z podstawowych cech komórek starych jest zatrzymanie cyklu komórkowego, które przez wiele lat było uważane za permanentne. Jednakże w ostatnich latach dowiedziono, że w pewnych przypadkach może dojść do ponownego wejścia w cykl komórkowy, szczególnie w przypadku komórek nowotworowych [74, 75].

Zatrzymanie cyklu komórkowego komórek starych jest pośredniczone przez aktywację jednego lub obu szlaków  $p53/p21^{WAF1/CIP1}$  i  $p16^{INK4A}/pRB$  [76]. Do zahamowania cyklu komórkowego może dojść w fazie G1 lub G2, w zależności od czynnika indukującego starzenie (Ryc. 1.3.) [77].



**Ryc. 1.3. Regulacja cyklu komórkowego.**

Na podstawie: Bury, M., et al., *New Insights into CDK Regulators: Novel Opportunities for Cancer Therapy. Trends Cell Biol*, 2021. 31(5): p. 331-344.

### 1.2.3.2 Zmiany morfologii komórek

W hodowli komórki stare są zazwyczaj powiększone, spłaszczone oraz posiadają duże i poliploidalne jądro komórkowe. Podobne zmiany są obserwowane również w tkankach, jednak ze względu na otaczającą architekturę tkankową mogą być

---

trudniejsze w ocenie. Widoczny staje się również aparat Golgiego a cytoplazma ulega wakuolizacji. Zmiany te wynikają ze wzrostu zawartości RNA oraz białka wewnątrz komórki, na skutek spadku ich obrotu i degradacji [57, 78]. Ponadto stare komórki tworzą z sąsiadującymi komórkami mostki cytoplazmatyczne, zapewniając między sobą sygnalizację przez bezpośredni transfer białka [79].

### 1.2.3.3 SA- $\beta$ -gal

Najczęściej stosowanym markerem starzenia jest wzrost ekspresji  $\beta$ -galaktozydazy związanej ze starzeniem (ang. Senescence-Associated  $\beta$ -galactosidase, SA- $\beta$ -gal). SA- $\beta$ -gal jest enzymem lizosomalnym, a wzrost jego aktywności w komórkach starych przypisuje się zwiększeniu ilości lizosomów tych komórek. Dimiri i współpracownicy odkryli, że oprócz kwaśnej  $\beta$ -galaktozydazy w starych komórkach występuje również SA- $\beta$ -gal [80]. Kwaśna  $\beta$ -galaktozydaza wykrywana jest przy pH 4, natomiast starzeniowa przy pH 6. Badania dotyczące pochodzenia aktywności SA- $\beta$ -gal wykazały, że jest ona przejawem resztkowej aktywności lizosomalnej  $\beta$ -galaktozydazy przy suboptymalnym pH, która staje się wykrywalna z powodu zwiększonej zawartości lizosomów w starzejących się komórkach. Choć wzrost aktywności SA- $\beta$ -gal jest ściśle związany z fenotypem starzeniowym marker ten może być wykrywany niezależnie od starzenia w komórkach przez długi czas hodowanych w warunkach konfluencji, czy też podczas barwienia specyficznych struktur tkankowych takich jak mieszki włosowe [81, 82]. Aktywność SA- $\beta$ -gal rutynowo wykrywa się przy użyciu chromogennego substratu 5-bromo-4-chloro-3-indolylo-beta-D-galaktopiranozydu (x-gal), który pod wpływem hydrolizy przez SA- $\beta$ -gal daje nierozpuszczalny niebieski produkt wykrywany przy pomocy mikroskopii świetlnej [80, 83].

### 1.2.3.4 SASP

Ważną cechą komórek starzejących się jest fenotyp wydzielniczy związany ze starzeniem (ang. Senescence-Associated Secretory Phenotype, SASP). W skład SASP wchodzi cytokiny prozapalne, chemokiny, czynniki wzrostu, czynniki angiogenne i metaloproteinazy [84]. Wraz ze swoją złożonością SASP posiada bardzo szeroką aktywność biologiczną, która może być korzystna lub negatywna w zależności od kontekstu fizjologicznego. Obejmuje ona stymulację angiogenezy, aktywację i hamowanie proliferacji komórek, tworzenie chemoopornej niszy podczas chemioterapii raka, stymulację przejścia nabłonka do mezenchymalnego, zmiany



---

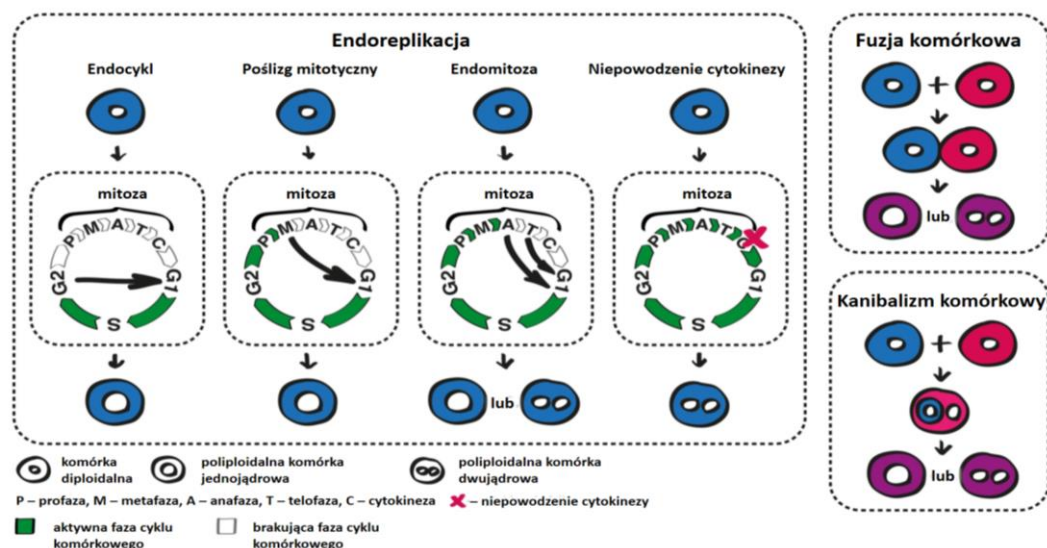
w odnowie komórek macierzystych i/lub różnicowaniu oraz optymalizację naprawy tkanek.

Wiele składników SASP pośrednio lub bezpośrednio sprzyja stanom zapalnym co ma szczególne znaczenie w chorobach związanych z wiekiem do których należą nowotwory [85, 86]. Występowanie przejściowego stanu zapalnego ma pozytywny wpływ podczas gojenia się ran czy kontaktu z patogenami. Jednakże chroniczny stan zapalny wpływa na wzrost ilości wolnych rodników powodujących uszkodzenia DNA, a także może wspierać wzrost nowotworu poprzez dostarczanie czynników wzrostu [51]. Nasilenie i skład SASP różni się w zależności od typu komórki oraz bodźca inicjującego starzenie [87]. Wydzielane przez komórki stare składniki SASP mogą przekazywać sygnały zwrotne do receptorów na ich własnej powierzchni lub na powierzchni innych komórek, wpływając w ten sposób na swoje mikrośrodowisko [88]. Składniki takie jak TGF- $\beta$  oraz niektóre chemokiny wpływają na starzenie się sąsiednich komórek, poprzez sygnalizację parakrynną [89]. SASP pośredniczy w funkcjach supresora nowotworu, na przykład poprzez składniki takie jak IL-6, IL-8, PAI-1 i IGFBP7, wzmacniając zatrzymanie komórki na drodze starzenia [90]. Funkcją SASP jest również przekazywanie sygnałów komórkom odpornościowym, które poprzez eliminację komórek starych hamują inicjację nowotworu [91]. Wydzielane przez komórki stare białka mogą działać immunosupresyjnie poprzez rekrutację niedojrzałych komórek szpiku, które hamując komórki NK mogą powodować progresję nowotworu [92]. Ponadto okazuje się że SASP może promować proliferację komórek nowotworowych. Eksperymenty z użyciem starzejących się fibroblastów pokazały, że zarówno kondycjonowane medium hodowlane jak i kokultura komórek starych wpływa na wzrost proliferacji komórek nowotworowych [93]. SASP może również wzmacniać inwazyjność nowotworów poprzez zwiększenie angiogenezy i przerzutowania komórek nowotworowych [51].

### **1.2.3.5 Poliploidia**

Cechą często współwystępującą ze starzeniem się komórek nowotworowych jest poliploidia. Polipoidalne olbrzymie komórki rakowe (ang. Polyploid Giant Cancer Cells, PGCCs) mogą pojawiać się różnych typach nowotworów wskutek leczenia przeciwnowotworowego (np. chemio- i radioterapia oraz terapie celowane) i powodować wystąpienie oporności na zastosowane leczenie [94]. Szacuje się, że odsetek tych komórek w populacji guza wynosi minimum 5% [95]. Komórki

poliploidalne posiadają zwiększoną liczbę jąder komórkowych lub jedno jądro o znacznie powiększonych rozmiarach, zawierające powieloną liczbę zestawu chromosomów [94, 96]. Poliploidia może powstać na kilka sposobów, w zależności od umiejscowienia zaburzenia w trakcie podziału mitotycznego lub poza nim (Ryc. 1.4.) Generalnie można ją podzielić na endoreplikację, fuzję komórek oraz kanibalizm komórkowy. Endoreplikacja jest zaburzeniem mitozy obejmującym: endocykl, poślizg mitotyczny, endomitozę oraz zaburzenia cytokinezy. Fuzja komórek jest połączeniem się dwóch komórek, natomiast kanibalizm komórkowy polega na wchłonięciu jednej komórki przez drugą [94]. Niekorzystną cechą komórek poliploidalnych w kontekście choroby nowotworowej jest ich zdolność do tworzenia komórek potomnych o potencjale do repopulacji guza [97-99]. PGCCs mogą dzielić się i wytwarzać aneuploidalne potomstwo, które może być nawet bardziej odporne na dalsze terapie niż komórki PGCCs, z których powstały. Oporność komórek potomnych może wynikać z ich aneuploidii, co wiąże się ze zmiennością genetyczną [95]. Innymi cechami warunkującymi ich oporność na terapie są spadek immunogenności oraz wystąpienie przejściowego fenotypu macierzystości w nowych pokoleniach komórek [100]. Ponadto stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy obecnością PGCCs a występowaniem przerzutów. Może to wynikać z faktu, że tworzone przez nie komórki potomne posiadają zwiększony fenotyp inwazyjny i migracyjny [94].



**Ryc. 1.4. Mechanizmy prowadzące do poliploidii.**

*Źródło: Was, H., et al., Polyploidy formation in cancer cells: How a Trojan horse is born. Semin Cancer Biol, 2022. 81: p. 24-36.*

---

### 1.2.3.6 SAHF

Rozpoczęcie procesu starzenia powoduje powstanie związanych ze starzeniem skupisk heterochromatyny (ang. Senescence-Associated Heterochromatin Foci, SAHF). Są to skondensowane regiony heterochromatyny [57]. Ta cecha została odkryta w 2003 roku, gdy zaobserwowano, że DNA starych komórek zawiera punktowe domeny heterochromatyny niewystępujące w komórkach młodych [101]. Wydaje się że warunkiem wstępnym formowania się SAHF jest utrata lamininy B w procesie starzenia komórkowego. Zubożenie w lamininę B powoduje dysocjację związanej z nią domeny z peryferii jądra komórkowego. Co ciekawe, ektopowa ekspresja lamininy B doprowadziła do zmniejszenia SAHF w komórkach starych [102].

SAHF tworzą się w regionach promotorowych genów związanych z regulacją fazy S cyklu komórkowego [77]. Skupiska te są wykrywane dzięki znakowaniu barwnikami DNA, takich jak 4',6-diamidyno-2-fenylindol (DAPI). Wiążą się one z histonem H3, który uległ di- lub tri-metylacji w pozycji lizyny 9 (H3K9Me2 i H3K9Me3) oraz białkami reorganizującymi chromatynę HP-1, HIRA i ASF1a. W młodych komórkach, barwniki DNA wykazują jednorodne zabarwienie podczas gdy w starzejącej się komórce barwienie tworzy punktowe wzory [57].

### 1.2.4 Rola starzenia komórkowego w nowotworach

W kontekście onkologicznym starzenie komórkowe wykazuje zarówno pronowotworowe, jak i przeciwnowotworowe właściwości [103]. Starzenie od dawna było uważane za pożądane zjawisko ponieważ jako odpowiedź na uszkodzenia DNA czy sygnalizację onkogenną jest mechanizmem zapobiegającym transformacji zmian przednowotworowych oraz proliferacji komórek w pełni przekształconych nowotworowo [71]. A zatem omijanie lub ucieczka przed starzeniem jest wymagana do powstania nowotworu [104]. Jednakże starzenie może działać także niekorzystnie poprzez cechy komórek starych, do których należy fenotyp wydzielniczy związany ze starzeniem oraz jego efekty promujące nowotwór. Wiele zespołów badawczych wykazało, że komórki stare mogą wpływać na mikrośrodowisko guza za pośrednictwem SASP, przyspieszając jego wzrost oraz występowanie przerzutów [51, 105]. Ponadto eksperymenty na liniach komórkowych, w tym raka płuca pokazują, że starzejące się pod wpływem chemioterapii komórki są w stanie powrócić do aktywności podziałowej, powodując nawrót choroby [106]. Te niekorzystne następstwa mogą wynikać z występowania PGCCs oraz promowania cech macierzystości, bezpośrednio

---

związanych z wystąpieniem przerzutów oraz nawrotami nowotworu opornego na terapię [104, 107]. Na przykład w eksperymentach na modelu raka jelita grubego wykazano, że komórki starzejące się pod wpływem chemioterapii mogą wykazywać fenotyp komórek macierzystych i przyczyniać się w ten sposób do oporności na chemioterapię [108]. Z tego powodu, badając znaczenie starzenia komórkowego w chemooporności raka płuca niezmiernie istotne wydaje się być badanie cech tych komórek w kontekście tranzycji epithelialno-mezenchymalnej oraz fenotypu macierzystego.

### **1.3 Fenotyp macierzysty**

Fenotyp macierzysty jest cechą komórek nowotworowych związaną z ich zdolnością do tworzenia przerzutów, a także zdolnością do repopulacji guza po terapii. Pojęcie nowotworowych komórek macierzystych (ang. Cancer Stem Cells, CSCs) po raz pierwszy pojawiło się ponad sto lat temu, po zaobserwowaniu podobieństw histologicznych pomiędzy guzami, a tkankami zarodkowymi. Natomiast w roku 1937 ustalono, że pojedyncza komórka z guza myszy może zainicjować nowy guz u myszy biorcy [109].

CSCs to subpopulacja komórek nowotworowych posiadających wyjątkowe cechy samoodnowy oraz zdolność do różnicowania się w odmiennie wyspecjalizowane typy komórek. Dzięki tym właściwościom CSCs odgrywają kluczową rolę w przerzutach i inwazji komórek nowotworowych [109, 110]. Komórki CSCs mogą pochodzić ze zróżnicowanych komórek, albo z komórek macierzystych występujących w tkankach [107]. Do utrzymania stanu macierzystości niezbędnych jest kilka czynników regulowanych przez miRNA. Należą do nich między innymi: OCT-3/4 (ang. Octamer-binding Transcription Factor 4), NANOG (ang. homeobox protein Nanog), SOX-2 (ang. sex determining region Y-box 2) czy KLF4 (ang. Kruppel-Like Factor 4) [111].

W celu wykrywania CSCs stosuje się różne metody, często oparte na identyfikacji specyficznych markerów [107]. Należą do nich: białka powierzchniowe CD (ang. Cluster of differentiation) CD166, CD133, CD90, CD87, CD44, CD29, CD24, CD13, EpCAM (ang. Epithelial Cell Adhesion Molecule) dehydrogenaza aldehydowa 1A1 (ALDH1A1), NANOG, SOX-2, OCT-3/4 [107, 109, 110]. W raku płuca najczęściej są stosowane markery powierzchniowe CD44 CD87, CD90, CD133, CD166, EpCAM oraz wewnątrzkomórkowe ALDH1A, NANOG i OCT-3/4 [107].

---

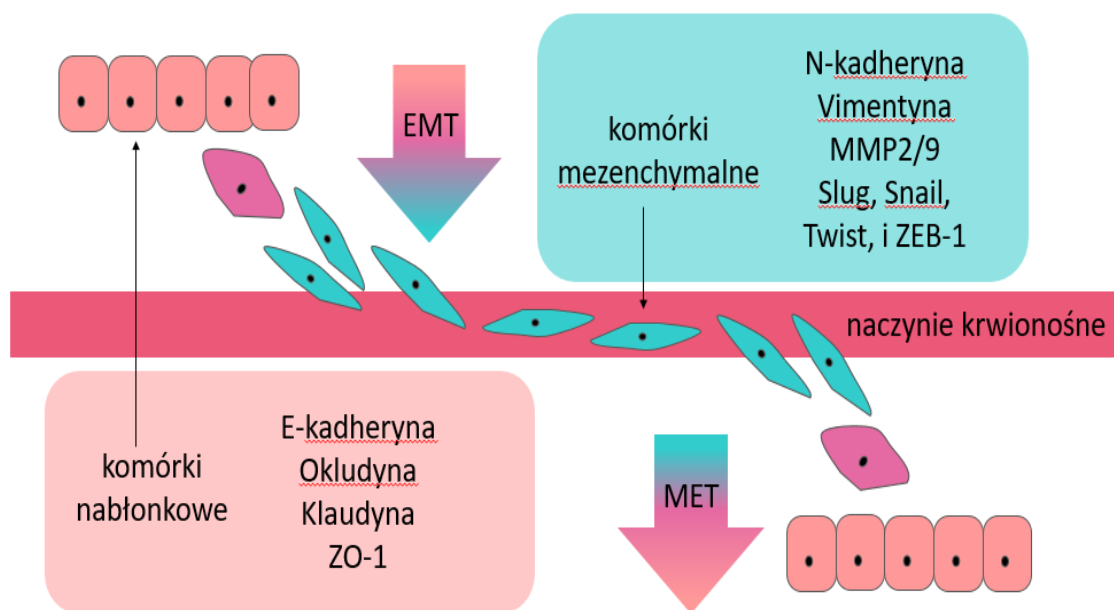
Uważa się, że CSCs są odporne na leki terapeutyczne i są odpowiedzialne za nawroty, przerzuty i oporność na środki terapeutyczne [109]. Jednakże wykazano, że środki te mogą wpływać na wysoką plastyczność CSCs, co zmienia ich cechy fenotypowe i funkcjonalne. Może być to związane z indukcją starzenia komórkowego wywołanego terapią [107]. Wykazano, że leczenie środkami uszkadzającymi DNA powoduje powstanie subpopulacji komórek PGCC, będących w stanie wygenerować komórki potomne *in vitro*, jak również *in vivo*. Co ważne, komórki PGCC posiadały cechy komórek macierzystych, w tym podwyższoną ekspresję NANOG i CD24 [105, 108]. Zespół Erenpreisy również wykrył markery komórek macierzystych w rzadkich, wysoce poliploidalnych komórkach, które wytwarzały komórki potomne [112, 113]. Wykazano również, że triploidalne komórki raka piersi, niereagujące na chemioterapię zawierają frakcję komórek poliploidalnych wykazujących ekspresję zarówno NANOG, jak i inhibitora cyklu komórkowego p16 związanego ze starzeniem [114]. Inna grupa badawcza stwierdziła zwiększoną ekspresję genów związanych z macierzystością w komórkach traktowanych kondycjonowaną pożywką ze starzejących się komórek raka jajnika indukowanych cisplatyną. Wynik ten sugeruje znaczenie SASP w indukcji macierzystości tych komórek [115]. Ponadto udowodniono związek pomiędzy występowaniem komórek TIS po leczeniu karboplatyną, a wzrostem ekspresji markerów macierzystości na komórkach nowotworowych [116]. Pozwala to przypuszczać, że również starzejące się komórki raka płuca leczone chemioterapią opartą na lekach platynowych mogą nabierać cech macierzystości, przyczyniając się do chemooporności, jednak potwierdzenie tej hipotezy wymaga pogłębionych badań.

#### **1.4 Tranzycja epitelialno-mezenchymalna**

Starzenie komórkowe obok fenotypu macierzystego może również wpływać na plastyczność komórek nowotworowych pod względem równowagi pomiędzy stanem nabłonkowym, a mezenchymalnym. Mechanizmem molekularnym zaangażowanym w ten proces jest tranzycja epitelialno-mezenchymalna (ang. Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT), będąca zjawiskiem, w którym stacjonarne i nieruchome komórki nabłonkowe nabywają zdolności do migracji. Ma to bezpośredni wpływ na wystąpienie przerzutów i stopniową kolonizację odległych narządów przez chemooporne komórki rakowe, obserwowaną w nawrocie choroby po zakończonym leczeniu chemioterapeutycznym [110, 117].

Podczas EMT komórki tracą połączenia z macierzą zewnątrzkomórkową oraz między komórkami sąsiadującymi, uzyskując mezenchymalny fenotyp. Pozwala to na oddzielenie komórek od guza pierwotnego [118]. Dzięki temu komórki nabywają zdolności do migracji, umożliwiającej im dostęp do węzłów chłonnych, czy naczyń krwionośnych [119]. Istnieje również proces odwrotny - przejście mezenchymalno-nabłonkowe (MET), pozwalające komórkom przerzutującym na opuszczenie naczyń i zasiedlenie narządów odległych. MET jest często procesem stymulowanym przez sygnały molekularne z przerzutowych nisz w miejscach narządów wtórnych (Ryc.1.5.) [117]. Zmianom pomiędzy fenotypem nabłonkowym/epitelialnym oraz mezenchymalnym towarzyszą zmiany charakterystycznych dla obu stanów markerów.

Główny marker komórek epitelialnych to E-kadheryna - białko adhezyjne będące silnym supresorem nowotworu. E-kadheryna pośredniczy w tworzeniu połączeń komórkowych i stanowi fizyczną blokadę przeciwdziałającą poruszaniu się komórek, a ponadto pośredniczy w kontaktowym hamowaniu proliferacji. Utrata jej ekspresji umożliwia komórkom oddzielenie się od guza pierwotnego i jest związana z inwazyjnością komórek nowotworowych [120-122].



**Ryc. 1.5. Schemat tranzycji epitelialno-mezenchymalnej (EMT) oraz procesu odwrotnego (MET).**

Na podstawie: Gos, M., J. Miloszevska, and M. Przybyszewska, *Epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. Postepy Biochem*, 2009. 55(2): p. 121-8.

---

Obniżenie ekspresji E-kadheryny podczas EMT może być pośredniczone przez jej represję transkrypcyjną poprzez wiązanie czynników transkrypcyjnych za pośrednictwem elementów E-box w promotorze E-kadheryny. Do tych czynników należą markery EMT takie jak Slug, Snail, Twist, i ZEB-1 [123]. Slug oprócz wpływu na obniżenie E-kadheryny powoduje również indukcję angiogenezy oraz podwyższenie poziomu MMP-2. Poza wpływem na migrację i przerzuty Slug nadaje odporność na śmierć komórek poprzez bezpośrednią lub pośrednią regulację transkrypcyjną genów związanych z apoptozą [124]. Najlepiej zbadanym czynnikiem transkrypcyjnym EMT jest Snail. Jego ekspresja pojawia się na początku EMT i prowadzi do indukcji transkryptów ZEB-1, poprzedzając inne zmiany molekularne i fenotypowe, które mogą prowadzić do EMT [125]. Białko ZEB-1 (ang. Zinc-finger E-box Binding Homeobox 1) zaburza funkcje komórek nabłonkowych między innymi poprzez hamowanie ekspresji genów związanych polaryzacją komórek nabłonkowych. Dodatkowo wysoka ekspresja ZEB-1 koreluje z chemoopornością [126, 127]. Innym czynnikiem transkrypcyjnym bezpośrednio związanym z inwazją guza i przerzutami jest Twist. Poza uczestnictwem w utracie E-kadheryny i indukcji N-kadheryny wzmacnia on także aktywność enzymów MMP, poprzez represję inhibitora metaloproteinazy TIMP1 (ang. Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1) [125, 128].

Białkami należącymi do markerów epitelialnych są również okcludyna i kładyna, tworzące połączenia między komórkami. Łączą się one z białkami rusztowania, do których należy ZO-1, tworząc tak zwane połączenia ciasne. Połączenia te są wewnątrzblonowymi kompleksami białkowymi, które zapewniają polaryzację komórkową oraz wierzchołkowe połączenia między sąsiednimi komórkami zarówno w komórkach nabłonkowych jak i śródbłonkowych. Utrata tych białek z komórek nowotworowych jest uważana za bezpośredni efekt EMT [125, 129-131].

Proteina transblonową występującą w tkankach nie nabłonkowych jest N-kadheryna. Ulega ona ekspresji w różnych typach komórek, a ponadto promuje angiogenezę i utrzymuje integralność naczyń krwionośnych. Podczas EMT N-kadheryna ulega nadekspresji, podczas gdy E-kadheryna jest tłumiona. Ta charakterystyczna zmiana kadheryn jest związana ze zwiększonymi cechami migracyjnymi i inwazyjnymi [122, 125]. Jednakże tworzenie przerzutów może występować również przez komórki wykazujące ekspresję E-kadheryny. Takie zjawisko obserwowane jest w wyniku ekspresji wirusowych onkogenów v-Src oraz v-Ras, mogących aktywować sygnalizację związaną z częściowym EMT. Niezależnie od ekspresji kadheryn również białko RhoA

---

jest w stanie indukować mezenchymalny fenotyp komórek poprzez wpływ na polaryzację komórek oraz zmianę organizacji cytoszkieletu [132].

Białkiem występującym powszechnie w komórkach mezenchymalnych jest wimentyna, która jest składnikiem cytoszkieletu, pozwalającym na utrzymanie kształtu i integralności komórki. Wykazano wzrost jej ekspresji w nowotworach o inwazyjnym fenotypie oraz jej znaczącą rolę w adhezji i migracji [125, 133].

Fibronektyna jest glikoproteiną obecną w rozpuszczalnej formie dimerowej w osoczu oraz w postaci dimerycznej lub multimerycznej na powierzchni komórki i w macierzy zewnątrzkomórkowej. Bierze udział w migracji, proliferacji, adhezji i inwazji komórek oraz w zmianach macierzy zewnątrzkomórkowej poprzez sygnalizację integrynami [125].

MMP-2 oraz MMP-9 należą do rodziny metaloproteinaz macierzy, enzymów zdolnych do rozszczepiania składników macierzy zewnątrzkomórkowej. MMP-2 jest kolagenazą, która stanowi główny enzym proteolityczny wśród MMP. Jest kluczowym promotorem inwazji komórek nowotworowych i przerzutów poprzez rozpad błony podstawnej oraz sprzyjanie lokalnej i odległej infiltracji komórek nowotworowych. MMP9 rozkłada kolageny typu IV i V oraz wydaje się odgrywać główną rolę w angiogenezie nowotworów, poprzez regulację angiogenezy i rekrutację śródbłonkowych komórek macierzystych [125, 134].

Przedstawiona charakterystyka markerów EMT wyjaśnia w jaki sposób komórki nowotworowe nabywają cech wzmożonej migracji i inwazyjności. Należy jednak zauważyć, że podczas gdy główną konsekwencją EMT jest zwiększona ruchliwość, zjawisko to jest również związane z opornością na terapię i macierzystością warunkującą zdolność do samoodnowy [117, 135]. W badaniach raka płuca dowiedziono, że starzenie komórkowe wpływa na obniżenie ekspresji białka Slug i w konsekwencji zahamowanie EMT [136]. Również eksperymenty dotyczące raka jelita grubego dostarczyły dowodów na zmiany ekspresji markerów EMT w komórkach nowotworowych starzejących się pod wpływem chemioterapii. Wykazano, że w komórkach pod wpływem chemioterapii wzrastała ekspresja E-kadheryny, świadcząc o hamowaniu EMT. Jednakże równocześnie wykryto populację komórek poliploidalnych ze zwiększoną ekspresją mezenchymalnego markera ZEB-1, generującą komórki potomne. Może to sugerować, że właśnie ta subpopulacja komórek jest odpowiedzialna za repopulację guza po chemioterapii [108]. Z powodu niejednorodnej



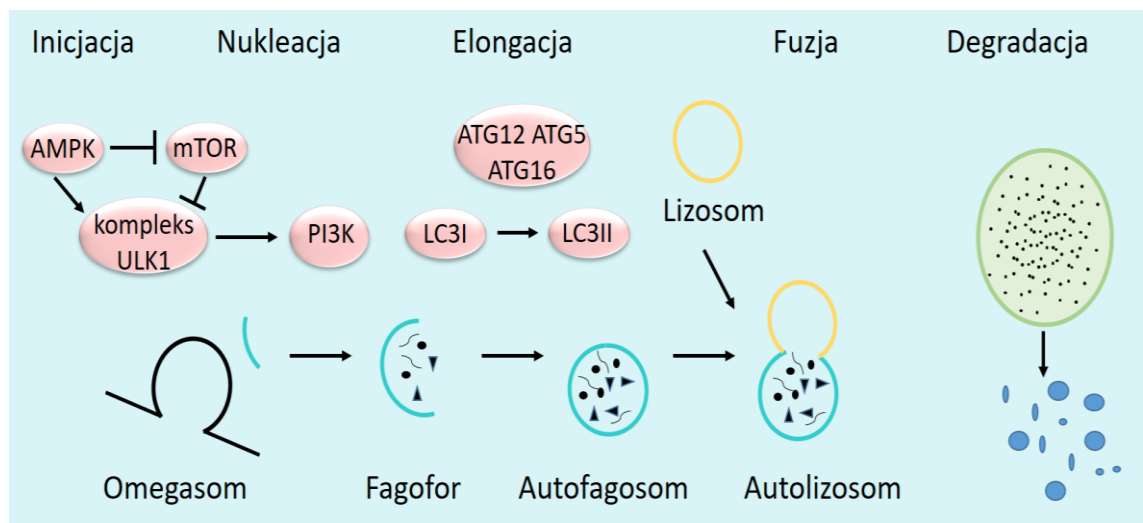
roli starzenia komórkowego dla procesu EMT niezbędne jest poszukiwanie mechanizmów przesuwających równowagę plastyczności starych komórek w stronę fenotypu epitelialnego.

## 1.5 Autofagia

Procesem mogącym potencjalnie wpływać na rozwój niekorzystnych cech komórek starych związanych z chemoopornością jest autofagia. Pozwala ona przetrwać komórkom nowotworowym w niesprzyjającym środowisku takim jak niedotlenienie czy brak związków odżywczych [137]. Autofagia jest to wieloetapowy proces katabolicznej degradacji zbędnych lub uszkodzonych struktur komórkowych z udziałem lizosomów [138]. Została odkryta przez pod koniec lat sześćdziesiątych ubiegłego wieku, gdy Christiana de Duve zaobserwował degradację mitochondriów i innych składników komórkowych w lizosomach szczurzej wątroby [139].

### 1.5.1 Etapy procesu autofagii

Autofagia obejmuje 5 kluczowych etapów: inicjację, nukleację, elongację, fuzję lizosomalną i degradację, a każdy z nich jest regulowany przez szereg kompleksów białkowych (Ryc. 1.6.) [138]. Zidentyfikowano około 30 genów związanych z autofagią (ang. Autophagy-Related Genes, ATGs ) u drożdży i wiele genetycznych homologów ssaków [140].



**Ryc. 1.6. Etapy autofagii.**

Na podstawie: Chang, N.C., *Autophagy and Stem Cells: Self-Eating for Self-Renewal*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2020. 8.

---

### 1.5.1.1 Inicjacja

Inicjacja autofagii rozpoczyna się od aktywacji kompleksu ULK1. Kompleks ULK1 składa się z samego białka ULK1 oraz niekatalitycznych podjednostek FIP200, mATG13 i ATG101 [141]. Kompleks ULK1 jest regulowany poziomem substancji odżywczych przy udziale innego kompleksu - mTORC1 (ang. Mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1). W sytuacji wysokiej ilości substancji odżywczych mTORC1 łączy się z kompleksem ULK1 i fosforyluje białka ULK1 i mATG13, inaktywując je. Przeciwnie, podczas głodu mTORC1 oddysocjowuje od kompleksu ULK1, powodując defosforylację wspomnianych białek i w konsekwencji aktywując autofagię [142]. Dodatkowo regulacja ULK1 może odbywać się poprzez wrażliwą na poziom energii w komórce kinazę AMPK. Kinaza ta może aktywować ULK1 bezpośrednio, poprzez jego fosforylację oraz pośrednio, tłumiąc aktywność mTORC1 [143]. U saków inicjacja autofagii jest związana z subdomeną retikulum endoplazmatycznego (ang. Endoplasmic Reticulum, ER) wzbogaconą w lipidowy 3-fosforan fosfatydyloinozytolu (PI3P), znany jako omegasom. Następnie po zajściu odpowiednich zmian w składzie lipidowym dochodzi do powstania fagoforu [141, 144].

### 1.5.1.2 Nukleacja

We wczesnym stadium powstawania fagoforu, czyli na etapie nukleacji, kompleks ULK1 aktywuje kolejny kompleks kinazy fosfatydyloinozytolu klasy III (PI3K) VPS34. Kompleks ten składa się z VPS34, VPS15, Bekliny-1, Atg14 i kinazy serynowej p150. Vps34 jest unikalny wśród PI3K, ponieważ wykorzystuje jedynie fosfatydyloinozytol (PI) jako substrat do wytwarzania PI3P. Interakcja Vps34 z Bekliną-1 promuje jej aktywność katalityczną i zwiększa poziomy PI3P, który jest niezbędny do wydłużania fagoforów i rekrutacji innych białek ATG do fagoforu [141, 143]. Do pozytywnych regulatorów tego kompleksu należą między innymi białka UVRAG, Atg14L i Ambra, natomiast do jego inhibitorów - Rubicon i Bcl-2 [145].

### 1.5.1.3 Elongacja

Kolejnym etapem procesu autofagii jest elongacja, polegająca na wydłużeniu błon izolacyjnych fagoforu, w którym biorą udział dwa szlaki: Atg5-Atg12 i LC3. Pierwszy z nich rozpoczyna się aktywacją Atg12 przez Atg7, następnie przeniesieniem go do Atg10. Ostatecznie Atg12 wiąże się z Atg5, po czym kompleks Atg5-Atg12 zostaje niekowalencyjnie sprzężony z Atg16L, tworząc kompleks Atg5-Atg12-Atg16L, który

---

łączy się z rozciągającym się fagoforem. Powstały kompleks indukuje krzywiznę fagoforu poprzez asymetryczną rekrutację LC3-II [143, 146]. Jednakże w celu przyłączenia do fagoforu, białko LC3 musi ulec odpowiedniej modyfikacji. Uczestniczy w niej białko Atg4B, które odcina C-końcowy fragment LC3, tworząc postać cytozolową tego białka- LC3-I. LC3-I jest następnie sprzęgany z fosfatydyloetanolaminą (PE) przez kompleks Atg7, Atg3 i Atg5-Atg12-Atg16, tworząc lipidową formę LC3-II [143, 147]. W fagoforze LC3-II jest zaangażowane w interakcję z białkiem p62/SQTM1 biorącym udział w załadunku autofagosomu. Etap elongacji kończy się zamknięciem fagoforu i powstaniem autofagosomu, czyli struktury o podwójnej błonie otaczającej ładunek przeznaczony do degradacji [147, 148].

#### **1.5.1.4 Fuzja i degradacja**

Po zamknięciu fagoforu kompleks Atg12-Atg5-Atg16L oddziela się od autofagosomu, który jest transportowany z udziałem mikrotubuli do lizosomu, gdzie następuje fuzja autofagosomu z lizosomem. Skutkiem tego połączenia jest powstanie autolizosomu, którego zawartość razem z LC3-II i p62/SQTM1 ulega degradacji przez katepsyny i lipazy. W efekcie poziom LC3-II i p62/SQTM1 wewnątrz autofagolizosomu maleje, przy czym LC3-II znajdujące się po zewnętrznej stronie błony zostaje uwolnione i ponownie przekształcone do formy cytozolowej. Produkty rozpadu zawartości autolizosomu w postaci aminokwasów, kwasów tłuszczowych czy nukleotydów są uwalniane do cytoplazmy w celu ponownego wykorzystania [142, 147].

#### **1.5.2 Znaczenie autofagii dla komórek nowotworowych**

Wpływ autofagii na komórki rakowe oraz proces nowotworzenia jest niejednoznaczny. Kluczowe znaczenie w tej kwestii zdaje się mieć stadium rozwoju nowotworu. W początkowych etapach karcynogenezy może działać jako supresor nowotworzenia. Poprzez udział w usuwaniu uszkodzonych składników komórkowych autofagia chroni organizm przed rozwojem nowotworu [143]. Dodatkowo przewlekłe zahamowanie autofagii promuje nowotworzenie poprzez niestabilność genomu, nieprawidłowy wzrost komórek oraz stres komórkowy. Jednak w zaawansowanych stadiach karcynogenezy autofagia może wspomagać przeżycie komórek w stresującym środowisku niedotlenienia czy kwasicy. Autofagia przyczynia się również do odporności na terapię, stanowiąc barierę w skutecznym leczeniu. Dlatego też

---

rozważanie znaczenia procesu autofagii dla komórek nowotworowych należy rozpatrywać dwukierunkowo [138, 143, 149].

Innym mechanizmem mogącym wspomagać przetrwanie komórek nowotworowych jest ucieczka przed apoptozą. Autofagia może zapobiegać apoptozie poprzez degradację uszkodzonych mitochondriów (tzw. mitofagię), hamując w ten sposób uwalnianie cytochromu C i późniejszą aktywację kaskady apoptotycznej. Innymi mechanizmami hamowania apoptozy przez autofagię są indukcja degradacji białek apoptotycznych, w tym kaspazy 8 czy redukcja poziomu ROS. Jednakże w pewnych warunkach autofagia może również promować proces programowanej śmierci komórki. W przypadku intensywnego lub długotrwałego bodźca inicjującego autofagię, może ona aktywować apoptozę poprzez działanie kaspaz [138].

Dane literaturowe wskazują na promowanie immunosupresji w nowotworach przez autofagię. Na przykład zaobserwowano, że autofagia hamuje rekrutację przeciwnowotworowych limfocytów T oraz komórek NK, natomiast inhibicja autofagii zwiększa infiltrację limfocytów T, a także zmniejsza progresję nowotworu. Dodatkowo wykazano, że po usunięciu ATG7 z immunosupresyjnych limfocytów T regulatorowych ich funkcja supresorowa uległa osłabieniu, co również spowodowało zahamowanie wzrostu guza [138, 150].

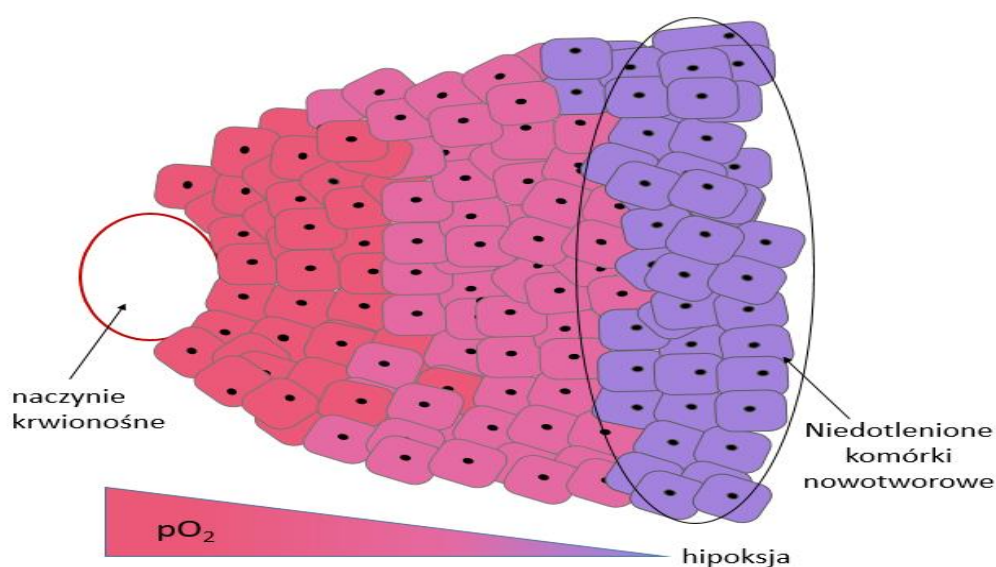
Autofagia może również utrzymywać macierzystość komórek nowotworowych poprzez wydzielanie cytokin, zwłaszcza IL-6. W większości nowotworów obserwuje się wysoką ekspresję IL-6, która bierze udział w proliferacji, przeżyciu, inwazyjności, przerzutach i utrzymaniu nowotworowych komórek macierzystych. W badaniach na linii komórkowej raka piersi MDA-MB-468 wykazano, że hamowanie autofagii przez inaktywację genów ATG7 lub BECN1 zmniejsza wydzielanie IL-6 i przeżycie komórek [110].

Istnieją dowody przedkliniczne, potwierdzające słuszność idei hamowania autofagii w celu poprawy skuteczności leczenia pacjentów nowotworowych. Na modelach mysich udowodniono wystąpienie regresji guzów nowotworowych w wyniku genetycznego lub farmakologicznego hamowania autofagii. Wykazano również poprawę skuteczności terapii, gdy leki przeciwnowotworowe były łączone z inhibitorami autofagii [151, 152]. Jednakże badania *in vivo* wykazały, że długoterminowe skutki takiego podejścia mogą powodować reaktywację autofagii i gwałtowny wzrost guzów związany z ucieczką przed starzeniem [105].

W raku zarówno autofagia jak i starzenie się wykazują wiele, często nakładających się na siebie działań, w tym wpływ na rozwój guza i modulację odpowiedzi na chemioterapię [153]. Jednakże dokładny związek między tymi procesami nie jest jasny [154, 155], co wskazuje na potrzebę dalszych badań, które uwzględniłyby biologicznie istotne mikrośrodowiskowe warunki wzrostu guza.

## 1.6 Hipoksja

Jednym z najistotniejszych, a zarazem najczęściej pomijanym w badaniach czynnikiem mikrośrodowiska guzów wpływającym na odpowiedzi komórek na terapię jest hipoksja. Mikrośrodowisko guza jest złożonym systemem, odgrywającym ważną rolę w rozwoju i progresji nowotworu. Składa się ono z komórek niezłośliwych takich jak fibroblasty i komórki odpornościowe oraz macierzy zewnątrzkomórkowej, naczyń krwionośnych, cytokin i innych cząsteczek sygnałowych [156]. Do czynników mikrośrodowiskowych warunkujących odpowiedź komórek nowotworowych należy niedotlenienie (Ryc. 1.7.) spowodowane szybkim tempem proliferacji oraz nieprawidłowościami strukturalnymi i funkcjonalnymi naczyń krwionośnych [157, 158]. Komórki nowotworowe, poprzez zmiany w ekspresji genów adaptują się do warunków niedotlenienia, prowadząc do bardziej agresywnych i opornych terapeutycznie fenotypów [159, 160].



**Ryc. 1.7. Niedotlenienie komórek nowotworowych, w zależności od ich położenia względem naczyń krwionośnych.**

Na podstawie: Bernauer, C., et al., *Hypoxia and its therapeutic possibilities in paediatric cancers. British Journal of Cancer*, 2021. 124(3): p. 539-551.

- 
- W celu rozróżnienia odmiennych stanów natlenienia używane są poniższe terminy:
- normoksja - odpowiadająca ciśnieniu atmosferycznemu tlenu, rutynowo stosowanego w hodowlach komórkowych *in vitro*, które wynosi około 19,95% O<sub>2</sub>,
  - fizjoksja - odpowiadająca stężeniu tlenu występującemu w stanie fizjologicznym w różnych narządach (w zależności od badanego narządu waha się pomiędzy 11% a 1%, przy czym w płucu wynosi około 5,6%),
  - hipoksja – reprezentująca niedotlenienie, w którym poziom tlenu wewnątrz tkanki jest niższy niż w fizjoksji i wynosi około 1%,
  - anoksja – oznaczająca stężenie tlenu zbliżone do zera [161, 162].

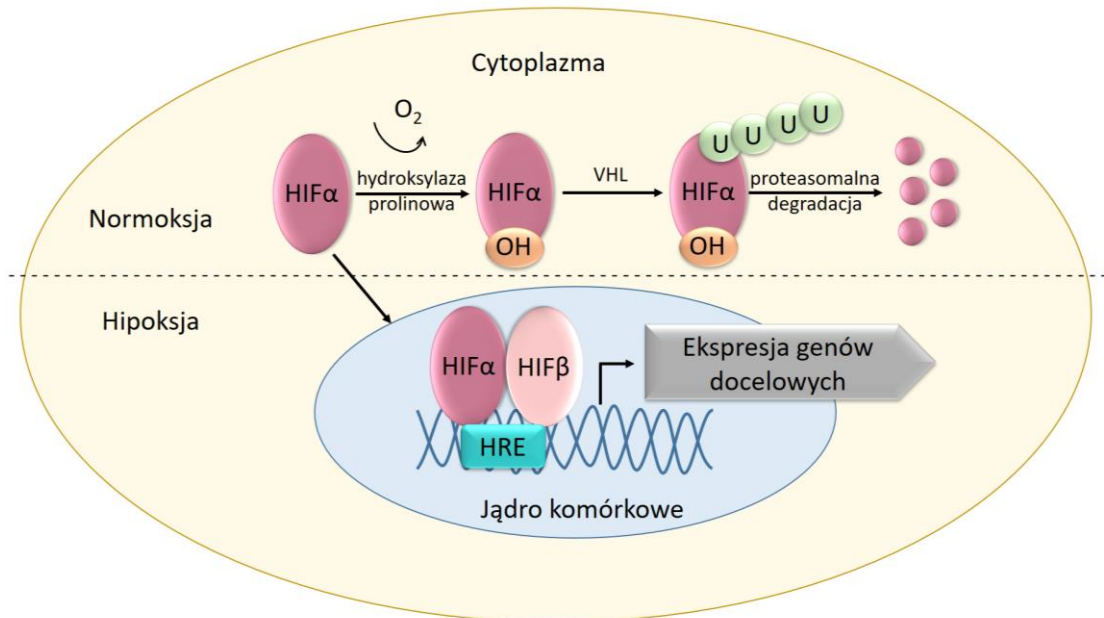
Niedotlenienie jest jednym z najsilniejszych induktorów ekspresji genów związanych ze zmianami metabolicznymi i procesami takimi jak angiogeneza, stymulacja proliferacji i migracji oraz różnicowania komórek macierzystych [163]. W komórkach nowotworowych hipoksja została zidentyfikowana jako jeden z kluczowych czynników inicjacji i progresji nowotworu, w tym inwazyjności i nabywania przez komórki nowotworowe cech macierzystości. Ponadto niski poziom tlenu w guzie nowotworowym silnie związany jest z procesami takimi jak angiogeneza i limfangiogeneza, ucieczka immunologiczna, odporność na sygnały apoptotyczne czy wrażliwość na terapię [164].

### **1.6.1 Molekularne mechanizmy adaptacyjne komórek w odpowiedzi na hipoksję**

Najlepiej poznanym mechanizmem adaptacji komórek nowotworowych do środowiska hipoksji jest aktywność transkrypcyjna czynników indukowanych niedotlenieniem (ang. Hypoxia-Inducible Factors, HIFs) [158]. HIF to rodzina białek występujących w formie heterodimerów, złożonych z wrażliwych na poziom tlenu podjednostek  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  lub HIF-3 $\alpha$ ) i niewrażliwej na tlen podjednostki HIF-1 $\beta$ . Najlepiej scharakteryzowaną izoformą HIF jest HIF-1 $\alpha$  o masie 120 kDa [165].

Przy obecności tlenu reszty prolinowe w cząsteczce HIF-1 $\alpha$  są hydroksylowane przez hydroksylazę prolinową. Hydroksylacja jest wymagana do wiązania białka supresorowego nowotworu von Hippel-Lindau (VHL), co prowadzi do ubikwitynacji i proteasomalnej degradacji HIF-1 $\alpha$ . W warunkach hipoksji dochodzi do zablokowania hydroksylacji cząsteczki HIF-1 $\alpha$  katalizowanej przez hydroksylazę prolinową, której substratem jest między innymi tlen. Nie dochodzi więc do degradacji cząsteczki HIF-

1 $\alpha$ , lecz do jej przemieszczenia do jądra komórkowego, gdzie wiąże się z podjednostką  $\beta$ . Następnie kompleks ten lokalizuje się na sekwencji HRE (ang. Hypoxia Response Elements) w DNA, aktywując w ten sposób transkrypcję genów odpowiedzialnych za reakcję na obniżoną aktywność tlenu (Ryc. 1.8.) [158, 166, 167].



**Ryc. 1.8. Mechanizm regulacji ekspresji genów związanych z niedotlenieniem w zależności od dostępności tlenu.**

Na podstawie: Edeline, J., et al., *Safety and Efficacy of Sorafenib in Renal Cell Carcinoma. Cancer Growth and Metastasis*, 2012. 5: p. CGM.S7526.

Geny aktywowane przez HIF-1 $\alpha$  zwiększają dostarczanie tlenu do tkanek oraz dostosowują metabolizm komórek do obniżonej podaży tlenu. HIF-1 $\alpha$  odpowiada za regulację enzymów szlaku glikolitycznego, takich jak fosfofruktokinaza i dehydrogenaza mleczanowa A (ang. Lactate Dehydrogenase A, LDHA). Ponadto HIF-1 $\alpha$  indukuje geny regulujące pH, aktywujące apoptozę oraz geny odpowiedzialne za zachowanie homeostazy śródbłonka, np. NOS3 (ang. Nitric Oxide Synthase 3), a także oksygenazę hemową-1 o działaniu proangiogennym. HIF-2 $\alpha$  działa skuteczniej na stymulację ekspresji erytropoetyny (EPO), metaloproteinaz macierzy (MMP) 2 i 13, genów zaangażowanych w metabolizm żelaza oraz czynnika komórek macierzystych OCT-3/4. Zarówno HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$  aktywują transportery glukozy (ang. Glucose Transporter 1, GLUT-1) oraz czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (ang. Vascular Endothelial Growth Factor A, VEGF) [165, 168].

---

HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$  mają bardzo podobne cechy, w tym zdolność do heterodimeryzacji z HIF-1 $\beta$ , oraz zdolność aktywacji transkrypcji genów HRE, różnią się natomiast poziomem ekspresji w różnych tkankach. HIF-2 $\alpha$  ulega ekspresji najobficiej podczas rozwoju embrionalnego i w dorosłych komórkach śródbłonna naczyniowego łożyska, serca i płuc, wskazując na potencjalną rolę sygnalizacji HIF w odpowiedzi komórek raka płuca na chemioterapię. HIF-1 $\alpha$  posiada ekspresję we wszystkich tkankach i typach komórek ssaków, w szczególności w sercu i nerkach [165]. Najpóźniej zidentyfikowanym i jednocześnie najslabiej zbadanym członkiem rodziny HIF jest HIF-3 $\alpha$ . Ulega on silnej ekspresji w sercu, łożysku i mięśniach szkieletowych, natomiast niskiej w płucach, wątrobie oraz nerkach. Niedotlenienie zwiększa poziom HIF-3 $\alpha$ , który hamuje aktywność HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$  oraz reguluje własne geny docelowe (np. EPO czy GLUT-1) [169].

### **1.6.2 Znaczenie hipoksji dla mikrośrodowiska komórek nowotworowych**

Zaobserwowano, że hipoksja nasila występowanie przerzutów w różnych nowotworach, w tym w raku płuca. Podczas niedotlenienia HIF-1 $\alpha$  aktywuje geny fenotypu mezenchymalnego takie jak wimentyna, Snail i Twist, natomiast ekspresja epitelialnej E-kadheryny ulega obniżeniu. Niedotlenienie nie tylko promuje wzrost agresywności oraz skłonności do przerzutowania poprzez zwiększenie fenotypu mezenchymalnego, ale również poprzez sprzyjanie tworzeniu dysfunkcyjnych naczyń krwionośnych i limfatycznych. Czynniki indukowane przez HIF-1 $\alpha$  takie jak angiopoetyna-2 oraz -4, a także VEGF wpływają na tworzenie się nieprawidłowych i nieszczelnych naczyń, ułatwiając przejście przerzutowych komórek przez ścianę naczyń [160, 164]. Ponadto niedotlenienie aktywuje działanie metaloproteinaz, rozkładających kolagen, co również sprzyja inwazji komórek nowotworowych [158].

Charakterystyczną cechą nowotworów jest również zakwaszenie mikrośrodowiska guza. HIF-1 $\alpha$  może aktywować anhidrazę węglanową IX lub XII, w konsekwencji powodując spadek pH. Ponadto beztlenowe mikrośrodowisko sprzyja produkcji kwasu mlekowego poprzez działanie kluczowych enzymów glikolizy, w tym LDHA. Nadprodukowany kwas mlekowy obok zakwaszenia środowiska działa również jako cząsteczka sygnałowa w angiogenezie oraz immunosupresji. W rzeczywistości zmiany w zewnątrzkomórkowym pH indukują lekooporność poprzez hamowanie komórkowych i humoralnych funkcji immunologicznych. Wykazano, że obniżone pH hamuje głównie chemotaksję oraz zdolność bakteriobójczą leukocytów wielojądrzastych. Ponadto



---

w zakwaszonych regionach dochodzi do upośledzenia cytotoksyczności i proliferacji limfocytów. Dodatkowo przy obniżonym pH wykazano zmniejszoną lizę komórek nowotworowych przez cytotoksyczne limfocyty T [160, 170].

Ważnym aspektem wpływu niedotlenienia na mikrośrodowisko guza jest promowanie miejscowej supresji układu immunologicznego. Dowiedziono, że hipoksja wpływa na zmniejszenie zdolności komórek dendrytycznych do aktywacji limfocytów T. Ponadto niedotlenione regiony guza są infiltrowane przez komórki immunosupresyjne, takie jak komórki zrębowe pochodzenia szpikowego (ang. Myeloid Derived Stromal Cells, MDSCs), makrofagi związane z nowotworem (ang. Tumor-Associated Macrophages, TAM) oraz limfocyty T-regulatorowe. Ponadto w warunkach niedotlenienia dochodzi do wzrostu ekspresji cytokiny TGF- $\beta$ 1 (ang. Transforming Growth Factor-beta 1), mającej działanie immunosupresyjne [157].

W kontekście skuteczności terapeutycznej leków nowotworowych istotny jest fakt, że niedotlenione komórki nie otrzymują wystarczającej ilości chemioterapeutyków, ze względu na oddalenie od kapilary oraz nieprawidłowe unaczynienie guza. Niedotlenienie powoduje również oporność na leki poprzez wzrost ekspresji genów zaangażowanych w ich usuwanie. Niektóre geny, które mają rolę w wypływie leków, takie jak geny związane z opornością wielolekową MRP2 (ang. Multidrug Resistance-Associated Protein 2), czy MDR1 (ang. Multidrug Resistance 1) są aktywowane przez HIF-1 $\alpha$  [171].

Dodatkowo niedotlenione środowisko nowotworu, promuje autofagię, która może przynosić korzyści komórkom rakowym poprzez wewnętrzne mechanizmy cytoprotekcyjne oraz zwiększoną odporność na cytotoksyczność komórkową [138].

Wykazano również, że w środowisku hipoksyjnym poziom reaktywnych form tlenu (ang. Reactive Oxygen Species, ROS) w komórkach nowotworowych jest podwyższony. W wysokich stężeniach ROS mogą uszkadzać biomolekuły komórkowe, takie jak białka, DNA i RNA oraz powodować mutacje promujące karcynogenezę komórek normalnych lub wielolekooporność w komórkach nowotworowych [160].

Dowiedziono również, że niedotlenienie zwiększa frakcję CSCs w populacji guza [172]. Zmienione mikrośrodowisko i presja terapeutyczna mogą indukować CSCs, a powstanie TIS może promować fenotyp macierzystości prowadzący do nawrotu guza i wystąpienia przerzutów, co jest bezpośrednio związane z niekorzystnym rokowaniem dla pacjentów. Dlatego ważne jest, aby szczegółowo scharakteryzować te komórki i zrozumieć ich pochodzenie oraz dokładne powiązania pomiędzy macierzystością,

---

starzeniem i mikrośrodowiskiem guza w momencie inicjacji nowotworu i nawrotu nowotworu [107].

### 1.7 Metabolizm beztlenowy

Komórki nowotworowe narażone na hipoksję wykorzystują różne mechanizmy adaptacyjne w celu wspierania optymalnych warunków wzrostu, w tym istotne zmiany w regulacji i aktywności metabolizmu. Niespełna 100 lat temu Otto Warburg zaobserwował, że guzy wykazują unikalny fenotyp metaboliczny, charakteryzujący się wysokim stopniem glikolizy zamiast fosforylacji oksydacyjnej jako źródła ATP nawet w obecności tlenu. Cecha ta od nazwiska odkrywcy została nazwana efektem Warburga [173, 174].

Znaczące zmiany w metabolizmie energetycznym komórek nowotworowych obejmują:

- nadekspresję transporterów glukozy GLUT, wywołującą jej zwiększony wychwyt,
- indukcję enzymów szlaku glikolitycznego, powodującą wzrost metabolizmu glukozy,
- nadekspresję genu kinazy pirogronianowej i zwiększoną ilość izoformy M2 (PKM2) co umożliwia przekierowanie glukozy na szlak pentozofosforanowy, dostarczającego pewnych związków np. NADPH czy pentoz niezbędnych do syntezy biomolekuł,
- wzrost ekspresji dehydrogenazy mleczanowej, promujący powstawanie mleczanu,
- nadekspresję transporterów monokarboksylowych, które transportują powstały mleczan poza komórkę,
- zwiększoną aktywność transkrypcyjną HIF-1 $\alpha$ , aktywującego metabolizm glukozy [173].

Modyfikacje metaboliczne komórek nowotworowych są jednym z czynników odpowiadających za chemooporność, a hamowanie glikolizy może przyczyniać się do lepszej odpowiedzi na chemioterapię [175, 176]. Na przykład nadmierna ekspresja GLUT1 jest istotnie związana ze słabo zróżnicowanymi nowotworami, dodatnimi pod względem przerzutów do węzłów chłonnych, większymi guzami oraz gorszym całkowitym przeżyciem i przeżyciem wolnym od progresji [177]. Natomiast połączenie inhibitorów GLUT1 z chemioterapeutykami może poprawiać ich skuteczność oraz ułatwiać apoptozę komórek nowotworowych [176]. W nowotworach obserwowana jest również nadekspresja enzymu PFKFB3 (6-fosfofrukto-2-kinaza/fruktozo-2,6-bisfosfataza III), należącego do fosfofruktokinaz, posiadającego aktywność kinazy kierującej glukozę na szlak glikolizy. Do jego nadekspresji dochodzi między innymi

---

pod wpływem niedotlenienia, a skutkiem jego wzmożonej aktywności jest zahamowanie apoptozy, promocja proliferacji, wzmocnienie angiogenezy i migracji komórek śródbłonka oraz tworzenie przerzutów. Przez te efekty PFKFB3 osłabia działanie terapii antyangiogennych oraz ułatwia wymianę mleczanu między komórkami [176, 178].

Innym enzymem ważnym dla metabolizmu komórek rakowych jest PKM2 (ang. Pyruvate Kinase M2), który jest nadekspresjonowany w komórkach szybko proliferujących, w tym w różnych nowotworach. PKM2 pełni kluczową rolę w integracji sygnałów metabolicznych, co sprawia, że kontrola nad przepływami glukozy jest wysoce wrażliwa na pojawiające się potrzeby komórkowe. W odpowiedzi na te sygnały PKM2 kieruje glukozę na produkcję energii oraz procesy biosyntezy, mogące prowadzić do proliferacji komórek. Inhibitory PKM2 mogą zwiększać skuteczność standardowych schematów chemioterapeutycznych, szczególnie w kontekście nowotworów lekoopornych [179, 180].

Wśród enzymów pośredniczących w plastyczności metabolizmu komórek nowotworowych występuje dehydrogenaza mleczanowa A (LDHA) i dehydrogenaza mleczanowa B (LDHB). LDHA ma wyższe powinowactwo do pirogronianu i preferencyjnie przekształca pirogronian w mleczan w warunkach beztlenowych, podczas gdy LDHB ma wyższe powinowactwo do mleczanu, preferencyjnie przekształcając mleczan w pirogronian, gdy tlen jest obfity. Jednakże niezależnie od preferencji, zarówno LDHA, jak i LDHB są zdolne do konwersji pirogronianu do mleczanu. Oprócz niekwestionowanej roli obu enzymów w metabolizmie komórek nowotworowych i adaptacji do niekorzystnych warunków środowiskowych lub komórkowych, enzymy te uczestniczą w regulacji śmierci komórek [181]. Enzymy LDH są kluczowe dla powstania ostatecznego metabolitu, jakim jest mleczan. Indukuje on stan zapalny oraz napływ komórek odpornościowych, w tym makrofagów, wydzielających cytokiny i czynniki wzrostu, które mogą stymulować wzrost komórek nowotworowych angiogenezę i tworzenie przerzutów. Dodatkowo podwyższone stężenie kwasu mlekowego osłabia aktywność cytotoksycznych limfocytów T i leukocytów w zabijaniu komórek rakowych [182]. Szereg badań wskazuje, że zahamowanie LDHA zwiększa wrażliwość na promieniowanie jonizujące oraz zatrzymuje wzrost guza poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego G2/M, indukcję stresu oksydacyjnego i apoptozy poprzez wzmocnienie wytwarzania mitochondrialnych ROS [183-185]. Eksperymenty, w których wyłączono geny LDHA lub LDHB pokazały,

---

że brak aktywności jednego z nich redukuje powstawanie mleczanu, jednak całkowite stłumienie jego produkcji występuje w komórkach, w których wyłączono oba geny. Co więcej, komórki z usuniętymi genami LDH w normoksji przełączyły swój metabolizm na fosforylację oksydacyjną, co spowodowało dwukrotną redukcję tempa proliferacji, natomiast w hipoksji, wzrost *in vitro* został całkowicie zablokowany [186]. Badania tkanek pacjentów z rakiem płuca wykazały, że nagromadzeniu komórek starych towarzyszył wzrost ekspresji HIF1- $\alpha$  oraz GLUT-1. Co więcej, u tych pacjentów zaobserwowano pogorszone wskaźniki przeżycia [187]. Powyższe obserwacje wskazują na związek starzenia, niedotlenienia oraz metabolizmu beztlenowego w tym typie nowotworu. Ponadto celowe wydaje się podejście polegające na hamowaniu metabolizmu beztlenowego, aby ograniczyć chemooporność obserwowaną w niedrobnokomórkowym raku płuca.

---

## 2 Założenia i cel pracy

Celem prezentowanej pracy było zbadanie starzenia komórkowego oraz ucieczki od starzenia pod wpływem chemioterapeutyków w niedrobnokomórkowym raku płuca, a także wpływu niedotlenienia oraz modulacji metabolizmu beztlenowego i autofagii na starzenie/ucieczkę od starzenia.

Dla osiągnięcia powyższego celu skupiono się na kilku głównych aspektach:

- określeniu dawek chemioterapeutyków indukujących starzenie komórek raka płuca,
- ocenie, czy niedotlenienie ma wpływ na starzenie/ucieczkę od starzenia komórek niedrobnokomórkowego raka płuca oraz czy odpowiedź komórek jest zależna od zastosowanego leku,
- określeniu wpływu hipoksji na cechy komórek starych niedrobnokomórkowego raka płuca związane z EMT oraz macierzystością,
- zbadaniu, czy modulacja enzymów LDH lub zahamowanie autofagii wpływa na starzenie/ucieczkę od starzenia komórek raka płuca,
- weryfikacji kluczowych wyników w mysim modelu raka płuca *in vivo*,
- ocenie markerów molekularnych związanych z hipoksją i starzenie/ucieczką od starzenia heterogenności guzów w materiale pobranym od pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca.

---

### **3 Materiały i metody**

#### **3.1 Użyte odczynniki**

Cisplatynę (CIS), docetaxel (DOC), hydroksychlorokinę (HCQ) i bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowy (MTT) otrzymano z Sigma Aldrich, St. Louis, MO. Nutlin-3 (NUT) zakupiono z Tocris Bioscience, Bristol, Wielka Brytania. Albuminę surowicy bydlęcej (ang. Bovine Serum Albumin, BSA) nabyto od firmy Biowest, Nuaille, Francja. Przeciwciała przeciwko p53 i p16 otrzymano z Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX. Przeciwciała przeciwko: p-cdc2, cyklinie B, p-Rb, E-kadherynie, N-kadherynie, SOX-2 i Nanog nabyto z Cell Signaling Technology, Danvers, MA. Przeciwciała przeciwko p21 zakupiono od Sigma Aldrich St. Louis, MO. Przeciwciała przeciwko p62 i p-S6 (Ser235/236) nabyto z BD Transduction Laboratories<sup>TM</sup>, Lexington, KY. Przeciwciała przeciwko GAPDH uzyskano z Millipore, Temecula, CA i ALDH1A z LifeSpan Biosciences, Seattle, WA. Drugorzędowe przeciwciała anty-mysz i anty-królik sprzężone z HRP uzyskano z Vector Laboratories, Burlingame, CA. Glicynę oraz Tris base do elektroforezy zakupiono z Sigma Aldrich, St. Louis, MO, natomiast SDS z Serva, Heidelberg, Niemcy.

#### **3.2 Zastosowane metody badawcze**

##### **3.2.1 Hodowle komórkowe**

Komórki ludzkiego raka płuca A549 oraz mysiego raka płuca Lewisa LLC1 hodowano w pożywce DMEM ze zwiększonym stężeniem glukozy (4,5 mg/l), zawierającej glutamax i pirogronian sodu (Gibco, Life Technologies Limited, Wielka Brytania) uzupełnionej o 10% płodową surowicą bydlęcą (Gibco, Life Technologies Limited, Wielka Brytania) z dodatkiem 100 jednostek/ml penicyliny, 100 µg/ml streptomycyny i 0,25 µg/ml amfoterycyny B (Antibiotic-Antimycotic, Gibco, Life Technologies Corporation, Grand Island, NY). Eksperymenty prowadzono w normoksji (~19% O<sub>2</sub>) lub hipoksji (1% O<sub>2</sub>) w standardowych warunkach hodowli (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Po doświadczeniach komórki zbierano przez trypsynizację (Gibco, Life Technologies Limited, UK).

Hodowle hipoksyjne prowadzono w komorze zapewniającej kontrolowane stężenie tlenu (X3 system, Biospherix, Parish, NY). Działanie hipoksji na komórki potwierdzono

---

metodą NGS. Na przykład ekspresja indukowanego niedotlenieniem mir210HG i czynnika indukowanego niedotlenieniem 3 z rodziny Egl-9 (EGLN3) była podwyższona w komórkach pochodzących z hodowli hipoksyjnej (dane nieprzedstawione).

### **3.2.2 Ogólny schemat eksperymentalny**

W doświadczeniach prowadzonych na płytkach 96-dołkowych wysiewano komórki w liczbie 1500 na dołek dla linii A549 oraz 91 na dołek dla linii LLC1 w 100  $\mu$ l pożywki. W eksperymentach wykonanych na butelkach hodowlanych o powierzchni 25  $\text{cm}^2$  wysiewano po 125 000 komórek w 4ml pożywki na butelkę dla obu linii komórkowych. Po wysianiu wszystkie komórki inkubowano w warunkach normoksyjnych przez pierwsze 24 godziny eksperymentu. Po tym czasie część naczyń hodowlanych przenoszono do komory hipoksyjnej, gdzie zmieniano medium na hipoksyjne (medium inkubowane 24 godziny w komorze hipoksyjnej). Po kolejnej dobie hodowli w normoksji lub hipoksji, komórki poddano działaniu chemioterapeutyków przez następne 24 godziny. Wyjściowy roztwór CIS przygotowano poprzez rozpuszczenie leku w PBS-ie do stężenia 7,5 mM, który następnie rozcieńczono do stężenia 8  $\mu$ M dla A549 lub 6  $\mu$ M dla komórek LLC1. Roztwór DOC otrzymano, rozpuszczając lek w DMSO i doprowadzając do stężenia 10mM, natomiast docelowo stosowano terapeutyk w stężeniu 3 nM. Roztwór VIN rozpuszczono w wodzie do stężenia 10mM, a docelowo stosowano stężenia 10nM i 50nM. Chemioterapeutyki dla hodowli hipoksyjnych zostały rozcieńczone w medium hipoksyjnym. Po dobowej inkubacji z lekami pożywkę zmieniono i komórki hodowano w pożywce bez leku przez kolejne 7 dni, przy czym po 4 dniach od usunięcia leku medium ponownie wymieniono. Analizy przeprowadzano w 11. dniu eksperymentu.

### **3.2.3 Wyciszanie genów metodą siRNA**

W celu przeprowadzenia procedury wyciszenia genów zmodyfikowano ogólny schemat eksperymentalny, wydłużając go o jeden dzień. Komórki A549 wysiano w ilości 750 na dołek lub 62 500 komórek na butelkę o powierzchni 25  $\text{cm}^2$  w normoksji. 24 godziny później część naczyń hodowlanych przeniesiono do komory hipoksyjnej oraz we wszystkich hodowlach zmieniono medium. Po 24-godzinnej inkubacji komórki transfekowano roztworami zawierającymi siRNA skierowanymi na geny związane z metabolizmem beztlenowym: LDHA lub LDHB lub autofagią: ATG5,

---

ATG7 lub BCN1 (ON-TARGETplus siRNA, Dharmacon, Lafayette, CO) z użyciem lipofektaminy RNAiMAX (Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad CA). W celu ułatwienia degradacji docelowego RNA użyte siRNA stanowiło mieszaninę kilku sekwencji skierowanych w różne regiony tego samego genu (tzw. pooled siRNA). Jako kontrolę zastosowano siRNA negatywne.

Roztwory lipofektaminy i siRNA przygotowano poprzez ich rozcieńczenie w pożywce hodowlanej bez dodatku FBS oraz bez roztworu antybiotyków. Roztwory siRNA o stężeniu 20 mM rozcieńczono w stosunku 1:500, natomiast lipofektaminę rozcieńczono w stosunku 1:125. Po pięciominutowej inkubacji w RT połączono roztwór siRNA z roztworem lipofektaminy, a następnie inkubowano je przez 20 minut w RT, mieszając co kilka minut. Po tym czasie otrzymane roztwory rozcieńczono niekompletnym medium hodowlanym uzupełnionym 10% FBS w stosunku 1:3. Roztwory dla hodowli hipoksyjnych były przygotowywane w pożywkach hipoksyjowanych.

Tak przygotowane roztwory nałożono na komórki na 4,5 godziny, a po tym czasie wymieniono medium hodowlane na kompletne medium z surowicą i antybiotykami. Następnego dnia komórki rakowe były traktowane odpowiednimi lekami przez 24 godziny (zgodnie z opisem w punkcie 3.2.2.), po których następowało 7 dni hodowli bez leków, podczas których w dniu 4 wymieniono medium. Wszystkie analizy przeprowadzono w 12. dniu eksperymentu.

#### **3.2.4 Hamowanie aktywności LDH za pomocą oksamatu sodu**

Eksperymenty z oksamatem sodu (SO, Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific, Wielka Brytania) do dnia 4 po leczeniu chemioterapeutycznym przeprowadzono jak w ogólnym schemacie eksperymentalnym (punkt 3.2.2.) na 96-dołkowych płytkach hodowlanych. Po tym czasie aby zahamować metabolizm beztlenowy użyto SO, będący specyficznym inhibitorem LDHA. SO rozpuszczono w wodzie do stężenia 0,5 mM, a następnie rozcieńczono do stężeń 10 mM, 25 mM i 50 mM. Roztwory SO podano na 24 godziny po których wymieniono pożywkę i hodowano bez leku przez kolejne 3 dni. Następnie komórki zbierano przez trypsynizację w dniu 11.

#### **3.2.5 Hamowanie autofagii z zastosowaniem hydroksychlorokiny**

Eksperymenty z hydroksychlorochiną (HCQ, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) przeprowadzono zgodnie z ogólnym schematem eksperymentalnym (punkt 3.2.2.) do 4



---

dnia po traktowaniu lekami. W tym momencie, w celu zahamowania autofagii, podano HCQ uprzednio rozpuszczony w wodzie do stężenia 50 mM, a następnie rozpuszczony do 50  $\mu$ M na 24 godziny. Po tym czasie w celu analizy ekspresji genów komórki zebrano przez trypsynizację (dzień 8. eksperymentu). Do wszystkich innych analiz w komórkach po 24-godzinnej hodowli z HCQ wymieniano medium i hodowano bez leku przez kolejne 3 dni. Po tym czasie, w 11. dniu eksperymentu komórki zbierano przez trypsynizację w celu wykonania analiz.

### **3.2.6 Aktywacja p53 przy użyciu Nutliny-3**

W celu zbadania roli p53 w ucieczce przed starzeniem się komórek poddanych działaniu CIS w hipoksji, zastosowano nutlinę-3 (NUT, Tocris, Wielka Brytania). Nutlina-3 jest antagonistą wiązania p53 z MDM2 (ujemnego regulatora p53), dzięki czemu pełni funkcję aktywatora p53. Eksperyment wykonano zgodnie z ogólnym schematem (3.2.2.), z modyfikacją w dniu podania leku. Razem z CIS komórkom podano roztwór NUT o stężeniu 15  $\mu$ M (przygotowany z roztworu o stężeniu 10 mM powstałego w wyniku rozpuszczenia NUT w DMSO). Po 24 godzinach inkubacji komórek z CIS oraz NUT pożywkę zmieniono i dalej hodowano je w pożywce bez leku przez kolejne 7 dni, przy czym po 4 dniach pożywka została wymieniona na świeżą.

### **3.2.7 Pomiar aktywności metabolicznej- test MTT**

Aktywność metaboliczną oceniano, mierząc zdolność przekształcania pomarańczowej, rozpuszczalnej w wodzie soli tetrazolowej MTT do nierozpuszczalnych, fioletowych kryształów formazanu, dzięki aktywności enzymu dehydrogenazy mitochondrialnej w żywych komórkach.

Komórki hodowano na płytkach 96-dołkowych, zgodnie z opisanymi wcześniej schematami eksperymentalnymi. W dniu zakończenia eksperymentu komórki inkubowano w 37°C przez 2 godziny z MTT, dodając do każdego dołka (bez uprzedniego usuwania pożywki) po 10  $\mu$ l roztworu MTT w PBS o stężeniu 5 mg/ml, doprowadzając do stężenia końcowego 0,5 mg/ml. Po tym czasie usunięto pożywkę, a otrzymane kryształy rozpuszczono w kwaśnym izopropanolu (izopropanol z 50 mM HCl). Aktywność enzymu była wprost proporcjonalna do ilości powstałego produktu. Intensywność zabarwienia mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 562 nm za pomocą wielodołkowego spektrofotometru skanującego Varioskan Lux (Thermo Scientific).

---

### 3.2.8 Pomiar proliferacji komórek- test BrdU

Ocenę proliferacji komórek raka płuc przeprowadzono przy użyciu testu Cell Proliferation ELISA, BrdU (Roche, Niemcy). BrdU (bromodeoksyurydyna) jest analogiem tymidyny, jednej z zasad azotowych DNA. W komórkach proliferujących BrdU jest inkorporowane do syntetyzowanej nici DNA podczas fazy S cyklu komórkowego. Detekcja wbudowanego do DNA analogu odbywa się poprzez zastosowanie specyficznych przeciwciał sprzężonych z enzymem, którego reakcja z chromogennym substratem pozwala na kolometryczny pomiar aktywności proliferacyjnej komórek.

Komórki hodowano na płytkach 96-dołkowych, jak opisano wcześniej. W dniu zakończenia eksperymentu, do hodowli bez uprzedniego usuwania pożywki dodano 10  $\mu$ l rozcieńzonego roztworu BrdU o stężeniu 100  $\mu$ M, doprowadzając do stężenia 10  $\mu$ M. Po 2-godzinnej inkubacji w warunkach standardowej hodowli usunięto pożywkę, a komórki utrwalano przez 30 minut, dodając po 100  $\mu$ l nierozcieńzonego roztworu utrwalacza z zestawu. Następnie po usunięciu utrwalacza podano po 100  $\mu$ l 100x rozcieńzonego w odpowiednim roztworze przeciwciała anty-BrdU, skoniugowanego z peroksydazą. Po 1,5-godzinnej inkubacji przeciwciała niezwiązane odpłukano, dodając po 200  $\mu$ l rozcieńzonego 10-krotnie w PBS roztworu płuczącego. Reakcję barwną wywołano poprzez dodanie roztworu tetrametylobenzydyny, która w wyniku aktywności peroksydazy ulega reakcji do niebieskiego produktu. W ostatnim kroku reakcję barwną zatrzymano poprzez dodanie 25  $\mu$ l 1M roztworu HCl. Intensywność powstałego zabarwienia mierzono przy długości fali 450 nm za pomocą wielodołkowego spektrofotometru skanującego Varioskan Lux.

### 3.2.9 Oznaczanie aktywności SA- $\beta$ -galaktozydazy

W celu wykrycia aktywności SA- $\beta$ -gal wykonano barwienie cytochemiczne. Komórki po trypsynizacji przepłukano w PBS, a następnie utrwalano w 1ml roztworu zawierającego 2% formaldehydu i 0,2% aldehydu glutarowego w PBS przez 5 minut w RT. Po tym czasie do utrwalonych komórek dodano 2 ml roztworu PBS i wirowano przy prędkości 1200 obr/min. Następnie 80 000 komórek osadzono na szkiełku podstawowym przy użyciu zestawu Cytoset (MPW Med. Instruments, Warszawa, Polska), wirując z prędkością 800 obr/min przez 5 min. W dalszej kolejności komórki

---

przez 16 godzin inkubowano w temperaturze 37°C z roztworem 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. Szkiełka mikroskopowe po barwieniu zostały trzykrotnie przemyte roztworem PBS przez 5 minut i zamknięte szkiełkiem nakrywkowym przy użyciu medium (Dako, Carpinteria, CA). Następnie obliczono dodatnie i ujemne komórki SA- $\beta$ -Gal (minimum 100 komórek), a wyniki przedstawiono jako procent komórek SA- $\beta$ -Gal pozytywnych.

### **3.2.10 Pomiar stężenia białka całkowitego w lizatach komórkowych- test BCA**

Stężenie białka całkowitego określono przy użyciu zestawu Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL). Ta metoda łączy reakcję biuretową, w której w obecności białka dochodzi do redukcji jonów Cu<sup>2+</sup> do Cu<sup>1+</sup> w środowisku zasadowym z czułym i selektywnym kolorymetrycznym wykrywaniem jonu Cu<sup>1+</sup> przy użyciu kwasu bicynchoninowego (BCA). Fioletowy produkt reakcji powstaje w wyniku chelatacji dwóch cząsteczek BCA z jednym jonem Cu<sup>1+</sup>, a więc ilość powstałego produktu barwnego jest proporcjonalna do ilości białka w próbce badanej.

Komórki hodowano zgodnie ze schematem eksperymentalnym na butelkach o powierzchni 25cm<sup>2</sup>. 7 dni po leczeniu chemioterapeutycznym odklejano je przez trypsynizację, wirowano przy prędkości 1200 obr/min. Następnie komórki przepłukano w PBS po czym zawieszono w buforze lizującym RIPA (Thermo Scientific, Rockford, IL) i zamrożono w -20°C. Przed pomiarem stężenia białka roztwory rozmrażano w łaźni lodowej po czym wirowano przy 10000 obr/min, a supernatanty odpipetowano do nowych próbek.

Otrzymane nadsącze do pomiaru rozcieńczono 20x w roztworze PBS (1  $\mu$ l supernatantu + 19  $\mu$ l PBS), po czym nałożono po 5  $\mu$ l każdego rozcieńczenia w tryplikatach na płytkę 96-dołkową. Następnie do każdego dołka dodano po 100  $\mu$ l roztworu złożonego z odczynnika A oraz odczynnika B połączonych w stosunku 50:1. Płytkę po nałożeniu wszystkich roztworów dokładnie wymieszano i inkubowano przez 30 minut w 37°C. Po tym czasie zmierzono absorbancję przy długości fali 562 nm za pomocą wielodołkowego spektrofotometru skanującego Varioskan Lux.

Jako standard użyto albuminy surowicy bydlęcej (ang. Bovine Serum Albumin, BSA). Stężony roztwór standardu 30 mg/ml rozcieńczono do końcowych stężeń 2000  $\mu$ g/ml, 1000  $\mu$ g/ml, 500  $\mu$ g/ml oraz 250  $\mu$ g/ml poprzez seryjne rozcieńczenia w PBS

---

i postępowano tak jak z próbkami badanymi. Na podstawie krzywej standardowej wyznaczono stężenia białka całkowitego obecnego w badanych próbkach.

### **3.2.11 Oznaczanie hipertrofii komórek**

Hipertrofia komórek, czyli ich powiększenie jest jedną z cech starzenia komórkowego. Parametr ten oszacowano na podstawie ilości białka całkowitego przypadającego na jedną komórkę. Stężenie białka badano metodą BCA (opis w punkcie 3.2.10.), a całkowitą liczbę komórek zliczono w komorze Bürkera. Wyniki przedstawiono, obliczając stosunek białka całkowitego do liczby komórek zebranej z butelki hodowlanej o powierzchni 25cm<sup>2</sup>.

### **3.2.12 Badanie ekspresji białek z użyciem hybrydyzacji western-blot**

Ekspresję białek badano, stosując hybrydyzację typu western, składającej się z kilku etapów. Pierwszy polegał na elektroforetycznym rozdeleniu białek w żelu poliakrylamidowym na podstawie ich wielkości. Następnie rozdzielone białka przenoszono w polu elektrycznym na membranę nitrocelulozową. W kolejnym kroku białka na membranie wykrywano przy pomocy specyficznych przeciwciał znakowanych. Ich obecność następnie wizualizowano na kliszy fotograficznej dzięki zastosowaniu odpowiedniego substratu, który w obecności enzymu znakującego przeciwciało przechodził w chemiluminescencyjny produkt, pozostawiając sygnał na kliszy.

Lizaty po pomiarze stężenia białka (punkt 3.2.10) odpipetowano do nowych probówek, w objętości zawierającej jednakową ilość białka dla każdej próbki, a następnie uzupełniono buforem obciążającym Laemmli SDS (Bio-Rad, Hercules, CA lub EurX, Polska) oraz roztworem PBS. W ten sposób otrzymano próbki o jednakowych stężeniach białka, które gotowano przez 5 minut w 95°C, po czym nakładano do studzienek żelu poliakrylamidowego (po 10-50 µg białka na każdą studzienkę). Do każdego żelu nałożono marker wielkości białka (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

Do elektroforezy w warunkach denaturujących użyto gotowe żele poliakrylamidowe, składające się z 4-procentowego żelu zagęszczającego oraz 15-procentowego żelu rozdzielającego (Bio-Rad, Hercules, CA) lub żele przygotowane samodzielnie. Samodzielnie przygotowane żele były złożone z 12-procentowego żelu rozdzielającego oraz 4-procentowego żelu zagęszczającego. Składniki żelu

---

rozdzielającego: 30% akrylamid (4 ml), 1M Tris-HCl o pH=8,8 (3,8 ml), woda destylowana (2,2 ml), 10% APS (0,1 ml), 20% SDS (0,05 ml), TEMED (0,01 ml). Składniki żelu zagęszczającego: 30% akrylamid (1,3 ml), 1M Tris-HCl o pH=6,8 (1,25 ml), woda destylowana (7,34 ml), 10% APS (0,1 ml), 20% SDS (0,05 ml), TEMED (0,01 ml).

Elektroforezę przeprowadzono przy napięciu 100 - 150V w RT przez około 60 - 120 minut, wykorzystując aparat Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad, Hercules, CA). Zastosowano bufor TGS (TRIS-glicyna-SDS, zawierający 25 mM Tris-HCl, 0,2 M glicyny, oraz 0,05% SDS) poprzez rozcieńczenie wodą destylowaną z roztworu 10-krotnie stężonego o pH 8,3.

Po elektroforezie przeprowadzono transfer rozdzielonych białek z żelu na membranę nitrocelulozową (Bio-Rad, Hercules, CA) zgodnie z poniższym układem:

anoda (+) – 3 bibuły Whatman’a –membrana – żel – 3 bibuły Whatman’a – katoda (-).

Transfer prowadzono w tym samym aparacie, którego użyto do elektroforezy, 1,5 godziny przy natężeniu 350 mA lub przez noc przy napięciu 30V w 4°C w buforze TG z metanolem (25 mM Tris-HCl, 0,2 M glicyna, 20% metanol, pH=8,3).

Skuteczność transferu potwierdzano barwieniem Ponceau-S (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Następnie barwnik wypłukano buforem TBST (ang. Tris Buffered Saline with Tween, o składzie: 30 mM TrisHCl, 75 mM NaCl, Tween 20, pH=7,6). Wypłukaną membranę inkubowano przez noc w 4°C lub przez 1 godzinę w RT w buforze TBST zawierającym 5% odtłuszczonego mleka w celu zablokowania niespecyficznego miejsca wiązania na membranie. Po zablokowaniu membranę wypłukano przy użyciu buforu TBST (6 x 5 minut, RT), a następnie inkubowano przez noc w 4°C w roztworach przeciwciał pierwszorzędowych rozcieńczonych buforem TBST (w stosunku 1:10 000 dla GAPDH, a dla pozostałych przeciwciał w stosunku 1:1000). Następnie membranę wypłukano jak po blokowaniu i inkubowano przez 1-godzinę w RT w roztworach odpowiednich przeciwciał drugorzędowych znakowanych peroksydazą chrzanową. Roztwory przeciwciał drugorzędowych przygotowano poprzez rozcieńczenie w stosunku 1:10 000 w 5-procentowym odtłuszczonego mleka rozpuszczonym w buforze TBST). Po inkubacji membrany ponownie wypłukano buforem TBST, a obecność białek wizualizowano na kliszy rentgenowskiej z użyciem substratów chemiluminescencyjnych dla peroksydazy (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX lub Bio-Rad, Hercules, CA). Wyniki ilościowe ekspresji białek

---

otrzymano na podstawie analizy densytometrycznej przeprowadzonej za pomocą oprogramowania komputerowego ImageJ.

### **3.2.13 Analiza wielkości i ziarnistości komórek oraz ich rozkładu w cyklu komórkowym z użyciem cytometrii przepływowej**

W dniu zakończenia eksperymentu komórki zebrano do analizy cyklu komórkowego przez trypsynizację. Odklejone komórki odwirowano przy 1200 obr/min przez 5 minut, zawieszono w 500  $\mu$ l PBS po czym utrwalono w zamrożonym 70% etanolu. Do czasu analizy utrwalone komórki przechowywano w  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Przed analizą komórki przepłukano PBS, odwirowano przy 1200 obr/min i zawieszono w 200  $\mu$ l odczynnika zawierającego jodek propidyny (PI) Muse<sup>TM</sup> Cell Cycle Reagent (Millipore, Hayward, CA). PI to barwnik fluorescencyjny barwiący DNA poprzez interkalację pomiędzy zasadami podwójnej nici. Intensywność sygnału fluorescencyjnego jest zatem proporcjonalna do ilości DNA w komórce, co można przypisać odpowiedniej fazie cyklu komórkowego.

Analizę cytometryczną wykonano za pomocą cytometru przepływowego Beckman Coulter CytoFLEX oraz oprogramowania CytExpert. Dla każdej próbki przeanalizowano co najmniej 10 000 zdarzeń. Badana zawiesina komórek przechodząc przez komorę pomiarową cytometru została naświetlona promieniowaniem laserowym, które uległo rozproszeniu przez przepływające komórki. Natężenie rozproszenia zostało zarejestrowane na odpowiednich detektorach. Detektor FSC (ang. Forward Scatter Characteristics) odpowiada rozproszeniu czołowemu, które jest związane z wielkością komórki. Detektor SSC (ang. Side Scatter Characteristics) związany jest z rozproszeniem bocznym, świadczącym o takich parametrach jak złożoność komórki, w tym jej ziarnistość.

Bazując na parametrach FSC i SSC wyłączono z analizy zdarzenia o bardzo niskich wartościach FSC i SSC, lokalizujące się na wykresie FSC/SSC typu dot-plot w lewym dolnym rogu, przed główną chmurą populacji komórek. Na podstawie tego samego wykresu wyznaczono również odsetek komórek ziarnistych, odcinając bramkę powyżej głównej chmury komórek kontrolnych.

Następnie wykreślono wykres zależności liczby obserwowanych zdarzeń od intensywności fluorescencji PI, proporcjonalnej do ilości DNA zawartej w komórce. Na tej podstawie zidentyfikowano poszczególne fazy cyklu komórkowego, wyznaczając dwa główne piki: G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (pierwszy pik) oraz G<sub>2</sub>/M (drugi pik). Pomiędzy nimi

---

wyznaczono komórki w fazie S, przed pierwszym pikiem zlokalizowano fazę subG1 natomiast za drugim pikiem – poliploidię. Wyniki przedstawiono jako odsetek komórek nagromadzonych w różnych fazach cyklu komórkowego.

### **3.2.14 Izolacja RNA**

Do izolacji RNA z komórek użyto zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy). Komórki A549 do badania ekspresji genów zbierano w 5 lub 7 dniu po leczeniu chemioterapeutycznym. W tym celu usunięto pożywkę, a komórki poddano lizie, dodając 650  $\mu$ l buforu RLT na butelkę o powierzchni 25 cm<sup>2</sup>. Następnie lizat przeniesiono do nowej probówki i dodano 650  $\mu$ l 70-procentowego etanolu, po czym roztwór dokładnie wymieszano przez pipetowanie. W kolejnym kroku 700  $\mu$ l mieszaniny przeniesiono na kolumnę, którą wirowano 15 sekund z przyspieszeniem 8000 x g. Przenoszenie na kolumnę powtórzono, aby do izolacji użyć całą próbkę badaną. Następnie kolumnę przepłukano 700  $\mu$ l buforu RW1 i wirowano przy takich samych warunkach jak poprzednio. Powtórzono płukanie, używając 500  $\mu$ l buforu RPE, a następnie zwirowano tak jak poprzednio. Do ostatniego płukania użyto 500  $\mu$ l buforu RPE po czym wirowano 2 minuty z przyspieszeniem 8000 x g. Wypłukane membrany wysuszono, poprzez ich umieszczenie w nowych probówkach i wirowanie 1 minutę z maksymalnym przyspieszeniem. Następnie kolumny przełożono do nowych probówek, a RNA na kolumnie poddano elucji z użyciem 25  $\mu$ l wody wolnej od RNaz, po czym wirowano je przez 1 minutę z przyspieszeniem 8000 x g. Elucję powtórzono, nakładając na kolumnę 25  $\mu$ l wody.

Tkanki do izolacji RNA przechowywano w -20°C w 500  $\mu$ l TRIzol (Ambion, Austin, TX). Przed izolacją tkanki poddano homogenizacji przy pomocy urządzenia TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Niemcy). Po homogenizacji izolowano RNA z zastosowaniem zestawu do izolacji RNA opartym na metodzie Chomczyńskiego i Sacchi'ego (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Do homogenatu dodano 50  $\mu$ l octanu sodu, wymieszano przez odwracanie, po czym dodano 500  $\mu$ l fenolu i ponownie wymieszano. Następnie dodano 100  $\mu$ l mieszaniny chloroformu i alkoholu izoamylowego, po czym przez 10 sekund intensywnie mieszano. Tak otrzymane mieszaniny inkubowano przez 30 minut w łaźni lodowej, a następnie wirowano w 4°C przez 30 minut z przyspieszeniem 10 000 x g. Po wirowaniu górną fazę zawierającą RNA przenoszono do nowej probówki i mieszano z taką samą objętością izopropanolu. Tak otrzymane mieszaniny inkubowano przez noc w -20°C w celu wytrącenia RNA. Po

inkubacji mieszaniny wirowano w 4°C przez 20 minut z przyspieszeniem 10 000 x g. W kolejnym kroku usunięto supernatant po wirowaniu, a osad rozpuszczono w 150 µl roztworu D (denaturującego). Następnie ponownie wytrącono RNA, dodając 150 µl izopropanolu, wymieszano i inkubowano w -20°C przez 1-godzinę. Po inkubacji osad RNA odzyskano przez wirowanie w 4°C przez 10 minut z przyspieszeniem 10 000 x g. Na koniec osad dwukrotnie przepłukano etanolem, wysuszono i rozpuszczono w 25 µl wody wolnej od RNaz.

Stężenie i jakość RNA oceniano za pomocą spektrofotometru Varioskan Lux (Thermo Scientific). Wyizolowane RNA przechowywano w -80°C.

### 3.2.15 Odwrotna transkrypcja

Wyizolowane RNA poddano odwrotnej transkrypcji przy użyciu zestawu High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Waltham, MA). W tym celu sporządzono 2 x stężoną mieszaninę reakcyjną o składzie przedstawionym w tabeli 3.1:

<b>Składnik mieszaniny</b>	<b>Objętość na 1 reakcję (µl)</b>
10 x stężony bufor do odwrotnej transkrypcji	2
25 x stężony (100mM) mix trójfosforanów deoksyrybonukleotydów (dNTP)	0,8
10 x stężone startery	2
Odwrotna transkryptaza	1
Woda wolna od RNaz	4,2

*Tab. 3.1. Skład 2 x stężonej mieszaniny reakcyjnej do odwrotnej transkrypcji, na podstawie instrukcji producenta.*

Dla każdej reakcji połączono 10 µl 2 x stężonej mieszaniny, z 1 µg RNA i uzupełniono wodą wolną od RNaz do końcowej objętości 20 µl. Przygotowanie mieszanin reakcyjnych przeprowadzono na bloku chłodzącym w komorze do pracy z RNA (Biosan, Warren, MI). Gotowe mieszaniny poddano reakcji odwrotnej transkrypcji zgodnie z tabelą 3.2. Po reakcji otrzymane cDNA rozcieńczono 5-krotnie, dodając 80 µl wody wolnej od RNaz, a następnie zamrożono w -20°C do czasu przeprowadzenia reakcji qPCR.



<b>Etap</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Czas (minuty)</b>
1	25	10
2	37	120
3	85	5
4	4	∞

*Tab. 3.2. Profil temperaturowy reakcji odwrotnej transkrypcji, na podstawie instrukcji producenta.*

### **3.2.16 Ilościowa reakcja łańcuchowej polimerazy- qPCR**

Otrzymane w wyniku odwrotnej transkrypcji cDNA użyto jako matrycę w reakcji qPCR (ang. quantitative Polymerase Chain Reaction). Do reakcji użyto 2 x stężoną mieszaninę reakcyjną TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Waltham, MA). Zastosowano startery typu TaqMan (Thermo Scientific, Rockford, IL), wyszczególnione w tabeli 3.3.

<b>Nazwa badanego genu</b>	<b>Symbol startera</b>	<b>Fluorochrom</b>
HIF-1 $\alpha$	Hs00153153_m1	FAM
HIF-2 $\alpha$	Hs01026149_m1	VIC
E-kadheryna	Hs01023894_m1	FAM
SOX-2	Hs01053049_s1	FAM
ALDH1A	Hs00946916_m1	FAM
Nanog	Hs04399610_g1	VIC
OCT-3/4	Hs04260367_gH	VIC
PPIA	Hs01565699_g1	FAM

*Tab. 3.3. Wykaz starterów użytych do reakcji qPCR.*

Do pojedynczej reakcji dodawano 2  $\mu$ l cDNA (szczegóły w punkcie 3.2.15.), 5  $\mu$ l 2x stężonej mieszaniny reakcyjnej, 0,5  $\mu$ l mieszaniny starterów i 2,5  $\mu$ l wody wolnej od RNaz do końcowej objętości 10  $\mu$ l. Mieszaniny przygotowano na bloku chłodzącym w komorze do pracy z RNA (Biosan, Warren, MI). Reakcję przeprowadzono w termocyklerze CFX Touch 394-well (Bio-Rad, Hercules, CA) zgodnie z profilem temperaturowym przedstawionym w tabeli 3.4.

Etap		Temperatura (°C)	Czas
		50	2 minuty
Aktywacja polimerazy		95	10 minut
Denaturacja	x 40	95	15 sekund
Przyłączanie starterów i wydłużanie powstającej nici		60	60 sekund

**Tab. 3.4. Profil temperaturowy reakcji qPCR, na podstawie instrukcji producenta.**

Jako genu odniesienia użyto PPIA. Przeprowadzono analizę ekspresji, przedstawiając względną ekspresję genu, wyliczoną na podstawie różnic w wartościach Ct (ang. threshold cycle), czyli numeru cyklu, w którym dochodzi do przecięcia krzywej amplifikacji z poziomem odcięcia. Dla każdej próbki badanej wyliczono wartość  $\Delta Ct$ , czyli różnicę pomiędzy Ct genu badanego, a Ct genu referencyjnego. Następnie wyliczono wartość  $\Delta\Delta Ct$ , czyli różnicę pomiędzy  $\Delta Ct$  dla próbki badanej, a  $\Delta Ct$  dla próbki odniesienia. Ostatecznie względną ekspresję wyliczono ze wzoru:  $R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### 3.2.17 Sekwencjonowanie następnej generacji- NGS

Eksperyment wykonano zgodnie ze schematem opisanym w punkcie 3.2.5. w trzech powtórzeniach biologicznych, porównując komórki leczone CIS i HCQ do leczenia CIS w monoterapii w obu warunkach tlenowych. Całkowity RNA wyizolowano z komórek raka płuca linii A549 5 dni po zakończeniu leczenia chemioterapeutycznego za pomocą RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy). Szczegóły dotyczące izolacji RNA znajdują się w punkcie 3.2.14. Następnie całkowite stężenie i czystość RNA oceniano za pomocą spektrofotometru Varioskan Lux (Thermo Scientific). Ponadto badano również jakość i integralność RNA za pomocą Qubit RNA IQ Assay Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Waltham, MA) na fluorymetrze Qubit. Następnie biblioteki NGS zostały przygotowane przez firmę zewnętrzną Novogene (Cambridge, Wielka Brytania).

Analiza otrzymanych danych została wykonana przez firmę Inteliseq (Kraków, Polska) jako usługa komercyjna. Ocenę jakości odczytów przeprowadzono przy pomocy narzędzia FastQC (v. 0.11.9). Odczyty były dobrej jakości dlatego nie zostały poddane dodatkowej obróbce. Surowe odczyty zostały zmapowane do genomu referencyjnego GRCh38.p13 z bazy Ensembl (v. 104) przy pomocy narzędzia STAR (v.

---

2.1.0). Następnie ustalono poziom ekspresji genów przy użyciu narzędzia featureCounts (v. 2.0.3). Jako referencję użyto pliku GTF z bazy Ensembl (v. 104). Dla każdego genu obliczono następujące wartości:

- ilość zliczeń - czyli ile par odczytów zostało zmapowanych do danego genu;
- CPM (Counts Per Million) - czyli liczba par odczytów zmapowanych do danego genu podzielona przez liczbę wszystkich par odczytów zmapowanych w danej próbce (wielkość biblioteki) pomnożona przez milion;
- zlogarytmowane wartości CPM.

Następnie zbadano różnice w poziomach ekspresji genów pomiędzy wybranymi grupami. Dla każdego z trzech eksperymentów została przeprowadzona analiza mająca na celu porównanie poziomu ekspresji genów pomiędzy dwoma wybranymi grupami. Analizy przeprowadzono w środowisku statystycznym R (v. 4.1.1). Najpierw dane przefiltrowano w taki sposób, aby odrzucić geny o najniższym poziomie ekspresji. W tym celu użyto funkcji filterByExpr z pakietu edgeR (v. 3.34.0) z domyślnymi parametrami. Następnie przeprowadzono analizę porównawczą przy pomocy funkcji glmQLFTest. Za geny o zmienionej ekspresji (ang. Differentially expressed genes, DEGs) uznano geny, których zmiany ekspresji były przynajmniej dwukrotne ( $\text{abs}(\log\text{FC}) > 1$ ) oraz wskaźnik fałszywych wykryć (ang. False discovery Rate, FDR) wynosił  $< 0,1$ . W celu identyfikacji szlaków biologicznych reprezentowanych przez DEGs przeprowadzono analizę nadreperzenracji genów związanych z terminami z bazy KEGG.

### **3.2.18 Eksperymenty *in vivo***

Wszystkie procedury badawcze na zwierzętach laboratoryjnych przeprowadzono w Pracowni Badań Przedklinicznych o Podwyższonym Standardzie Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie. Na badania uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach, nr decyzji 1184/2021 z dnia 27.04.2021.

Zwierzęta utrzymywano w jałowym pomieszczeniu, w standardzie SPF (Specific Pathogen Free) w indywidualnie wentylowanych klatkach (75 wymian/h), w grupach po 5 osobników na klatkę o powierzchni 530 cm<sup>2</sup> i wysokości 14 cm, ze wzbogaconym środowiskiem oraz nieograniczonym dostępem do jałowej karmy i wody. Klatki umieszczono 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 poddano aklimatyzacji, przez co najmniej 14 dni.

Do eksperymentu wykorzystano myszy model syngeniczny raka płuca. Użyto 8-10 tygodniowych samców szczepu w C57BL6/cmdb liczbie 20 osobników sprowadzone do Centrum Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Celem indukcji guza wykorzystano myszą linię raka płuca LLC1, którą nastrzyknięto myszy w okolicę karku (po 100 tysięcy komórek w 100  $\mu$ l PBS/mysz). Gdy guzy osiągnęły wielkość około 100 mm<sup>3</sup>, rozpoczęto dootrzewnowe podawanie rozpuszczonej w PBS cisplatyny 1mg/kg co 3 dni. Przed każdym podaniem leku myszy ważono, natomiast rozmiary guza monitorowano 2 razy w tygodniu przy pomocy suwmiarki, a jego objętość wyliczano według wzoru: objętość = (szerokość)<sup>2</sup> x (długość)/2.

Eksperyment został przedwcześnie zakończony ze względów humanitarnych, ponieważ zastosowana chemioterapia nie wstrzymała wzrostu guzów.

### **3.2.19 Pobieranie materiału od pacjentów**

Próbki guzów uzyskano od pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca Krakowskiego Specjalistycznego Szpitala im. Jana Pawła II na podstawie zgody Komisji Bioetycznej nr:1072.6120.23.2021 z dnia 17.02.2021. Wycinki guzów transportowano w warunkach chłodniczych, w pożywce RPMI (Gibco, Life Technologies Limited, Wielka Brytania) z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej (Gibco, Life Technologies Limited, Wielka Brytania) oraz 100 jednostek/ml penicyliny, 100  $\mu$ g/ml streptomycyny i 0,25  $\mu$ g/ml amfoterycyny B (Antibiotic-Antimycotic, Gibco, Life Technologies Corporation, Grand Island, NY). Izolację RNA przeprowadzono metodą Chomczyńskiego i Sacchi'ego zgodnie z opisem zawartym w punkcie 3.2.14.

### **3.2.20 Analiza statystyczna**

Eksperymenty przeprowadzono w duplikatach lub tryplikatach i powtarzano co najmniej trzy razy. Wyniki wyrażono jako średnią  $\pm$  SEM. Wartości P obliczono w GraphPad PRISM v.9.0. i wartości P < 0,05 uznano za istotne statystycznie (\*w porównaniu z kontrolą N; # w porównaniu z kontrolą H, \$ N w porównaniu z H, % 8 w porównaniu z 11). Normalność rozkładów danych liczbowych sprawdzono za pomocą testu Shapiro-Wilka. W przypadku rozkładu normalnego grupy porównywano za pomocą dwustronnego niesparowanego testu t z poprawką Welcha. W przypadku

---

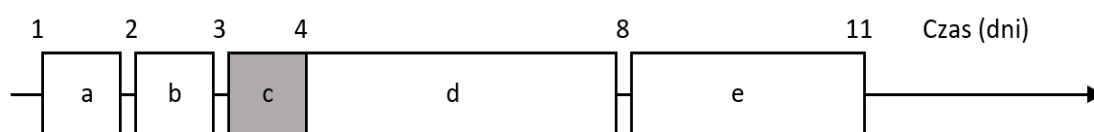
gdy dane nie podlegały rozkładowi normalnemu zastosowano nieparametryczny dwustronny test Manna-Whitneya.

---

## 4 Wyniki

### 4.1 Wyznaczenie dawek chemioterapeutyków powodujących zahamowanie proliferacji

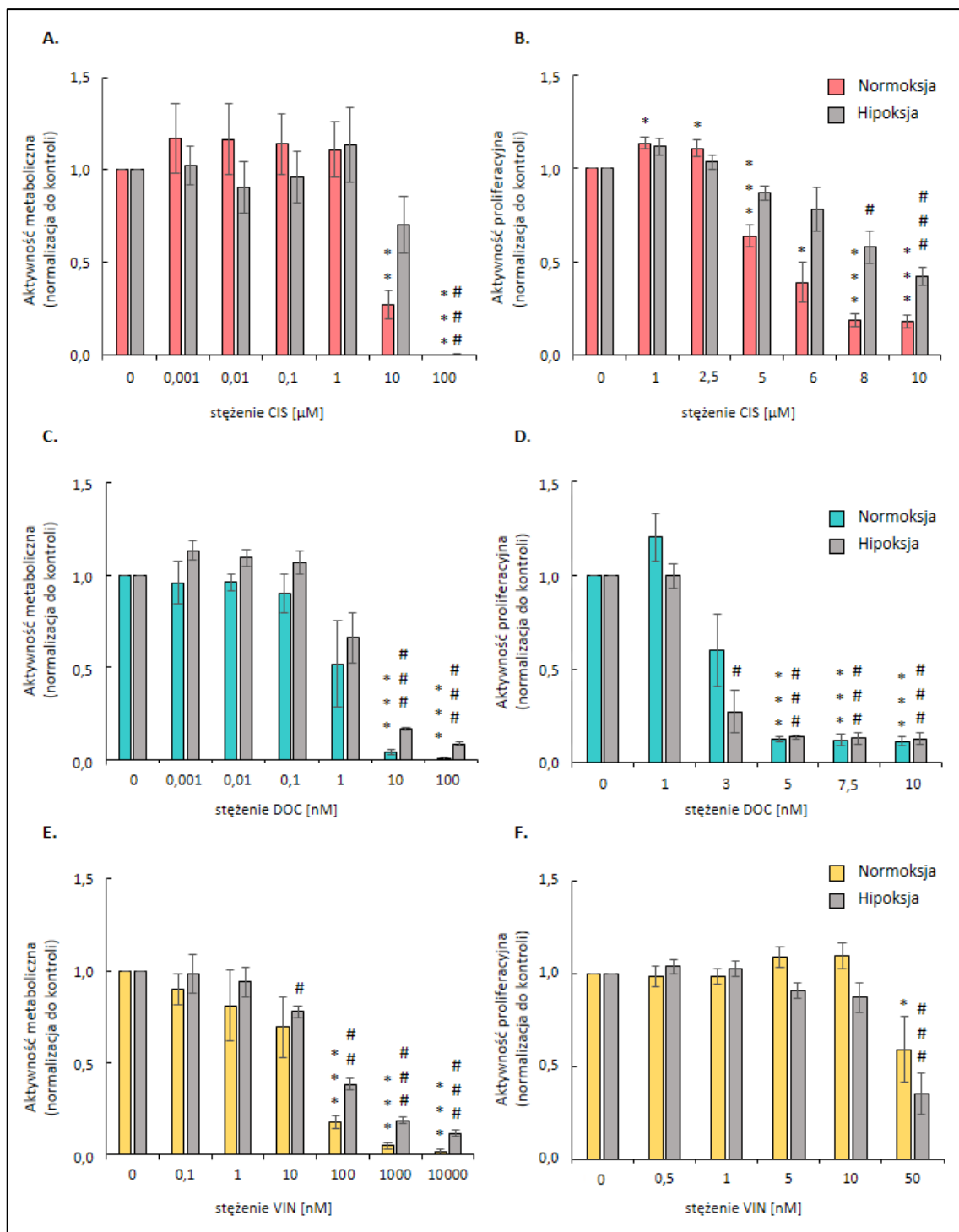
Pierwsze doświadczenia polegały na wyznaczeniu dawek chemioterapeutyków mogących indukować starzenie się komórek raka płuca. Ponieważ u chorych na ten typ nowotworu najczęściej stosuje się chemioterapię łączoną opartą na pochodnej platyny i leku zaburzającym dynamikę mikrotubul, zbadano 3 leki z tych grup: cisplatynę (CIS), docetaksel (DOC) i winorelbinę (VIN). Wzorując się na schemacie podawania chemioterapii pacjentom, przeprowadzono długotrwałe eksperymenty, w których komórki ludzkiego raka płuc linii A549 poddano działaniu chemioterapeutyków (Ryc. 4.1.). 48 godzin po wysianiu komórki przez 24 godziny traktowano CIS, DOC lub VIN. Następnie lek usunięto, a komórki hodowano przez kolejne siedem dni. W celu odwzorowania warunków niedotlenienia panujących w naturalnym mikrośrodkowisku guza, równoległe eksperymenty prowadzono w warunkach hipoksji.



**Ryc. 4.1. Podstawowy schemat eksperymentalny.**

*Komórki hodowano w warunkach normoksji (~19% O<sub>2</sub>) przez 24 godziny (a). Następnie część hodowli przeniesiono do komory hipoksyjnej (19% O<sub>2</sub>) i zmieniono medium hodowlane (b). Po 24 godzinach komórki w warunkach normoksji lub hipoksji traktowano chemioterapeutykami przez 24 godziny (c), a następnie hodowano je w pożywce bez leku przez 4 dni (d). Po tym czasie ponownie zmieniono pożywkę i komórki inkubowano przez kolejne 3 dni (e).*

W pierwszych eksperymentach wyznaczono dawki toksyczne badanych leków. W tym celu zmierzono aktywność metaboliczną komórek w jedenastym dniu eksperymentu (Ryc. 4.2. A, C, E). Na tej podstawie wyznaczono subtoksyczne dawki chemioterapeutyków do dalszych badań. Wiedząc, że jedną z cech starzejących się komórek jest zahamowanie proliferacji wykonano analizę aktywności proliferacyjnej. Stężenia leków potencjalnie indukujące starzenie zidentyfikowano jako dawki hamujące proliferację komórek (Ryc. 4.2. B, D, F).



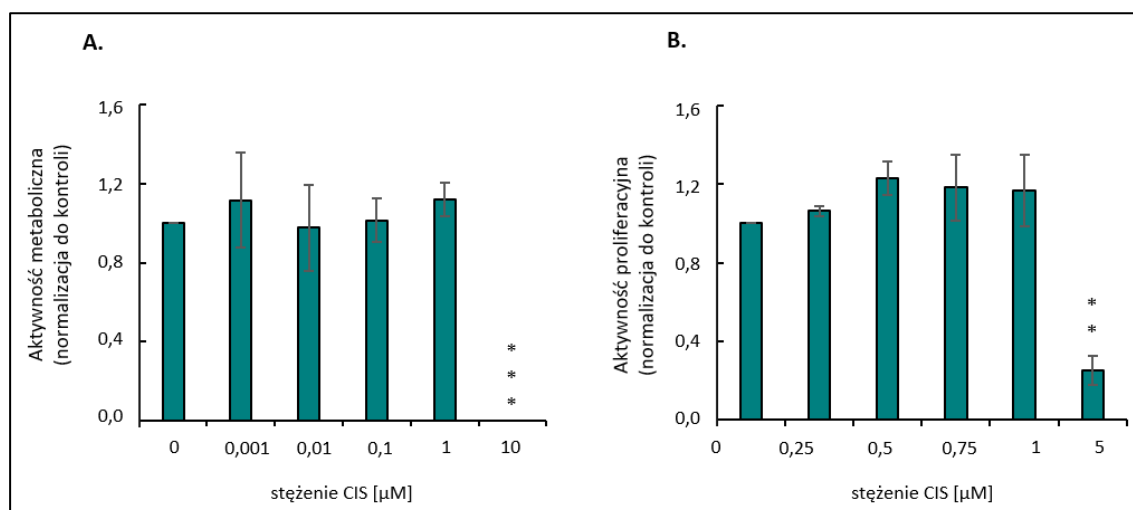
**Ryc. 4.2. Wpływ chemioterapeutyków na aktywność metaboliczną (MTT) oraz proliferacyjną komórek A549 w normoksji i hipoksji.**

Ocena wpływu CIS na aktywność metaboliczną (A) i proliferację (B). Ocena wpływu DOC na aktywność metaboliczną (C) i proliferację (D). Ocena wpływu VIN na aktywność metaboliczną (E) i proliferację (F). Za statystycznie istotne uznano  $P < 0,05$ , przy czym: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  w porównaniu z kontrolą w normoksji, # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$  w porównaniu do kontroli hipoksji, Każdy słupek reprezentuje średnią  $\pm$  SEM,  $N \geq 3$ .

Podczas traktowania komórek ludzkiego raka płuca A549 CIS zaobserwowano istotne spadki aktywności metabolicznej i proliferacyjnej wraz ze wzrostem dawki leku (Ryc. 4.2. A-B). Aktywność dehydrogenazy mitochondrialnej ulegała istotnemu obniżeniu przy niższej dawce w normoksji niż w przypadku niedotlenienia (Ryc. 4.2. A). Również wpływ CIS na spadek proliferacji komórek był mniej wyraźny w niedotlenieniu niż w normoksji (Ryc. 4.2. B).

W przeciwieństwie do obserwacji dotyczących powodującej tworzenie wiązań krzyżowych w DNA CIS, takich różnic pomiędzy warunkami tlenowymi nie zaobserwowano podczas leczenia chemioterapeutykami zaburzającymi dynamikę mikrotubul. Zarówno leczenie DOC (Ryc. 4.2. C-D) jak i VIN (Ryc. 4.2. E-F) powodowało spadki aktywności dehydrogenazy mitochondrialnej oraz proliferacji wraz ze wzrostem zastosowanych dawek, jednakże nie stwierdzono różnic pomiędzy warunkami tlenowymi obserwowanych podczas leczenia CIS. Na podstawie powyższych badań do dalszych eksperymentów wybrano dawkę 8  $\mu\text{M}$  dla CIS, 3 nM dla DOC oraz 10 nM i 50 nM dla VIN.

Analogiczne analizy przeprowadzono dla linii komórkowej mysiego raka płuca LLC1 w celu wyznaczenia dawki CIS potencjalnie indukującej starzenie w warunkach normoksji (Ryc. 4.3. A-B). Dla mysiej linii LLC1 wybrano dawkę 6  $\mu\text{M}$  CIS.



**Ryc. 4.3. Wpływ CIS na aktywność metaboliczną oraz proliferacyjną komórek LLC1 w normoksji.**

Ocena wpływu CIS na aktywność metaboliczną (A) i proliferację (B). Za statystycznie istotne uznano  $P < 0,05$ , przy czym: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  w porównaniu z kontrolą w normoksji. Każdy słupek reprezentuje średnią  $\pm$  SEM,  $N \geq 3$ .



---

Podsumowując, hodowle komórek raka płuc A549 wykazywały wyższą oporność na zaburzającą strukturę DNA cisplatynę w warunkach niedotlenienia niż w warunkach normoksyjnych, podczas gdy leczenie destabilizujące dynamikę mikrotubuli DOC i VIN nie wywoływało podobnych efektów.

## **4.2 Badanie wpływu hipoksji na starzenie komórek nowotworowych indukowane chemioterapeutykami**

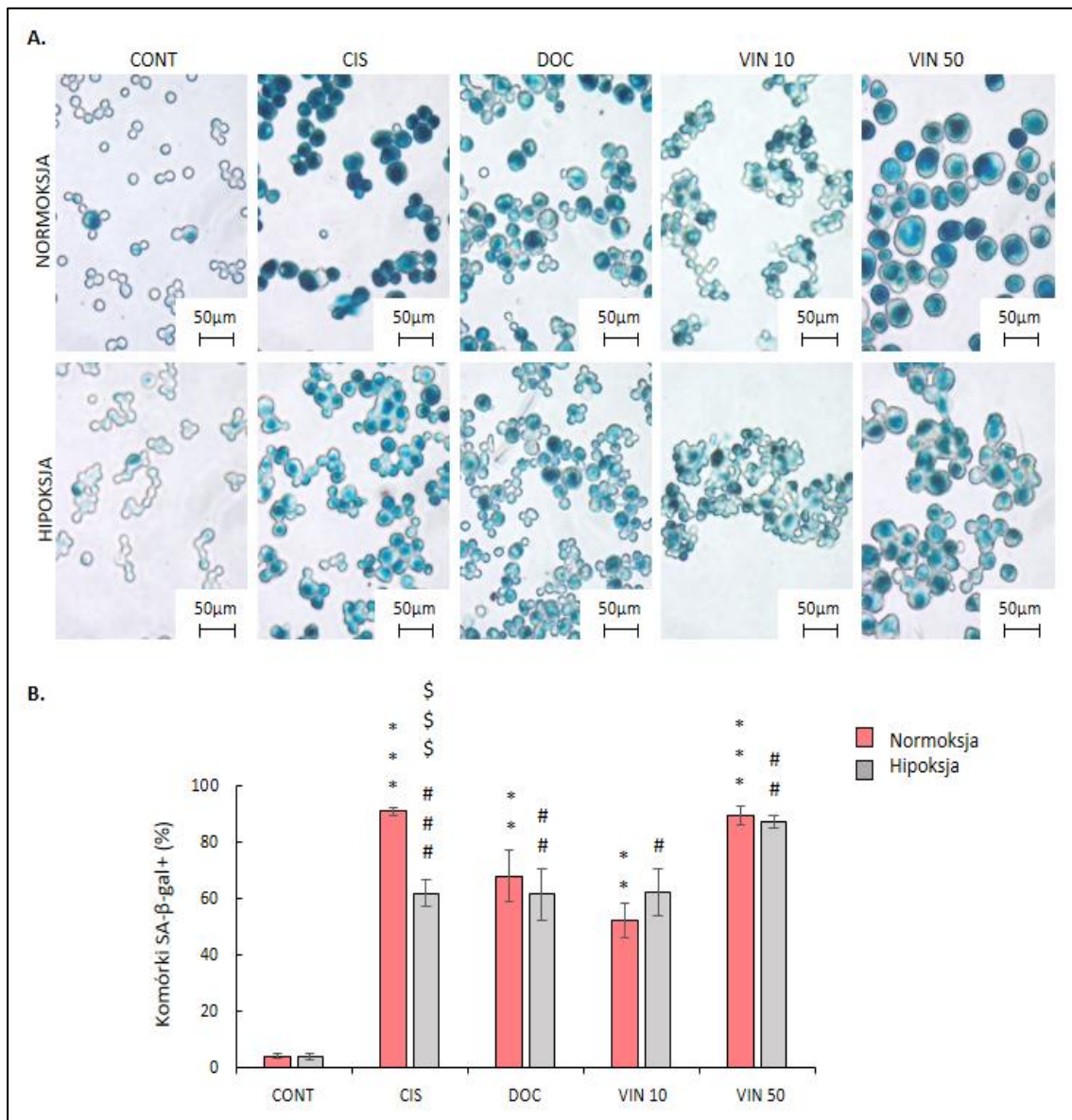
Następnie sprawdzono czy badane leki indukują starzenie komórek raka płuca. W tym celu po traktowaniu chemioterapeutykami w jedenastym dniu eksperymentu (Ryc. 4.1.) zbadano szereg markerów komórek starych. Należą do nich aktywność specyficznego dla starzenia enzymu SA- $\beta$ -gal, wzrost ziarnistości oraz hipertrofii, zahamowanie cyklu komórkowego, a także wzrost ekspresji białek związanych z indukcją molekularnych sygnałów starzeniowych. Ponadto sprawdzono, czy warunki tlenowe mają wpływ na starzenie komórek poddanych chemioterapii.

### **4.2.1 Hipoksja zmniejsza fenotyp starzeniowy komórek leczonych cisplatyną**

W celu zbadania, czy chemioterapeutyki indukują starzenie się komórek raka płuca zastosowano barwienie cytochemiczne na aktywność SA- $\beta$ -gal komórek A549 utrwalonych na szkiełku podstawowym. Aktywność enzymatyczna SA- $\beta$ -gal w komórkach starych powodowała powstanie niebieskiego produktu, zmieniając zabarwienie komórek. Efekt barwienia został zaprezentowany na zdjęciach mikroskopowych oraz przedstawiony liczbowo, jako odsetek komórek pozytywnych.

Podczas badania aktywności SA- $\beta$ -gal wykazano, że wszystkie zastosowane chemioterapeutyki były w stanie doprowadzić do indukcji starzenia komórkowego zarówno w normoksji, jak również w warunkach niedotlenienia. Jednakże w przypadku leczenia CIS zaobserwowano spadek intensywności zabarwienia komórek (Ryc. 4.4. A), a także zmniejszenie odsetka pozytywnych komórek (Ryc. 4.4. B) w hipoksji. Obserwacje te świadczą o zmniejszeniu ilości komórek starych w warunkach niedotlenienia podczas leczenia CIS. Podobnych zmian nie stwierdzono podczas leczenia DOC i VIN. Wykazano również, że stopień indukcji starzenia jest zależny od zastosowanej dawki chemioterapeutyku. Niższa dawka VIN 10 nM stanowi model, w którym tylko część komórek ulega starzeniu, natomiast użycie dawki wyższej wywołało starzenie niemal wszystkich komórek. Jest to ważna obserwacja z klinicznego punktu widzenia, ponieważ zbyt niskie dawki leku zastosowane u pacjentów mogą

tylko częściowo zahamować proliferację komórek nowotworowych na drodze starzenia komórkowego.

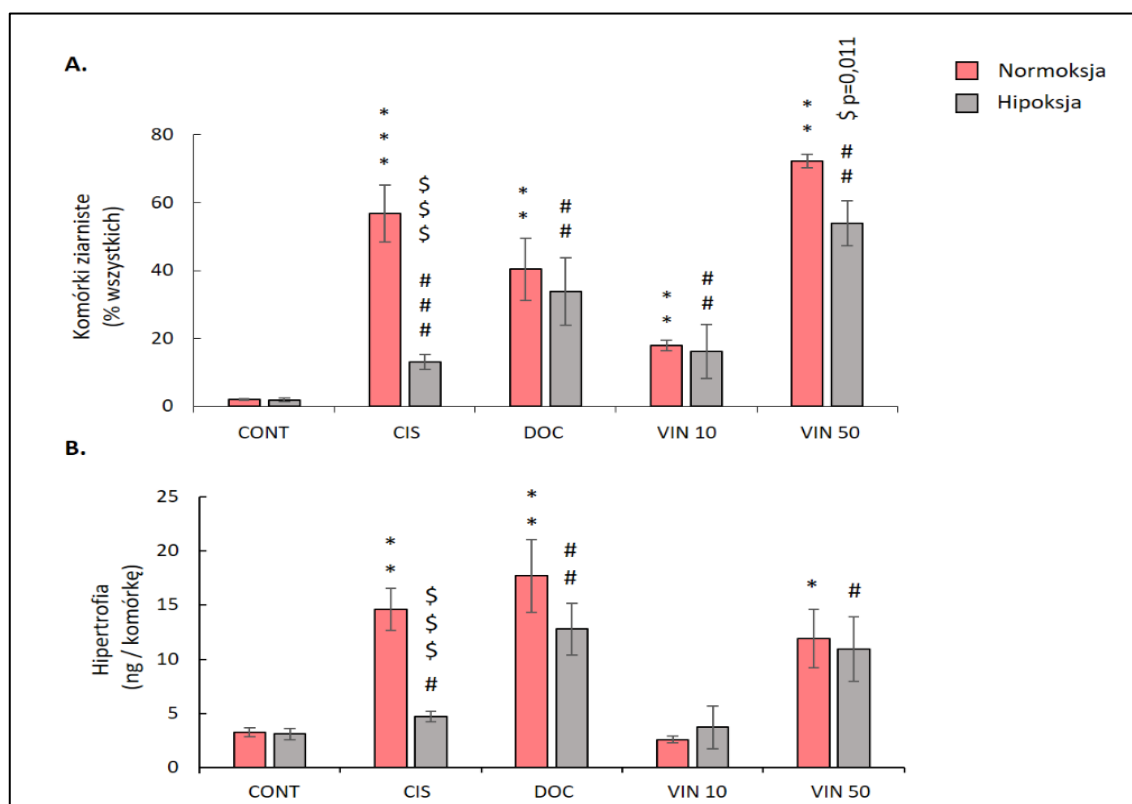


**Ryc. 4.4. Wpływ chemioterapeutyków na aktywność SA-β-gal w normoksji i hipoksji.**

Wykrywanie i oznaczanie ilościowe starzenia przeprowadzono przy użyciu barwienia SA-β-gal na komórkach raka płuca A549. Reprezentatywne zdjęcia wykonano za pomocą mikroskopii świetlnej (A). Ilościowa ocena SA-β-gal pozytywnych komórek, wyrażonych jako procent komórek pozytywnych (B). Za statystycznie istotne uznano  $P < 0,05$ , przy czym: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  porównując do kontroli w normoksji, # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$  porównując do kontroli w hipoksji, \$ $P < 0,05$ , \$\$ $P < 0,01$ , \$\$\$ $P < 0,001$  porównując niedotlenienie do normoksji. Każdy słupek reprezentuje średnią  $\pm$  SEM,  $N \geq 3$ .

Podsumowując, warunki niedotlenienia zmniejszały zawartość komórek starych jedynie po leczeniu CIS. Ponadto stężenie leku wpływało na stopień indukcji starzenia komórek raka płuca.

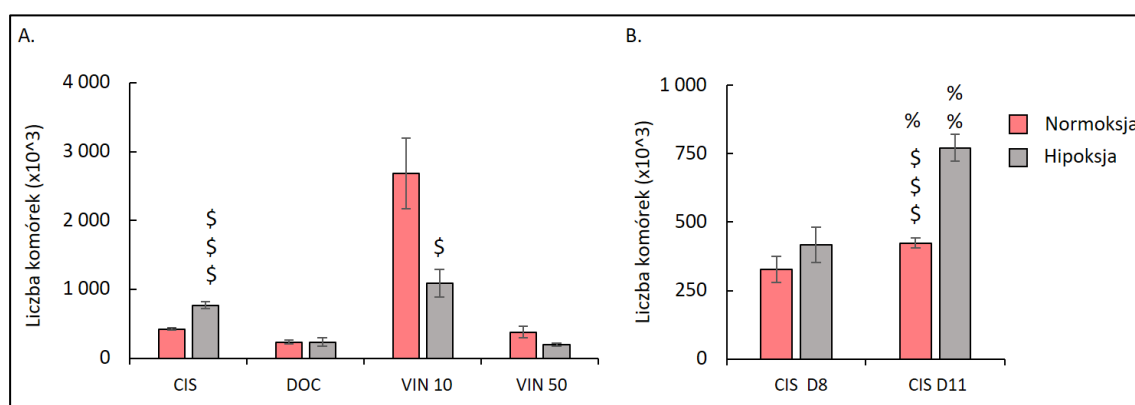
W celu pogłębienia analiz dotyczących wpływu niedotlenienia na starzenie komórkowe, zbadano również inne markery starzenia. Dalsze testy dotyczyły badania ziarnistości (Ryc. 4.5. A) oraz hipertrofii, wyrażonej jako ilość białka całkowitego przypadająca na komórkę (Ryc. 4.5. B). Również te markery wykazywały niższą ekspresję, gdy komórki były traktowane CIS w warunkach niedotlenienia w porównaniu z warunkami normoksyjnymi.



**Ryc. 4.5. Wpływ chemioterapeutyków na ziarnistość i hipertrofię komórek A549 w normoksji i hipoksji.**

Odsetek komórek ziarnistych określono za pomocą analizy FSC/SSC przy użyciu cytometrii przepływowej (A). Hipertrofię zdefiniowano jako stosunek ilości białka całkowitego zmierzonego metodą BCA do liczby komórek A549 zliczonych z użyciem komory Bürkera (B). Za statystycznie istotne uznano  $P < 0,05$ , przy czym:  $*P < 0,05$ ,  $**P < 0,01$ ,  $***P < 0,001$  porównując do kontroli w normoksji,  $\#P < 0,05$ ,  $\#\#\#P < 0,01$ ,  $\#\#\#\#P < 0,001$  porównując do kontroli w hipoksji,  $\$P < 0,05$ ,  $\$\$\$P < 0,01$ ,  $\$\$\$\$P < 0,001$  porównując niedotlenienie do normoksji. Każdy słupek reprezentuje średnią  $\pm$  SEM,  $N \geq 3$ .

W konsekwencji obserwowanego pod wpływem niedotlenienia zmniejszenia proporcji komórek starych podczas leczenia CIS doszło do wzrostu liczby komórek w tych warunkach (Ryc. 4.6. A). Wynik ten potwierdza wcześniejsze obserwacje dotyczące wzrostu poziomu aktywności proliferacyjnej w hipoksji w trakcie leczenia CIS (Ryc. 4.2. B). Podczas zastosowania leków z drugiej grupy różnicę w liczbie komórek pomiędzy warunkami tlenowymi zaobserwowano w modelu z zastosowaniem niższej dawki VIN. Jednakże w tym przypadku spadek liczby komórek w warunkach niedotlenienia nie był związany ze zmianami na poziomie markerów starzenia. W celu sprawdzenia, czy proliferacja komórek leczonych CIS różni się pomiędzy warunkami tlenowymi również na wcześniejszym etapie, zbadano liczbę komórek w dwóch punktach czasowych (Ryc. 4.6. B). W ósmym dniu eksperymentu nie wykazano różnic w liczbie komórek, które zaobserwowano w dniu jedenastym. Wynik ten sugeruje, że wzmożona proliferacja komórek w niedotlenieniu może wynikać z wyjścia komórek ze starzenia komórkowego i powrotu do aktywności proliferacyjnej.

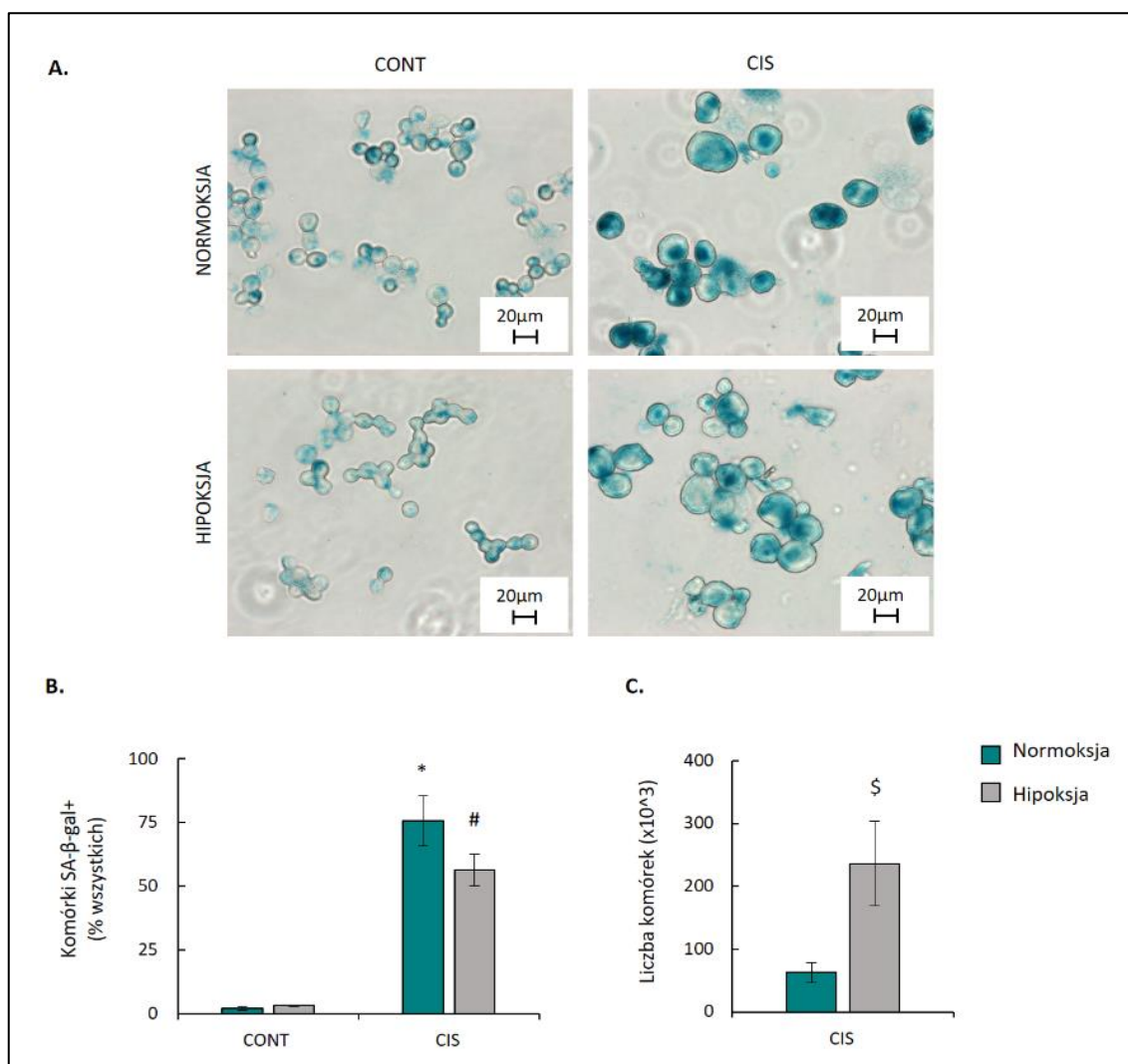


**Ryc. 4.6. Wpływ chemioterapeutyków na zmiany liczby komórek A549 w normoksji i hipoksji.**

Ocenę liczby komórek po leczeniu chemioterapeutykami (A) oraz w ósmym oraz jedenastym dniu eksperymentu z zastosowaniem CIS (B) przeprowadzono w komorze Bürkera. Za statystycznie istotne uznano  $P < 0,05$ , przy czym:  $\$P < 0,05$ ,  $$$P < 0,01$ ,  $$$$P < 0,001$  porównując niedotlenienie do normoksji,  $\%P < 0,05$ ,  $\%P < 0,01$ ,  $\%P < 0,001$  porównując ósmy dzień eksperymentu do dnia jedenastego. Każdy słupek reprezentuje średnią  $\pm$  SEM,  $N \geq 3$ .

W sumie, niedotlenienie zmniejszało markery starzenia i zwiększało proliferację ludzkich komórek raka płuca leczonych CIS, co było związane z ucieczką przed starzeniem komórkowym.

Celem sprawdzenia, czy obserwowana ucieczka od starzenia w warunkach niedotlenienia podczas leczenia CIS jest zjawiskiem uniwersalnym, kluczowe testy powtórzono na drugiej linii komórkowej. Również w przypadku mysich komórek raka płuca LLC1 zaobserwowano zbliżony wzór zmian (Ryc. 4.7.).



**Ryc. 4.7. Wpływ CIS na starzenie komórek LLC1 w normoksji i hipoksji.**

Wykrywanie i oznaczanie ilościowe starzenia przeprowadzono przy użyciu barwienia SA-β-gal na mysich komórkach raka płuca LLC1. Reprezentatywne zdjęcia wykonano za pomocą mikroskopii świetlnej przy powiększeniu 400x- podziałka 20 μm (A). Ilościowa ocena SA-β-gal pozytywnych komórek, wyrażonych jako procent komórek pozytywnych (B). Ocena liczby komórek po leczeniu chemioterapeutykami została przeprowadzona w komorze Bürkera (C). Za statystycznie istotne uznano  $P < 0,05$ , przy czym: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  porównując do kontroli w normoksji, # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$  porównując do kontroli w hipoksji, \$ $P < 0,05$ , \$\$ $P < 0,01$ , \$\$\$ $P < 0,001$  porównując niedotlenienie do normoksji. Każdy słupek reprezentuje średnią  $\pm$  SEM,  $N \geq 3$ .

---

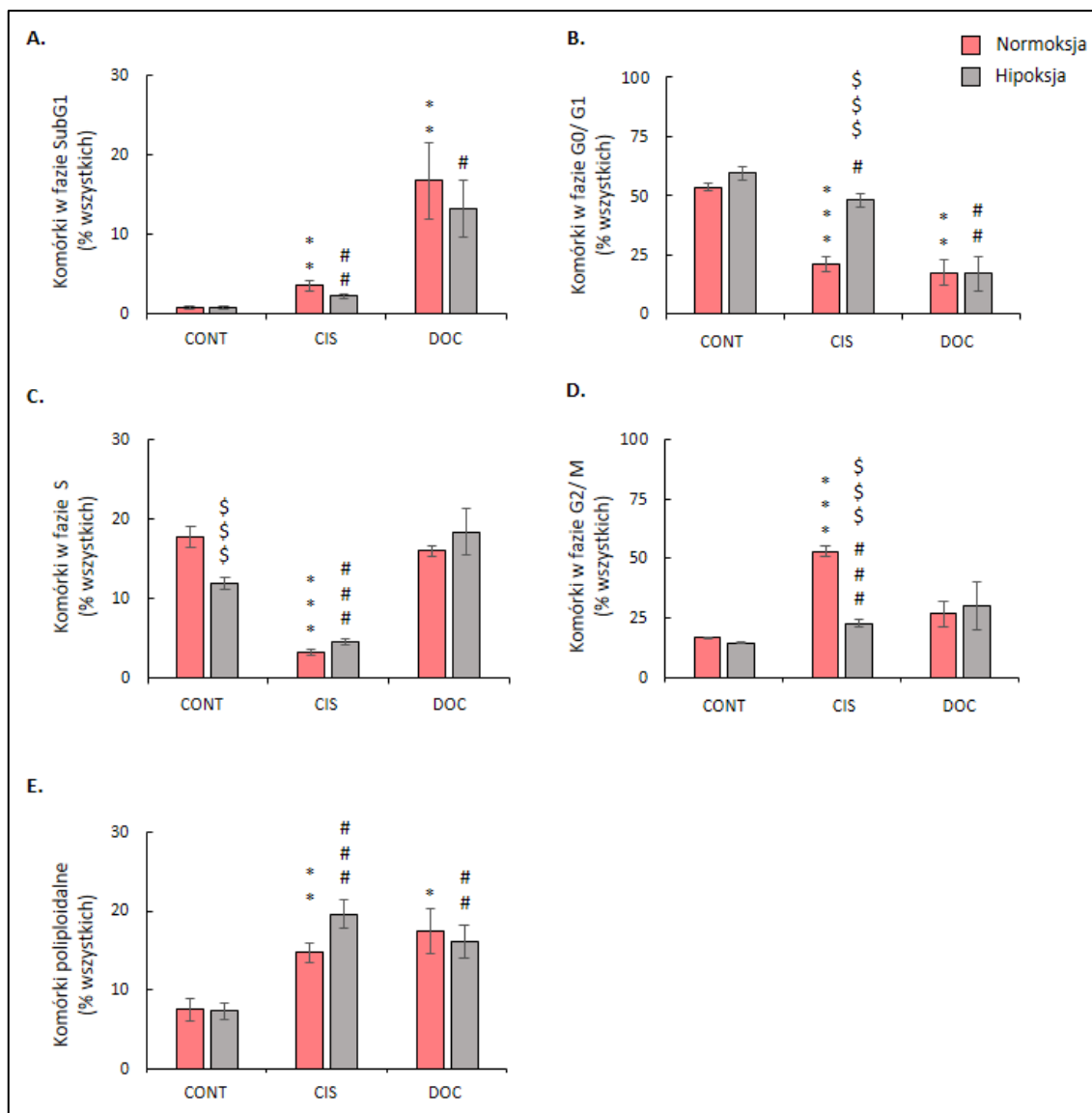
W tym przypadku spadek odsetka komórek pozytywnych pod względem SA- $\beta$ -gal po leczeniu CIS w niedotlenieniu nie był istotny statystycznie (Ryc. 4.7. B), jednakże w tych warunkach zaobserwowano zmniejszenie intensywności zabarwienia związanego z aktywnością tego enzymu (Ryc. 4.7. A). Co więcej, stwierdzono istotny wzrost liczby komórek w hipoksji (Ryc. 4.7. C), wskazując na ich zwiększoną proliferację.

Reasumując, komórki ludzkiego i mysiego raka płuca w niedotlenieniu uciekały przed starzeniem się wywołanym CIS.

#### **4.2.2 Hipoksja zmienia rozkład w cyklu komórkowym po leczeniu cisplatyną**

Badania na komórkach raka okrężnicy i glejaka dowiodły, że ucieczce przed starzeniem towarzyszą zmiany w rozkładzie cyklu komórkowego [105]. Dlatego też zbadano dystrybucję komórek w cyklu komórkowym po zastosowaniu chemioterapeutyków. Ponieważ poziom tlenu nie zmieniał stopnia indukcji starzenia w przypadku obu testowanych leków działających na dynamikę mikrotubul, lekiem z tej grupy wybranym do dalszych testów był DOC. Jak w poprzednich eksperymentach zastosowano schemat eksperymentalny (ryc. 4.1.) trwający jedenaście dni, po których wykonano analizę cytometryczną komórek barwionych PI (ryc. 4.8.).

Po leczeniu CIS w normoksji zaobserwowano spadek akumulacji komórek raka płuc w fazie G0/G1 (Ryc. 4.8. B) oraz ich akumulację w fazie G2/M (Ryc. 4.8. D) przy jednoczesnym zmniejszeniu udziału w fazie S (Ryc. 4.8. C) oraz zwiększonej poliploidyzacji (Ryc. 4.8. E). W przeciwieństwie do tego, w warunkach niedotlenienia doszło do wyjścia komórek z fazy G2/M (Ryc. 4.8. D) oraz ich przejścia do fazy G0/G1 (Ryc. 4.8. B), co wskazuje na progresję cyklu komórkowego w tych warunkach. Jest to zgodne z obserwacjami dotyczącymi ucieczki komórek przed starzeniem (Ryc. 4.4.) oraz wzrostu ich proliferacji (Ryc. 4.2. B, Ryc. 4.6.) podczas niedotlenienia. Jednakże hipoksja nie wpłynęła na zawartość komórek w fazie S (Ryc. 4.8. C) ani na poliploidyzację (Ryc. 4.8. E). Tak jak w przypadku CIS, terapia DOC w warunkach normoksji zmniejszała udział komórek w fazie G0/G1 (Ryc. 4.8. B) oraz zwiększała poliploidię (Ryc. 4.8. E). Dodatkowo DOC powodował znaczny wzrost udziału komórek w fazie sub-G1 (Ryc. 4.8. A), wskazując na indukcję śmierci komórek. Tak jak w przypadku badań dotyczących indukcji starzenia, również podczas analizy cyklu komórkowego nie zaobserwowano wpływu niedotlenienia na komórki leczone DOC (Ryc. 4.8.).



**Ryc. 4.8. Wpływ chemioterapeutyków oraz warunków tlenowych na dystrybucję ludzkich komórek raka płuca A549 w cyklu komórkowym.**

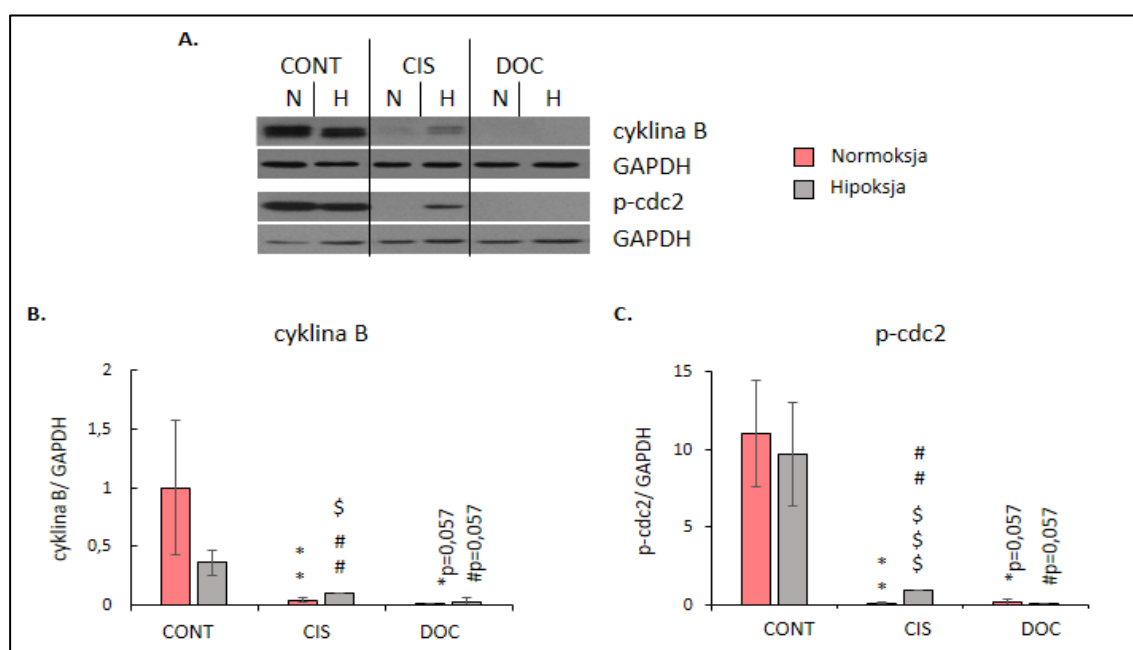
Za pomocą barwienia PI i cytometrii przepływowej zbadano rozkład cyklu komórkowego po traktowaniu CIS lub DOC wyróżniając fazę subG1 (A), G0/G1 (B), S (C), G2/M (D) i poliploidię (E). Za statystycznie istotne uznano  $P < 0,05$ , przy czym: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  porównując do kontroli w normoksji, # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$  porównując do kontroli w hipoksji, \$ $P < 0,05$ , \$\$ $P < 0,01$ , \$\$\$ $P < 0,001$  porównując niedotlenienie do normoksji. Każdy słupek reprezentuje średnią  $\pm$  SEM,  $N \geq 3$ .

Podsumowując, niedotlenienie modyfikowało dystrybucję w cyklu komórkowym podczas leczenia CIS. Uciekające od starzenia komórki raka płuca leczone CIS w hipoksji charakteryzowały się wyjściem z fazy G2/M oraz przejściem do fazy G0/G1 cyklu komórkowego. Natomiast komórki leczone DOC niewykazujące różnic w stopniu

starzenia pod wpływem niedotlenienia nie różniły się również pod względem dystrybucji w cyklu komórkowym.

#### 4.2.3 Hipoksja powoduje wzrost ekspresji białek promujących cykl komórkowy po leczeniu cisplatyną

W świetle otrzymanych wyników dotyczących wyjścia z fazy G2/M komórek leczonych CIS pod wpływem niedotlenienia zbadano białka związane z punktem kontrolnym G2/M cyklu komórkowego. Do regulatorów tego punktu należy kinaza CDK1 (ang. Cyclin-Dependent Kinase 1), zwana również cdc2, która tworząc kompleks z cykliną B warunkuje przejście z fazy G2 do M [188]. W celu zbadania ekspresji cykliny B oraz fosforylowanej formy białka cdc2 zastosowano technikę hybrydizacji typu western (Ryc. 4.9.).



**Ryc. 4.9. Wpływ chemioterapii na ekspresję białek proliferacyjnych ludzkich komórek raka płuca A549 w normoksji i hipoksji.**

Reprezentatywne analizy western blot pokazujące ekspresję cykliny B i p-cdc2 po traktowaniu CIS lub DOC (A). GAPDH zastosowano jako białko referencyjne. Kwantyfikację wyników przeprowadzono przy użyciu analizy densytometrycznej, które przedstawiono jako stosunek odpowiedniego białka do GAPDH dla cykliny B (B) oraz p-cdc2 (C). Za statystycznie istotne uznano  $P < 0,05$ , przy czym: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  porównując do kontroli w normoksji, # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$  porównując do kontroli w hipoksji, \$ $P < 0,05$ , \$\$ $P < 0,01$ , \$\$\$ $P < 0,001$  porównując niedotlenienie do normoksji. Każdy słupek reprezentuje średnią  $\pm$  SEM,  $N \geq 3$ .



---

Badanie ujawniło, że w wyniku chemioterapii doszło do spadku ekspresji obu badanych białek, jednakże niedotlenienie częściowo ją przywróciło w komórkach leczonych CIS. Otrzymane wyniki potwierdziły, że hipoksja doprowadziła do częściowej reaktywacji cyklu komórkowego tylko w przypadku leczenia CIS, natomiast nie wykazała efektu podczas terapii DOC.

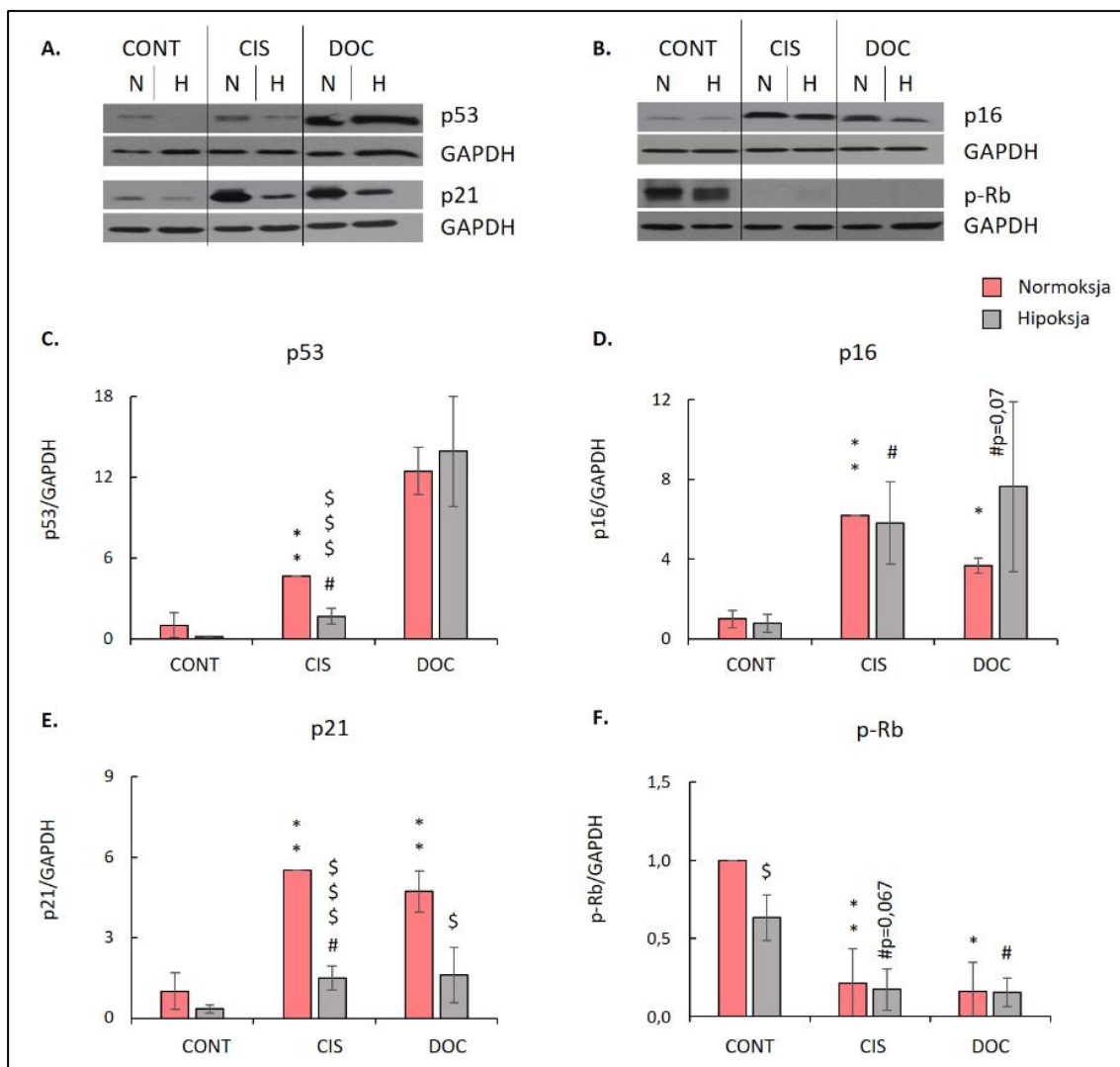
#### **4.2.4 Ucieczce od starzenia komórek leczonych cisplatyną w hipoksji towarzyszy zmniejszenie sygnalizacji p53/p21**

W celu zbadania mechanizmu molekularnego związanego z obserwowaną w hipoksji ucieczką przed starzeniem komórek leczonych CIS zbadano ekspresję markerów molekularnych sygnalizacji prowadzącej do starzenia. Ponieważ indukcja starzenia zależy od aktywacji ścieżek sygnałowych p53/p21 i p16/Rb zbadano białka należące do tych szlaków [189].

Wykazano, że ludzkie komórki raka płuc A549 traktowane CIS i DOC charakteryzowały się znacznym wzrostem ekspresji białek p53, p21 i p16, podczas gdy ekspresja p-Rb uległa zmniejszeniu (Ryc. 4.10.). W warunkach niedotlenienia komórki leczone CIS wykazywały obniżone poziomy p53 i p21, co sugeruje, że to ten szlak był głównie zaangażowany w ucieczkę przed starzeniem się wywołanym przez CIS (Ryc. 4.10. A, C, E).

Ekspresja p16 i p-Rb nie różniła się istotnie między różnymi warunkami tlenowymi (Ryc. 4.10. B, D, F). Komórki traktowane DOC w warunkach hipoksji również wykazały znaczne zmniejszenie ekspresji p21.

Otrzymane wyniki sugerują, że ucieczka przed starzeniem w komórkach raka płuca leczonych CIS podczas niedotlenienia jest zależna od szlaku sygnałowego p53/p21.

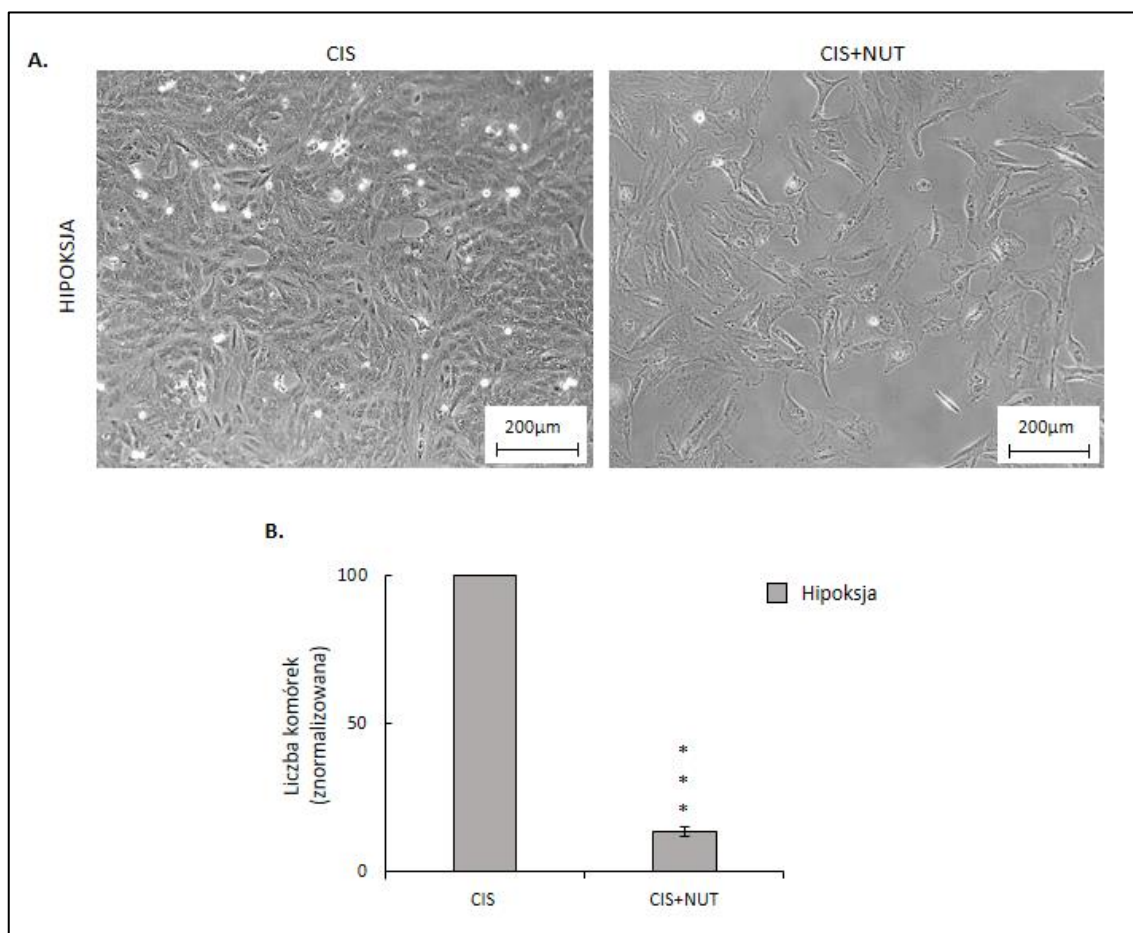


**Ryc. 4.10. Wpływ chemioterapii na ekspresję białek starzeniowych ludzkich komórek raka płuca A549 w normoksji i hipoksji.**

Reprezentatywne analizy western blot pokazujące ekspresję p53 i p21 (A) oraz p16 i p-RB (B) po traktowaniu CIS lub DOC. GAPDH zastosowano jako białko odniesienia. Kwantyfikację wyników przeprowadzono przy użyciu analizy densytometrycznej, które przedstawiono jako stosunek odpowiedniego białka do GAPDH dla p53 (C), p21 (D), p16 (E) i p-RB (F). Za statystycznie istotne uznano  $P < 0,05$ , przy czym: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  porównując do kontroli w normoksji, # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$  porównując do kontroli w hipoksji, \$ $P < 0,05$ , \$\$ $P < 0,01$ , \$\$\$ $P < 0,001$  porównując niedotlenienie do normoksji. Każdy słupek reprezentuje średnią  $\pm$  SEM,  $N \geq 3$ .

W celu potwierdzenia powyższego wniosku zastosowano dodatkowe leczenie niedotlenionych starzejących się komórek nutliną-3 (NUT). NUT dzięki obecności trzech grup hydrofobowych konkuruje z p53 o wiązanie się z białkiem MDM2, powodując oddysocjowanie cząsteczki p53 oraz jej akumulację [190, 191].

NUT zaaplikowano wraz z CIS w trzecim dniu eksperymentu (zgodnie z przedstawionym wcześniej schematem na Ryc. 4.1.). Wstępne analizy wykazały, że komórki traktowane NUT charakteryzowały się zmniejszoną liczbą komórek (Ryc. 4.11. B) oraz zmianami morfologicznymi w postaci powiększenia rozmiarów jąder komórkowych oraz całych komórek (Ryc. 4.11. A).

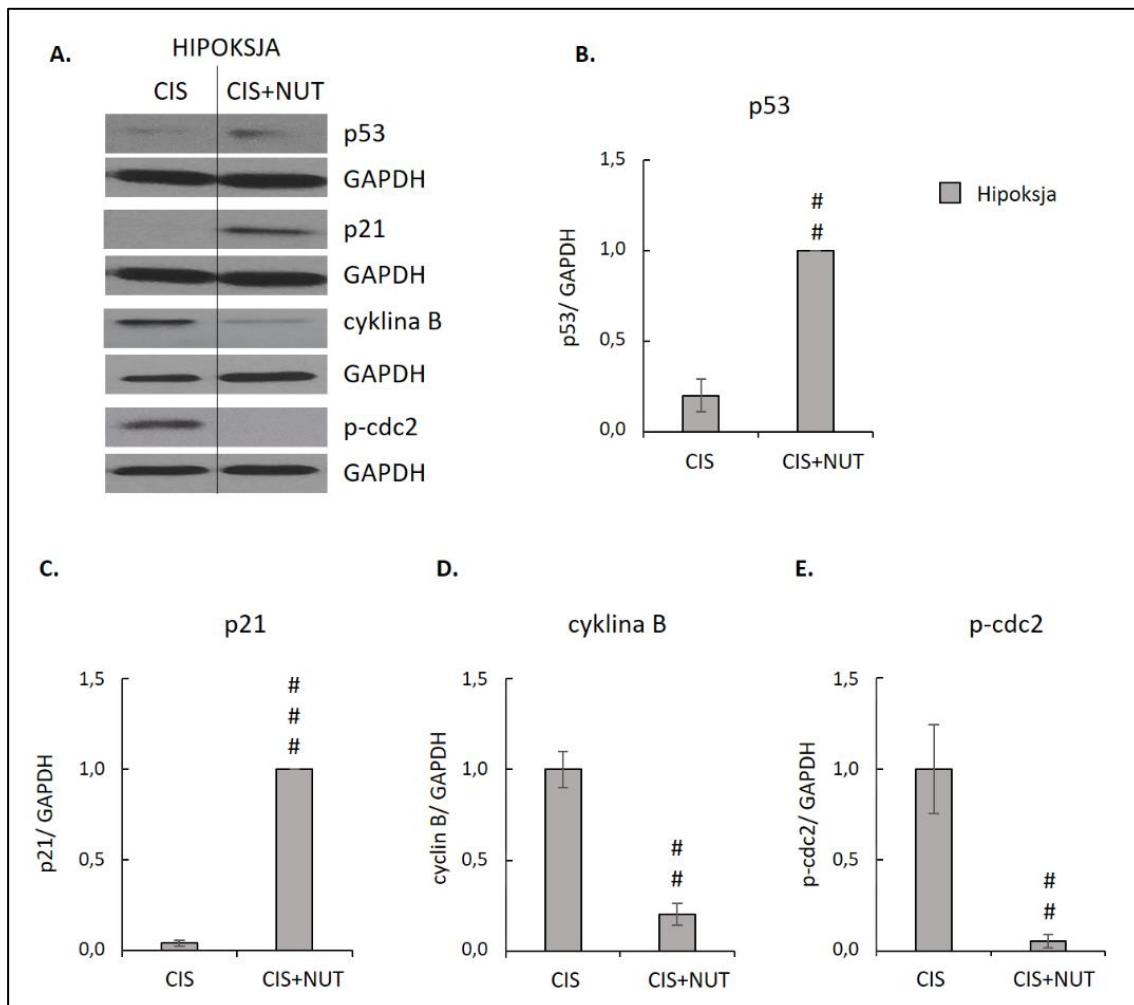


**Ryc. 4.11. Wpływ NUT na morfologię oraz liczbę komórek A549 traktowanych CIS w niedotlenieniu.**

Reprezentatywne obrazy morfologii komórek po potraktowaniu NUT i CIS w hipoksji uzyskano za pomocą mikroskopii świetlnej (A). Ocenę liczby komórek przeprowadzono w komorze Bürkera (B). Za statystycznie istotne uznano  $P < 0,05$ , przy czym: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ . Każdy słupek reprezentuje średnią  $\pm$  SEM,  $N \geq 3$ .

Reprezentatywne analizy western blot dowiodły, że komórki traktowane NUT wykazywały się wyższą ekspresją p53 (Ryc. 4.12. A, B) oraz jego białka efektorowego p21 (Ryc. 4.12. A, C). Wynik ten potwierdza, że rzeczywiście NUT wywołało

akumulację białka p53. Było to skorelowane ze zmniejszoną ekspresją markerów proliferacji: cykliny B (Ryc. 4.12. A, D) i p-cdc2 (Ryc. 4.12. A, E).



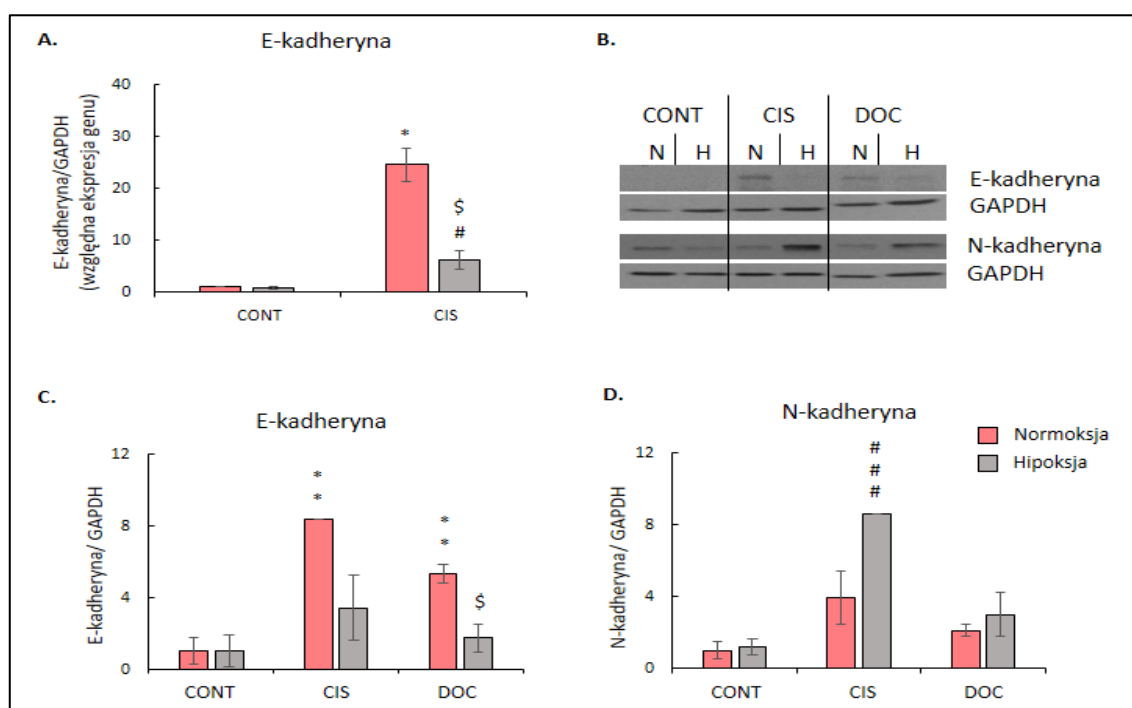
**Ryc. 4.12. Wpływ NUT na ekspresję białek starzeniowych i proliferacyjnych komórek A549 traktowanych CIS w niedotlenieniu.**

Reprezentatywne analizy western blot pokazujące ekspresję p53, p21, cykliny B oraz p-cdc2 (A). GAPDH zastosowano jako białko odniesienia. Kwantyfikację wyników przeprowadzono przy użyciu analizy densytometrycznej, które przedstawiono jako stosunek odpowiedniego białka do GAPDH dla p53 (B), p21 (C), cykliny B (D) i p-cdc2 (E). Za statystycznie istotne uznano  $P < 0,05$ , przy czym: # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$ . Każdy słupek reprezentuje średnią  $\pm$  SEM,  $N \geq 3$ .

Otrzymane wyniki potwierdzają zależność ucieczki od starzenia niedotlenionych komórek leczonych CIS od szlaku starzeniowego p53/p21. Ponadto wskazują, że zaobserwowane zjawisko wychodzenia ze starzenia w tych warunkach może zostać odwrócone poprzez aktywację białka p53.

#### 4.2.5 Hipoksja promuje fenotyp mezenchymalny komórek starych niezależnie od użytego leku

Badania nad rakiem okrężnicy ujawniły, że komórki podczas ucieczki ze starzenia wykazywały przejście z fenotypu nabłonkowego do mezenchymalnego [108]. Ponieważ jest to cecha istotna w kontekście zdolności komórek do tworzenia przerzutów sprawdzono, czy uciekające od starzenia komórki raka płuca wykazują się indukcją fenotypu mezenchymalnego. W tym celu zbadano ekspresję genu E-kadheryny wdziewiątym dniu eksperymentu oraz białek związanych z EMT w dniu jedenastym (Ryc. 4.13, zgodnie ze schematem na Ryc. 4.1.).



**Ryc. 4.13. Wpływ chemioterapeutyków na tranżycję epitelialno-mezenchymalną komórek A549 w normoksji i hipoksji.**

Ekspresję genu E-kadheryny mierzono za pomocą qRT-PCR. GAPDH zastosowano jako gen referencyjny (A). Reprezentatywne analizy western blot pokazujące ekspresję E-kadheryny i N-kadheryny (B). GAPDH zastosowano jako białko odniesienia. Kwantyfikację wyników przeprowadzono przy użyciu analizy densytometrycznej, które przedstawiono jako stosunek odpowiedniego białka do GAPDH dla E-kadheryny (C) i N-kadheryny (D). Za statystycznie istotne uznano  $P < 0,05$ , przy czym: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  porównując do kontroli w normoksji, # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$  porównując do kontroli w hipoksji, \$ $P < 0,05$ , \$\$ $P < 0,01$ , \$\$\$ $P < 0,001$  porównując niedotlenienie do normoksji. Każdy słupek reprezentuje średnią  $\pm$  SEM,  $N \geq 3$ .

---

Terapia CIS w warunkach normoksyjnych znacząco nasilała w komórkach raka płuc ekspresję E-kadheryny, będącej markerem fenotypu epitelialnego. Efekt ten zaobserwowano zarówno na poziomie mRNA (Ryc. 4.13. A), jak i na poziomie białka (Ryc. 4.13. B, C). Podczas niedotlenienia poziom E-kadheryny ulegał obniżeniu, wskazując na indukcję mezenchymalnego fenotypu w tych warunkach. Zgodnie z tymi obserwacjami, ekspresja markera mezenchymalnego, N-kadheryny, wykazywała tendencję do podwyższenia w komórkach A549 traktowanych CIS w warunkach niedotlenienia w porównaniu z normoksją (Ryc. 4.13. B, D).

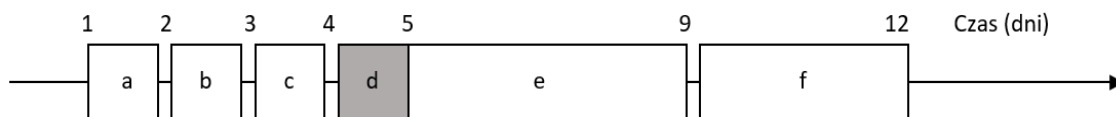
Traktowanie DOC również powodowało zwiększoną ekspresję E-kadheryny komórek w normoksji w porównaniu z komórkami nieleczonymi (Ryc. 4.13. B, C). Również w tym przypadku niedotlenienie powodowało jej obniżenie. Wynik ten sugeruje, że utrata fenotypu epitelialnego bardziej niż z ucieczką od starzenia jest związana ze środowiskiem hipoksyjnym.

#### **4.3 Badanie wpływu hamowania aktywności LDH na ucieczkę od starzenia komórek leczonych cisplatyną w hipoksji**

Ponieważ enzymy LDH mają istotne znaczenie dla metabolizmu komórek nowotworowych, zwłaszcza przy ograniczonej podaży tlenu [181, 186] sprawdzono, czy zmniejszenie ich aktywności jest w stanie zahamować obserwowaną w niedotlenieniu ucieczkę od starzenia komórek leczonych CIS. Aby zweryfikować słuszność tego podejścia zastosowano farmakologiczne lub genetyczne zahamowanie funkcji LDH. Pierwsze z nich polegało na zastosowaniu specyficznego inhibitora SO, natomiast drugie dotyczyło użycia małych interferujących sekwencji RNA (siRNA) w celu wyciszenia genów LDHA i/lub LDHB.

##### **4.3.1 Wyciszenie genów LDHA i LDHB nie zmienia aktywności metabolicznej i proliferacyjnej**

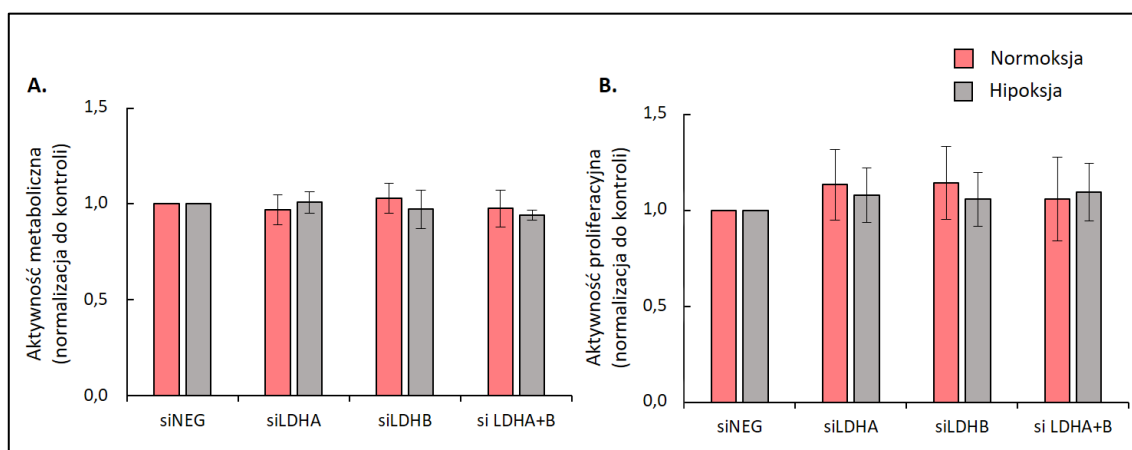
Aby przeprowadzić eksperymenty z wyciszeniem genów LDH zmodyfikowano podstawowy schemat eksperymentalny. Dobę przed traktowaniem CIS wprowadzono dodatkowy dzień, w którym przeprowadzono wyciszenie genów. Komórki zostały wówczas transfekowane siRNA. W przypadku tych eksperymentów wszystkie analizy wykonano w dwunastym dniu od rozpoczęcia hodowli. Zmodyfikowany schemat eksperymentalny przedstawiono na Ryc. 4.14.



**Ryc. 4.14. Schemat eksperymentów z wyciszaniem genów.**

Komórki hodowano w warunkach normoksji (~19% O<sub>2</sub>) przez 24 godziny (a). Następnie część hodowli przeniesiono do komory hipoksyjnej (19% O<sub>2</sub>) i zmieniono medium hodowlane (b). Po 24 przeprowadzono procedurę wyciszania odpowiednich genów (c). Po kolejnej dobie komórki w warunkach normoksji lub hipoksji traktowano CIS przez 24 godziny (d), a następnie hodowano je w pożywce bez leku przez 4 dni (e). Po tym czasie ponownie zmieniono pożywkę i komórki inkubowano przez kolejne 3 dni (f).

Otrzymane wyniki nie wykazały istotnego wpływu wyciszania genów LDHA lub LDHB na aktywność metaboliczną komórek raka płuca leczonych CIS w obu warunkach tlenowych (Ryc. 4.15. A). Jedynie wyciszenie obu genów równocześnie powodowało tendencję do niewielkiego obniżenia aktywności metabolicznej w niedotlenieniu. Tak samo, w przypadku badań nad wpływem zastosowanych modyfikacji na aktywność proliferacyjną nie zaobserwowano istotnego efektu (Ryc. 4.15. B).



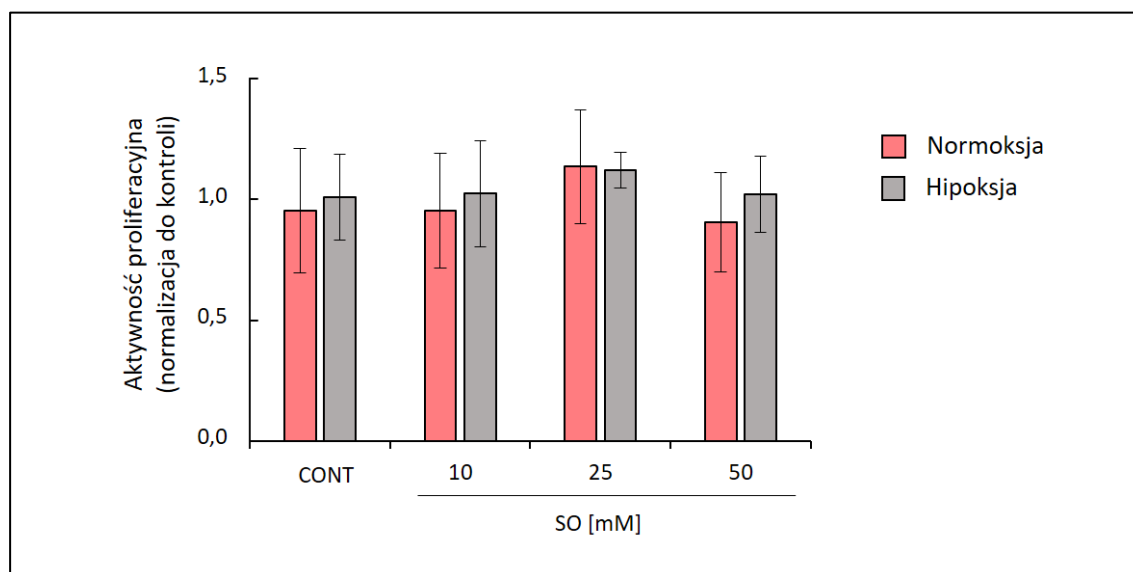
**Ryc. 4.15. Wpływ wyciszania genów dehydrogenaz mleczanowych (LDH) na aktywność metaboliczną i proliferacyjną komórek A549 leczonych CIS w normoksji i hipoksji.**

Aktywność metaboliczna (A) i proliferacyjna (B) komórek leczonych CIS po wyciszeniu genów LDHA i/lub LDHB. Ocena liczby komórek po leczeniu chemioterapeutykami z zastosowaniem komory Bürkera (C). Każdy słupek reprezentuje średnią ± SEM, N ≥ 3.

### 4.3.2 Inhibicja LDH poprzez użycie oksamatu sodu nie wpływa na aktywność proliferacyjną

Zbadano również znaczenie farmakologicznego zahamowania aktywności LDH w komórkach raka płuca leczonych CIS. W tym celu zastosowano SO będący analogiem pirogronianu, który hamuje konwersję pirogronianu do mleczanu katalizowaną przez LDHA [192]. W eksperymentach z użyciem SO zmodyfikowano podstawowy schemat eksperymentalny (Ryc. 4.1.) w którym po czterech dniach od zakończenia leczenia CIS (Ryc. 4.1. d) na 24h podano działaniu SO. Następnie przez ostatnie dwie doby komórki hodowano w pożywce bez inhibitora (Ryc. 4.1. e). W jedenastym dniu eksperymentu aktywność proliferacyjna komórek leczonych wzrastającymi stężeniami SO nie różniła się od aktywności komórek kontrolnych zarówno w normoksji jak i w hipoksji (Ryc. 4.16.).

Podsumowując, wykonane analizy sugerują, że ani hamowanie aktywności LDH poprzez modyfikacje genetyczne ani farmakologiczne nie mają wpływu na zmiany aktywności metabolicznej i proliferacyjnej komórek raka płuca leczonych CIS.



**Ryc. 4.16. Wpływ inhibitora dehydrogenazy mleczanowej (SO) na proliferację komórek A549 leczonych CIS w normoksji i hipoksji.**

Zmiany aktywności proliferacyjnej komórek leczonych CIS pod wpływem SO. Każdy słupek reprezentuje średnią  $\pm$  SEM,  $N \geq 3$ .



---

#### 4.4 Ocena inhibicji autofagii w zahamowaniu ucieczki od starzenia komórek leczonych cisplatyną w hipoksji

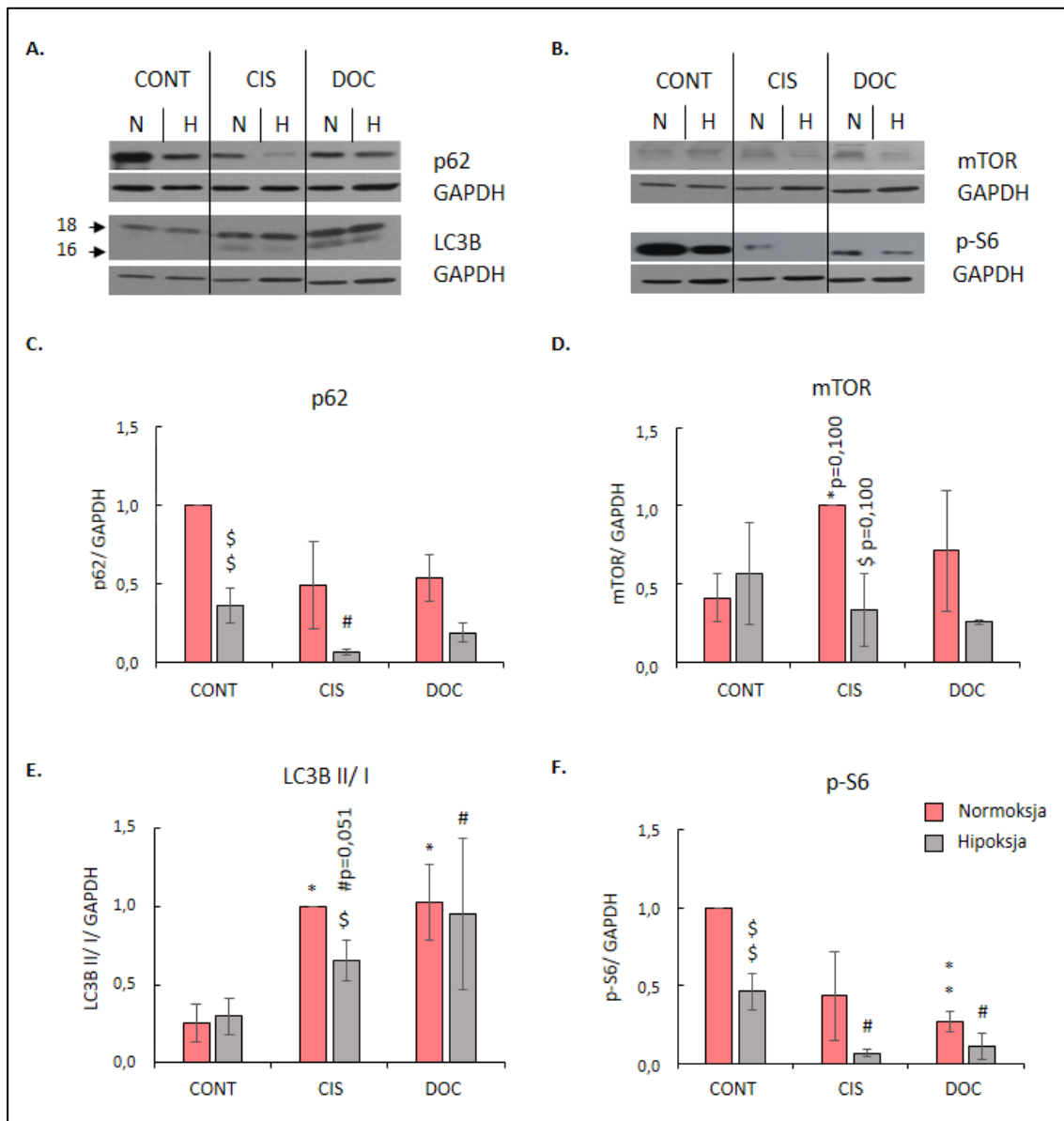
Eksperymenty *in vitro* i *in vivo* przeprowadzone na komórkach raka okrężnicy i glejaka dowiodły, że zahamowanie autofagii wpływa na ucieczkę przed starzeniem komórkowym [16]. Dlatego zbadano, czy w przypadku ucieczki od starzenia komórek raka płuca leczonych CIS w niedotlenieniu można zaobserwować zmiany w procesie autofagii.

W tym celu zbadano ekspresję białek związanych z tym procesem. Jednym z nich było białko p62/SQSTM1 (p62) biorące udział w załadunku autofagosomu. Innym badanym tu białkiem było LC3 (LC3B), które w przebiegu autofagii ulega degradacji w autofagosomach [105].

Ekspresja p62 komórek kontrolnych ulegała obniżeniu w hipoksji (Ryc. 4.17. A, C), co wskazuje na aktywację autofagii w tych warunkach. Traktowanie CIS powodowało nasilenie tego efektu. Badanie ekspresji drugiego białka autofagicznego opiera się na analizie stosunku izoformy lipidowej (II) do cytozolowej (I). Podczas autofagii izoforma cytozolowa przekształcana jest do formy lipidowej, natomiast zakończeniu procesu towarzyszy degradacja LC3B II po wewnętrznej stronie błony autolizosomu, przy czym LC3B II zawarte po zewnętrznej stronie ulega konwersji do formy I [142, 147]. Z tego powodu wzrost ekspresji LC3B II/I może świadczyć zarówno o aktywacji procesu autofagii, jak również o zahamowaniu degradacji tego białka w autofagosomie. Ekspresja LC3B II/I była zwiększona w obu warunkach tlenowych. po leczeniu badanymi chemioterapeutykami. Komórki traktowane CIS wykazywały zmniejszony stosunek LC3B II/I (Ryc. 4.17. A, E) w hipoksji w porównaniu z normoksją, co wraz z obniżeniem ekspresji p62 wskazuje na aktywację procesu autofagii oraz skuteczną ich degradację pod wpływem niedotlenienia podczas leczenia CIS.

Ponieważ zarówno starzenie komórkowe jak i proces autofagii są związane z sygnalizacją mTOR [193-195] zbadano również ekspresję białek należących do tego szlaku: białka mTOR p-S6. Ekspresja mTOR w komórkach traktowanych CIS wykazywała tendencję do spadku w warunkach hipoksji w porównaniu z normoksją (Ryc. 4.17. B, D). Zaobserwowano podobny wzór ekspresji białka p-S6 (Ryc. 4.17. B, F) do ekspresji p62, a więc obniżenie podczas leczenia CIS pod wpływem niedotlenienia. Ponieważ sygnalizacja mTOR jest w stanie hamować proces autofagii otrzymane wyniki wzmacniają wniosek, że niedotlenienie powoduje aktywację

autofagii podczas leczenia CIS. Dodatkowo ekspresja p-S6 była obniżona w komórkach traktowanych DOC zarówno w normoksji, jak i hipoksji.



**Ryc. 4.17. Wpływ chemioterapeutyków na ekspresję białek autofagicznych oraz białek szlaku kinazy mTOR komórek A549 w normoksji i hipoksji.**

Reprezentatywne analizy western blot pokazujące ekspresję p62 i LC3B (A) oraz mTOR i p-S6 (B). GAPDH zastosowano jako białko odniesienia. Analizę liczbową wyników przeprowadzono przy użyciu analizy densytometrycznej, które przedstawiono jako stosunek odpowiedniego białka do GAPDH dla p62 (C), LC3B II/I (E), mTOR (D) p-S6 (F). Za statystycznie istotne uznano  $P < 0,05$ , przy czym: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  porównując do kontroli w normoksji, # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$  porównując do kontroli w hipoksji, \$ $P < 0,05$ , \$\$ $P < 0,01$ , \$\$\$ $P < 0,001$  porównując niedotlenienie do normoksji. Każdy słupek reprezentuje średnią  $\pm$  SEM,  $N \geq 3$ .

---

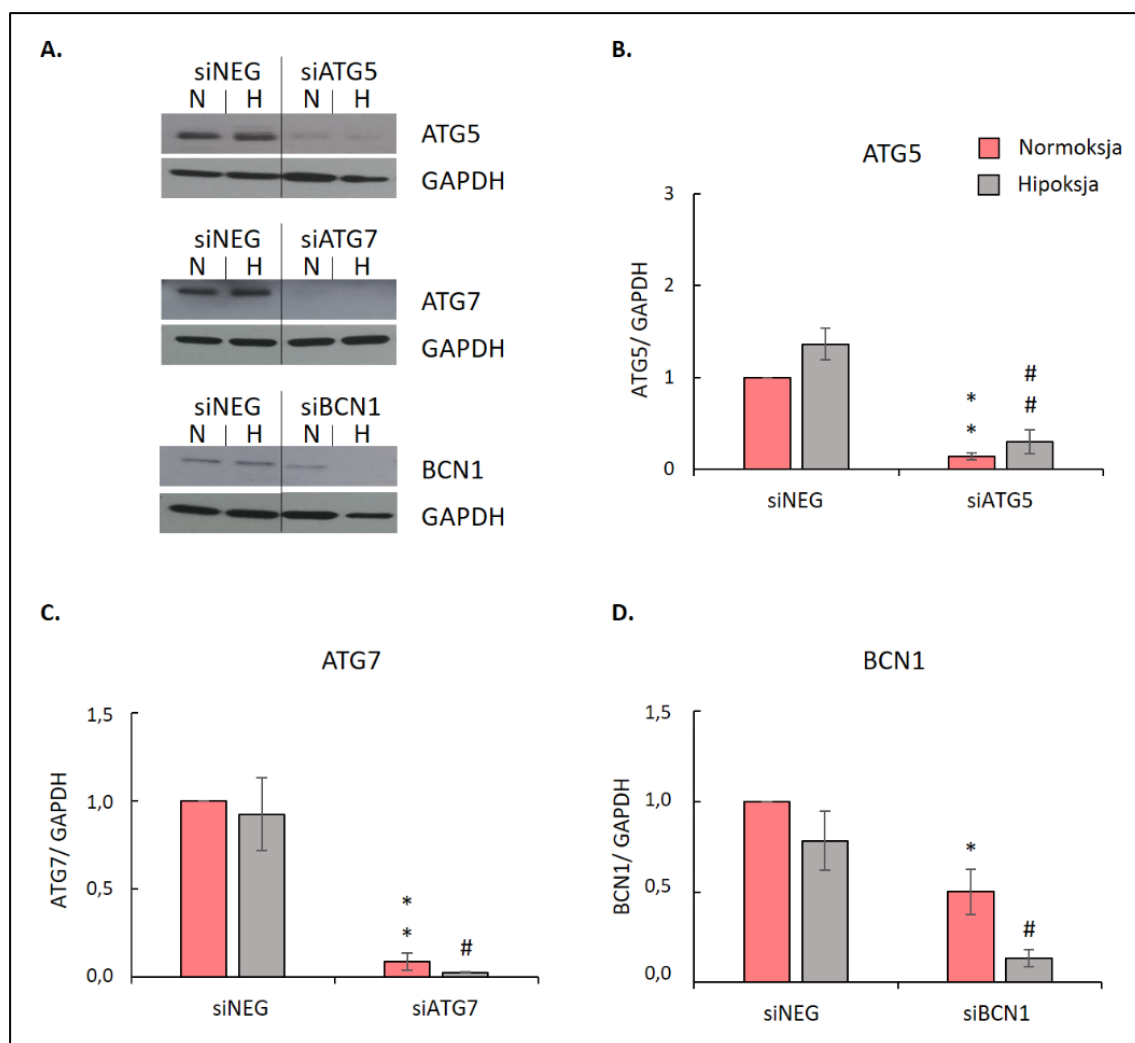
Reasumując, zaobserwowano tendencję do aktywacji autofagii w komórkach raka płuca leczonych CIS, szczególnie podczas niedotlenienia.

#### **4.4.1 Wyciszenie genów autofagicznych powoduje zmiany aktywności metabolicznej i proliferacyjnej**

Z powodu obserwacji dotyczącej tendencji komórek leczonych CIS w niedotlenieniu do aktywacji autofagii zbadano wpływ modulacji tego procesu na ucieczkę od starzenia w tych warunkach. Tak jak podczas inhibicji LDH również w tym przypadku zastosowano zarówno podejście genetyczne i farmakologiczne.

Efektywność transfekcji z użyciem siRNA może być zmieniona w wyniku starzenia komórkowego oraz modyfikacji udziału komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego [196, 197]. Z tego względu zbadano znaczenie autofagii w indukcji starzenia komórek raka płuca pod wpływem CIS przeprowadzając transfekcję przed indukcją starzenia. W tym celu użyto siRNA skierowanego przeciwko trzem genom autofagicznym: Beclin1 (BCN1), ATG5 lub ATG7 [46] zgodnie ze schematem zaprezentowanym na Ryc. 4.14.

W pierwszej kolejności oceniono skuteczność wyciszenia genów autofagicznych na poziomie białka (Ryc. 4.18). Zarówno wyciszenie genu ATG5 (Ryc. 4.18. A, B), ATG7 (Ryc. 4.18. A, C) jak i BCN1 (Ryc. 4.18. A, D) było skuteczne.

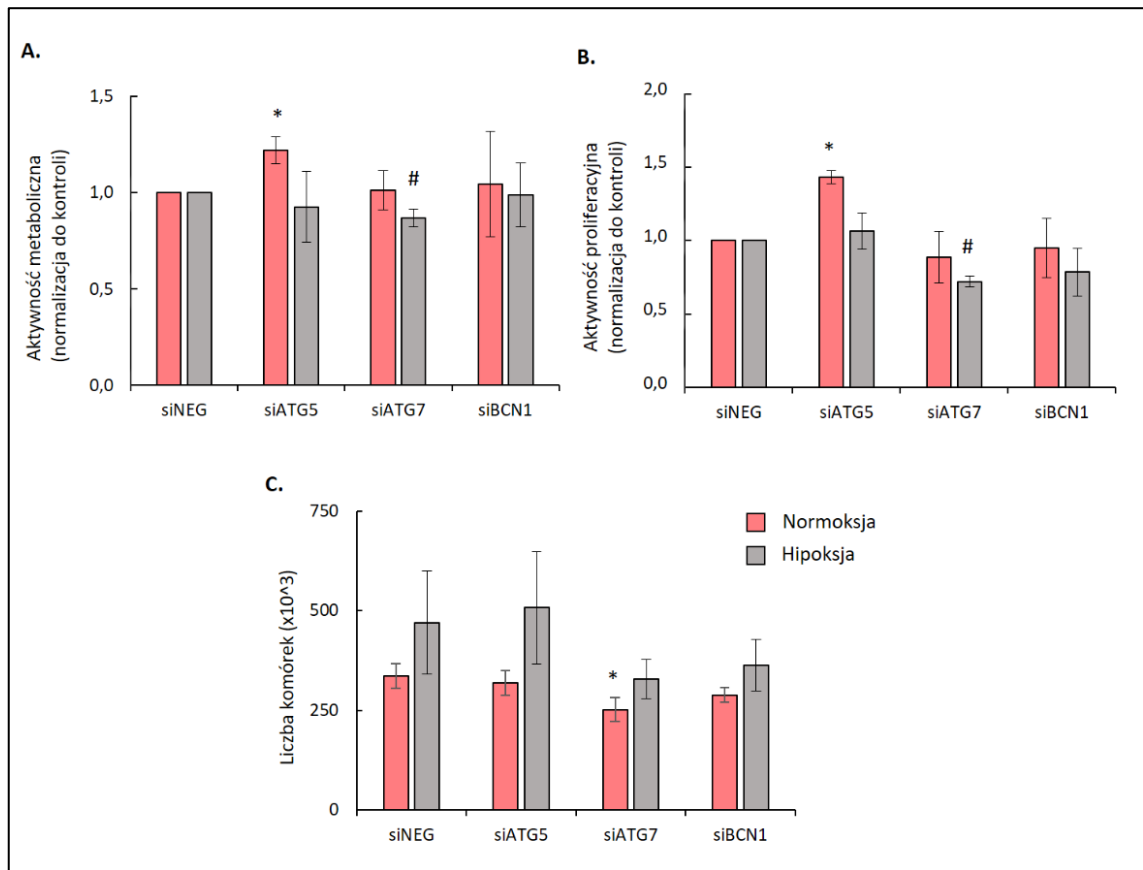


**Ryc. 4.18. Ocena skuteczności wyciszenia genów autofagicznych w komórkach raka płuca A549 leczonych CIS w normoksji i hipoksji.**

Reprezentatywne analizy western blot pokazujące ekspresję białek autofagicznych po wyciszeniu genów *ATG5*, *ATG7* lub *BCN1* (A). GAPDH zastosowano jako białko odniesienia. Kwantyfikację wyników przeprowadzono przy użyciu analizy densytometrycznej, które przedstawiono jako stosunek ekspresji odpowiedniego białka do GAPDH dla *ATG5* (B), *ATG7* (C) oraz (D). Za statystycznie istotne uznano  $P < 0,05$ , przy czym: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  porównując do kontroli w normoksji, # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$  porównując do kontroli w hipoksji. Każdy słupek reprezentuje średnią  $\pm$  SEM,  $N \geq 3$ .

Następnie, oceniono wpływ wyciszenia badanych genów na aktywność metaboliczną oraz proliferację. Wyciszenie genów związanych z autofagią miało niewielki wpływ na: aktywność dehydrogenazy mitochondrialnej (Ryc. 4.19. A), proliferację (Ryc. 4.19. B) oraz liczbę komórek (Ryc. 4.19. C) w obu warunkach tlenowych. Spośród badanych genów najbardziej wyraźny wpływ zaobserwowano po

wyciszeniu ATG5 i ATG7. Komórki po wyciszeniu ATG5 w normoksji wykazywały wzrost aktywności metabolicznej i proliferacyjnej. Odwrotny efekt zaobserwowano po wyciszeniu ATG7 w niedotlenieniu. Jednakże obserwacje te nie korespondowały z wynikami dotyczącymi liczby komórek.



**Ryc. 4.19. Wpływ wyciszenia genów autofagicznych na aktywność metaboliczną, proliferacyjną i liczbę komórek A549 leczonych CIS w normoksji i hipoksji.**

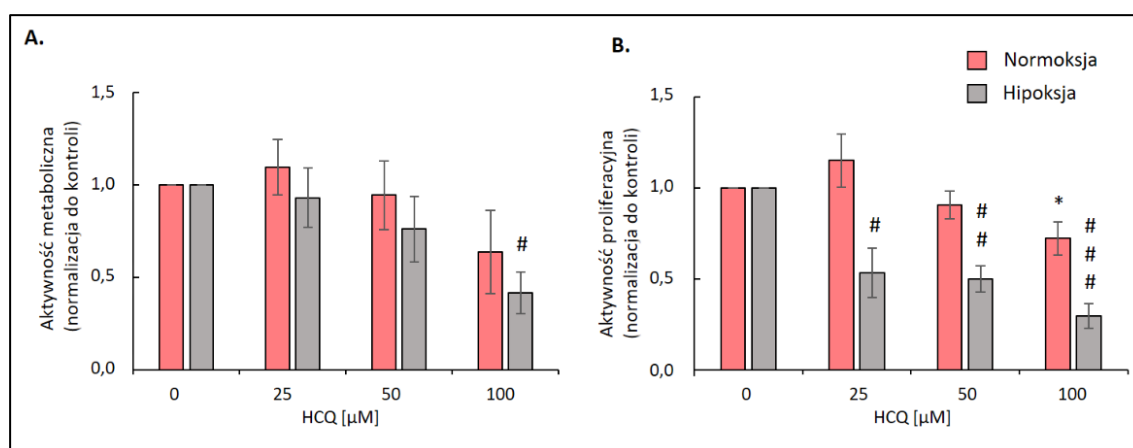
Aktywność metaboliczna (A) i proliferacyjna (B) komórek leczonych CIS po wyciszeniu genów autofagicznych. Ocena liczby komórek po leczeniu chemioterapeutykami z zastosowaniem komory Bürkera (C). Za statystycznie istotne uznano  $P < 0,05$ , przy czym: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  w porównaniu z kontrolą w normoksji, # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$  w porównaniu do kontroli hipoksji, Każdy słupek reprezentuje średnią  $\pm$  SEM,  $N \geq 3$ .

Podsumowując, z badanych genów autofagicznych jedynie wyciszenie ATG7 było w stanie zmniejszyć aktywność proliferacyjną komórek traktowanych CIS w hipoksji, jednakże nie powodowało to istotnego zmniejszenia liczby komórek w tych warunkach.

#### 4.4.2 Hydroksychlorokina powoduje zahamowanie proliferacji komórek traktowanych CIS w hipoksji

Ponieważ efekt wyciszania genów autofagicznych na indukcję starzenia był znikomy, do zahamowania autofagii zastosowano farmakologiczny inhibitor HCQ, który hamuje ten proces poprzez blokowanie fuzji autofagosomu z lizosomem [198]. Ponadto HCQ poprzez wpływ na wzrost pH powoduje blokadę degradacji ładunku autofagolizosomów [199].

Aby sprawdzić, czy autofagia bierze udział w ucieczce ze starzenia zmodyfikowano podstawowy model eksperymentalny przedstawiony na Ryc. 4.1. Komórki 4 dni po zakończeniu leczenia CIS (Ryc. 4.1. d) inkubowano z HCQ przez 24 godziny. Następnie inhibitor usunięto i komórki hodowano w pożywce bez leku przez kolejne 2 dni (Ryc. 4.1. e).

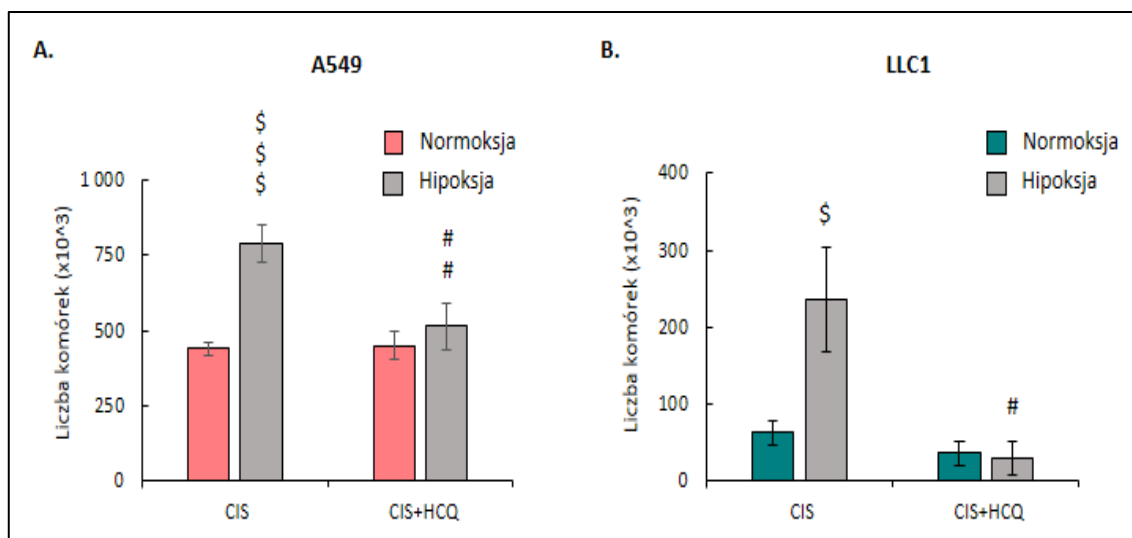


**Ryc. 4.20. Wpływ inhibitora autofagii (HCQ) na aktywność metaboliczną i proliferację komórek A549 leczonych CIS w normoksji i hipoksji.**

Zmiany aktywności metabolicznej (A) i proliferacyjnej (B) komórek leczonych CIS pod wpływem HCQ. Za statystycznie istotne uznano  $P < 0,05$ , przy czym: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  w porównaniu z kontrolą w normoksji, # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$  w porównaniu do kontroli hipoksji, Każdy słupek reprezentuje średnią  $\pm$  SEM,  $N \geq 3$ .

W odpowiedzi na HCQ, komórki raka płuc traktowane CIS zmniejszyły aktywność metaboliczną (Ryc. 4.20. A) i proliferacyjną (Ryc. 4.20. B), ale tylko w warunkach hipoksji. Wskazuje to na skuteczność HCQ w zahamowaniu proliferacji komórek uciekających przed starzeniem po traktowaniu CIS w niedotlenieniu.

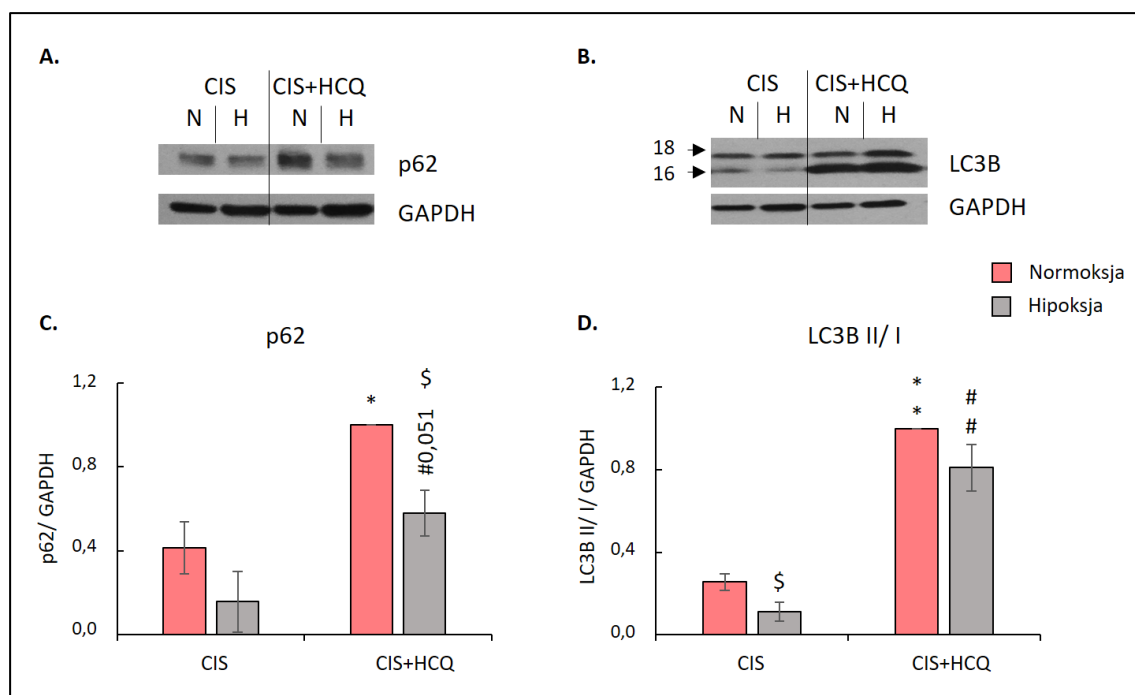
Wyniki te zostały potwierdzone obserwacją, że hamowanie autofagii przez HCQ spowodowało zmniejszenie liczby komórek w hipoksji zarówno w ludzkich (Ryc. 4.21. A), jak i mysich (Ryc. 4.21. B) liniach komórkowych raka płuc.



**Ryc. 4.21. Wpływ inhibitora autofagii (HCQ) na liczbę komórek ludzkiego i mysiego raka płuca leczonych CIS w normoksji i hipoksji.**

Ocena liczby komórek ludzkiego rak płuca linii A549 (A) oraz mysiego raka płuca LLC1 (B) została przeprowadzona w komorze Bürkera (C). Za statystycznie istotne uznano  $P < 0,05$ , przy czym: # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$  porównując do kontroli w hipoksji, \$ $P < 0,05$ , \$\$ $P < 0,01$ , \$\$\$ $P < 0,001$  porównując niedotlenienie do normoksji. Każdy słupek reprezentuje średnią  $\pm$  SEM,  $N \geq 3$ .

Badanie ekspresji białek autofagicznych wykazało, że traktowanie HCQ zaburzało przepływ autofagiczny, wyrażony poprzez akumulację p62 (Ryc. 4.22. A, C) oraz II formy białka LC3B (Ryc. 4.22. B, D). Jednakże niedotlenienie powodowało obniżenie ekspresji p62 w starzejących się komórkach traktowanych HCQ.



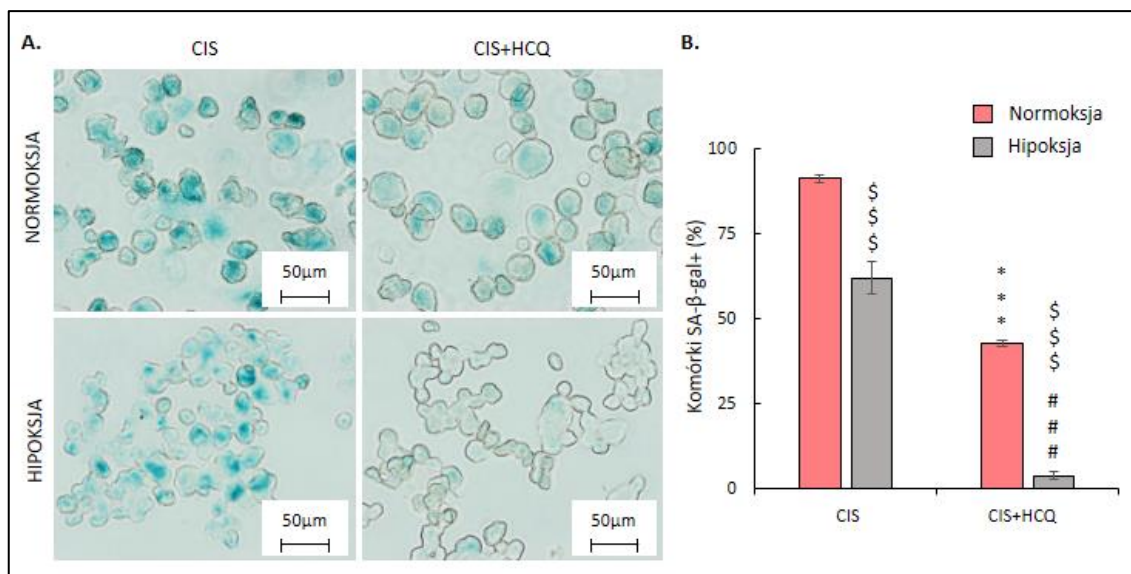
**Ryc. 4.22.** Wpływ HCQ na ekspresję białek autofagicznych komórek A549 w normoksji i hipoksji.

Reprezentatywne analizy western blot pokazujące ekspresję p62 (A) i LC3B (B). GAPDH zastosowano jako białko odniesienia. Kwantyfikację wyników przeprowadzono przy użyciu analizy densytometrycznej, które przedstawiono jako stosunek odpowiedniego białka do GAPDH dla p62 (C) i LC3B II/I (D). Za statystycznie istotne uznano  $P < 0,05$ , przy czym: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  porównując do kontroli w normoksji, # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$  porównując do kontroli w hipoksji, § $P < 0,05$ , §§ $P < 0,01$ , §§§ $P < 0,001$  porównując niedotlenienie do normoksji. Każdy słupek reprezentuje średnią  $\pm$  SEM,  $N \geq 3$ .

#### 4.4.3 Hydroksychlorokina nie zmienia ekspresji białek związanych ze ścieżką starzeniową p53/p21, ale zmniejsza ekspresję białek związanych z progresją cyklu komórkowego

Podczas badania aktywności SA- $\beta$ -gal intensywność zabarwienia komórek po traktowaniu HCQ była osłabiona (Ryc. 4.23.). Efekt ten zdaje się być artefaktem technicznym spowodowanym wzrostem pH, którego wartość jest bardzo istotna w tej metodzie barwienia. Jednakże charakterystyczne cechy komórek TIS takie jak powiększenie rozmiarów zostały zachowane.



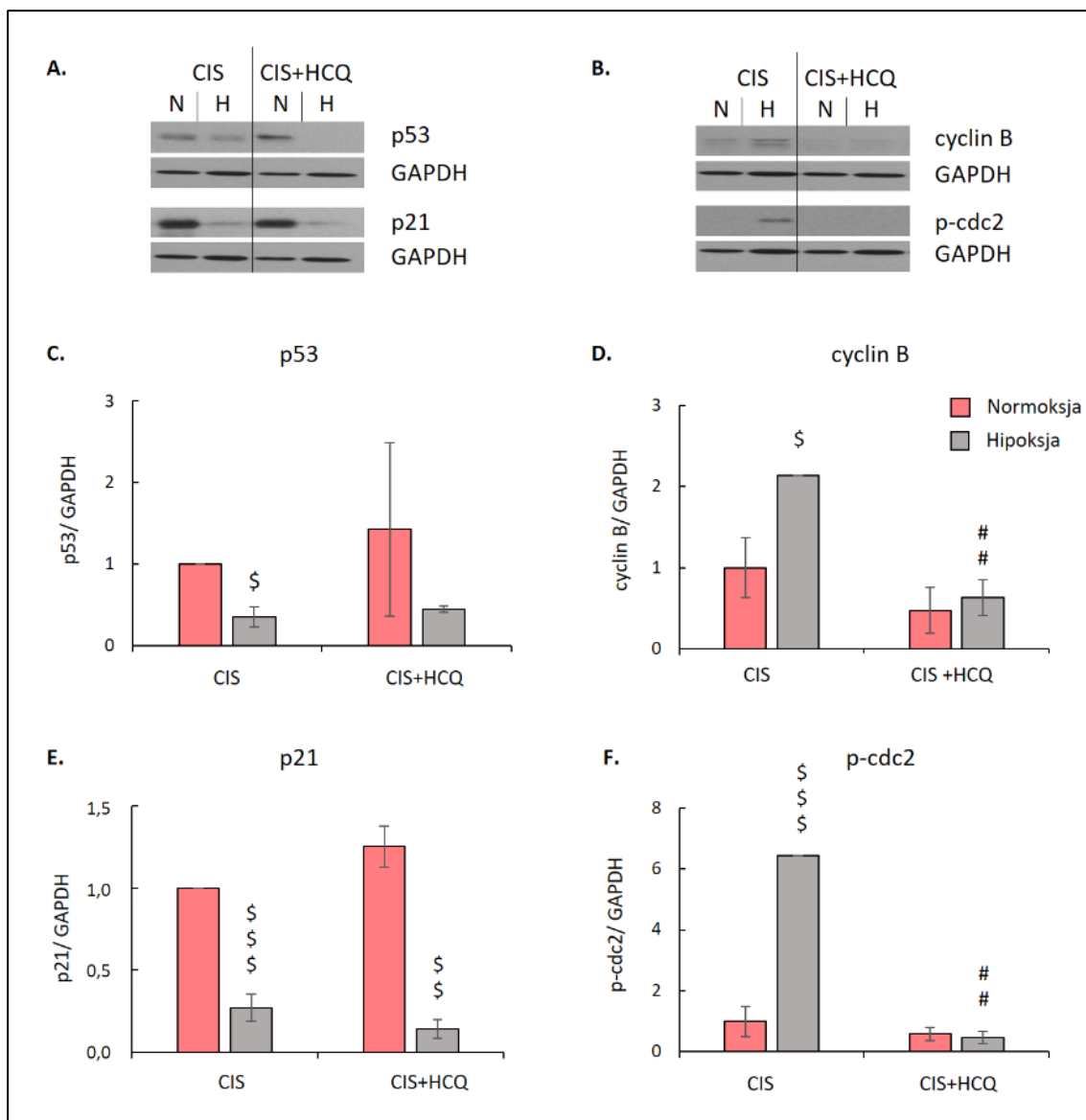


**Ryc. 4.23. Wpływ HCQ na aktywność SA-β-gal komórek A549 leczonych CIS w normoksji i hipoksji.**

Wykrywanie i oznaczanie ilościowe starzenia przeprowadzono przy użyciu barwienia SA-β-gal w komórkach raka płuca A549. Reprezentatywne zdjęcia wykonano za pomocą mikroskopii świetlnej (A). Ilościowa ocena SA-β-gal pozytywnych komórek, wyrażona jako procent komórek pozytywnych (B). Za statystycznie istotne uznano  $P < 0,05$ , przy czym: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  porównując do kontroli w normoksji, # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$  porównując do kontroli w hipoksji, \$ $P < 0,05$ , \$\$ $P < 0,01$ , \$\$\$ $P < 0,001$  porównując niedotlenienie do normoksji. Każdy słupek reprezentuje średnią  $\pm$  SEM,  $N \geq 3$ .

Zbadano również wpływ HCQ na ekspresję białek zmieniających się w komórkach wychodzących ze starzenia po leczeniu CIS w niedotlenieniu. Podczas analizy okazało się, że nie zaobserwowano znaczącej różnicy dla białek związanych ze szlakiem starzenia: p53 (Ryc. 4.24. A, C) lub p21 (Ryc. 4.24. A, E) pod wpływem HCQ. Natomiast indukowane hipoksją białka proliferacyjne cyklina B (Ryc. 4.24. B, D) i p-cdc2 (Ryc. 4.24. B, F), ulegały znacznemu spadkowi w wyniku działania HCQ.

Podsumowując, traktowanie HCQ zmniejszyło ucieczkę przed starzeniem się komórek raka płuca leczonych CIS w warunkach niedotlenienia. Efekt ten manifestował się poprzez spadek aktywności proliferacyjnej i liczby komórek oraz zmniejszenie ekspresji białek związanych z progresją cyklu komórkowego na etapie punktu kontrolnego G2/M. Jednakże HCQ nie wywołało znaczącego efektu na ekspresję białek p53 i p21 związanych ze ścieżką sygnałową starzenia komórkowego. Z tego powodu celowym wydaje się zbadanie efektu HCQ na ucieczkę przed starzeniem komórkowym po traktowaniu CIS w niedotlenieniu w dłuższej perspektywie czasowej.

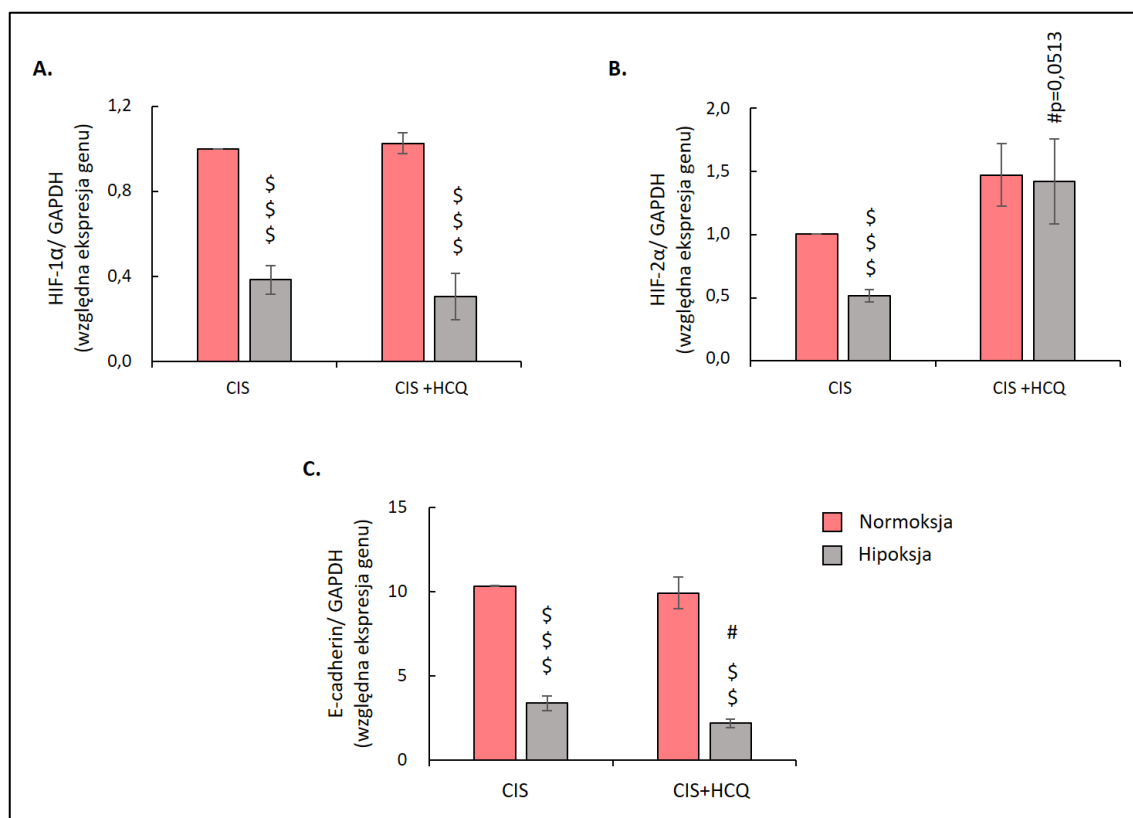


**Ryc. 4.24. Wpływ HCQ na ekspresję białek starzeniowych i proliferacyjnych komórek A549 leczonych CIS w normoksji i hipoksji.**

Reprezentatywne analizy western blot pokazujące ekspresję p53 i p21 (A) oraz cykliny B i p-cdc2 (B). GAPDH zastosowano jako białko odniesienia. Kwantyfikację wyników przeprowadzono przy użyciu analizy densytometrycznej, które przedstawiono jako stosunek odpowiedniego białka do GAPDH dla p53 (C), p21 (E), cyklina B (D) i p-cdc2 (F). Za statystycznie istotne uznano  $P < 0,05$ , przy czym: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  porównując do kontroli w normoksji, # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$  porównując do kontroli w hipoksji, \$ $P < 0,05$ , \$\$ $P < 0,01$ , \$\$\$ $P < 0,001$  porównując niedotlenienie do normoksji. Każdy słupek reprezentuje średnią  $\pm$  SEM,  $N \geq 3$ .

#### 4.5 Badanie ekspresji czynników indukowanych niedotlenieniem oraz E-kadheryny w komórkach leczonych cisplatyną i hydroksychlorokiną

Ponieważ inhibicja autofagii poprzez użycie HCQ zdaje się być potencjalnym sposobem na zahamowanie ucieczki od starzenia się komórek poddanych leczeniu CIS w warunkach niedotlenienia zbadano cechy tych komórek. Ze względu na udział czynników indukowanych hipoksją w odpowiedź komórek na niedotlenienie sprawdzono, czy HCQ zmienia ich ekspresję. W tym celu po 24h leczenia HCQ, czyli w dziewiątym dniu eksperymentu (Ryc.4.1) wykonano analizę ekspresji genów HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$ , stosując technikę qRT-PCR. Okazało się, że HCQ podwyższył ekspresję HIF-2 $\alpha$  (Ryc. 4.25. B) w komórkach traktowanych CIS w hipoksji, ale nie wpływał na ekspresję genu HIF-1 $\alpha$  (Ryc. 4.25. A).



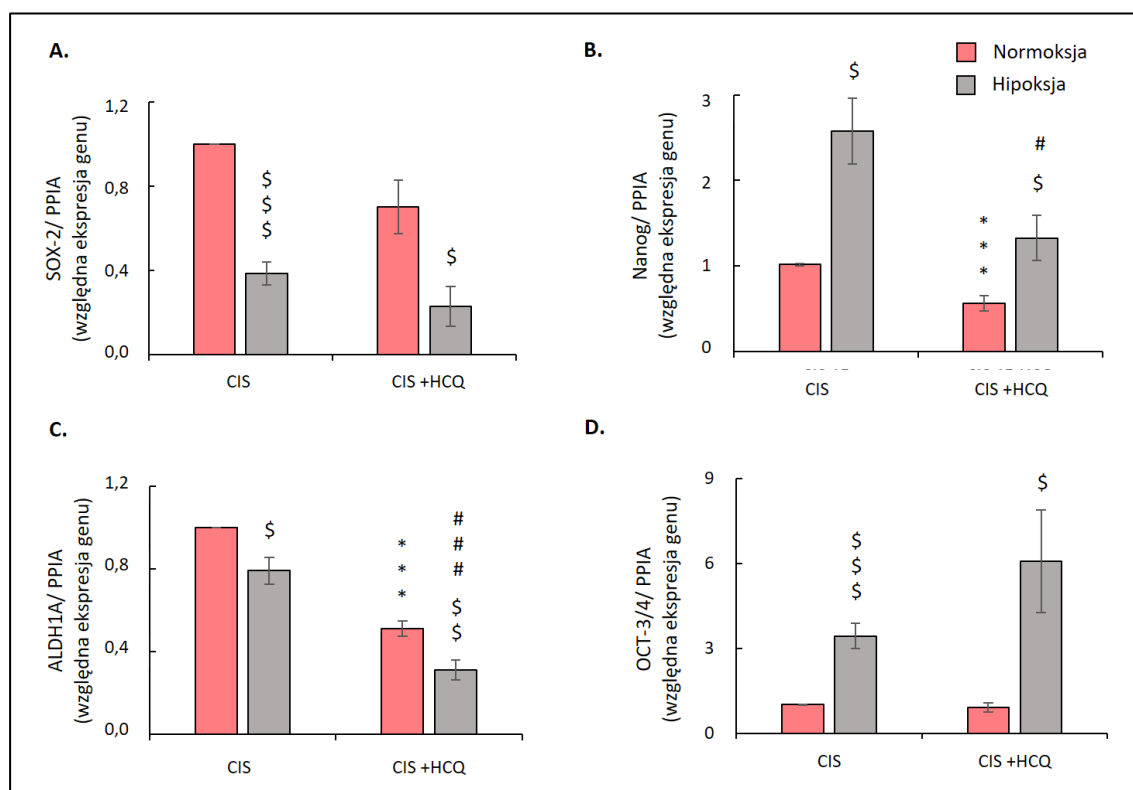
**Ryc. 4.25. Wpływ HCQ na ekspresję E-kadheryny i genów związanych z odpowiedzią na hipoksję w komórkach A549 leczonych CIS w normoksji i hipoksji.**

Ekspresję genów HIF-1 $\alpha$  (A), HIF-2 $\alpha$  (B) i E-kadheryny (C) mierzono za pomocą qRT-PCR. PPIA zastosowano jako gen referencyjny. Za statystycznie istotne uznano  $P < 0,05$ , przy czym: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  porównując do kontroli w normoksji, # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$  porównując do kontroli w hipoksji, \$ $P < 0,05$ , \$\$ $P < 0,01$ , \$\$\$ $P < 0,001$  porównując niedotlenienie do normoksji. Każdy słupek reprezentuje średnią  $\pm$  SEM,  $N \geq 3$ .

Następnie zbadano poziom mRNA E-kadheryny, która we wcześniejszych eksperymentach ulegała obniżeniu pod wpływem CIS w niedotlenieniu. W tym przypadku wykazano, że traktowanie HCQ pogłębiło redukcję ekspresji tego nabłonkowego markera w warunkach hipoksji (Ryc. 4.25. C). Otrzymany wynik sugeruje nabywanie fenotypu mezenchymalnego pod wpływem hamowania autofagii przy użyciu HCQ w komórkach traktowanych CIS w niedotlenieniu.

#### 4.6 Badanie ekspresji genów i białek związanych z macierzystością

Ponieważ mezenchymalny fenotyp jest jedną z cech charakterystycznych nowotworowych komórek macierzystych [200, 201], zbadano również markery związane z macierzystością. Ekspresję genów OCT-3/4, NANOG, SOX2 i ALDH1 po leczeniu HCQ zaprezentowano na Ryc. 4.26.

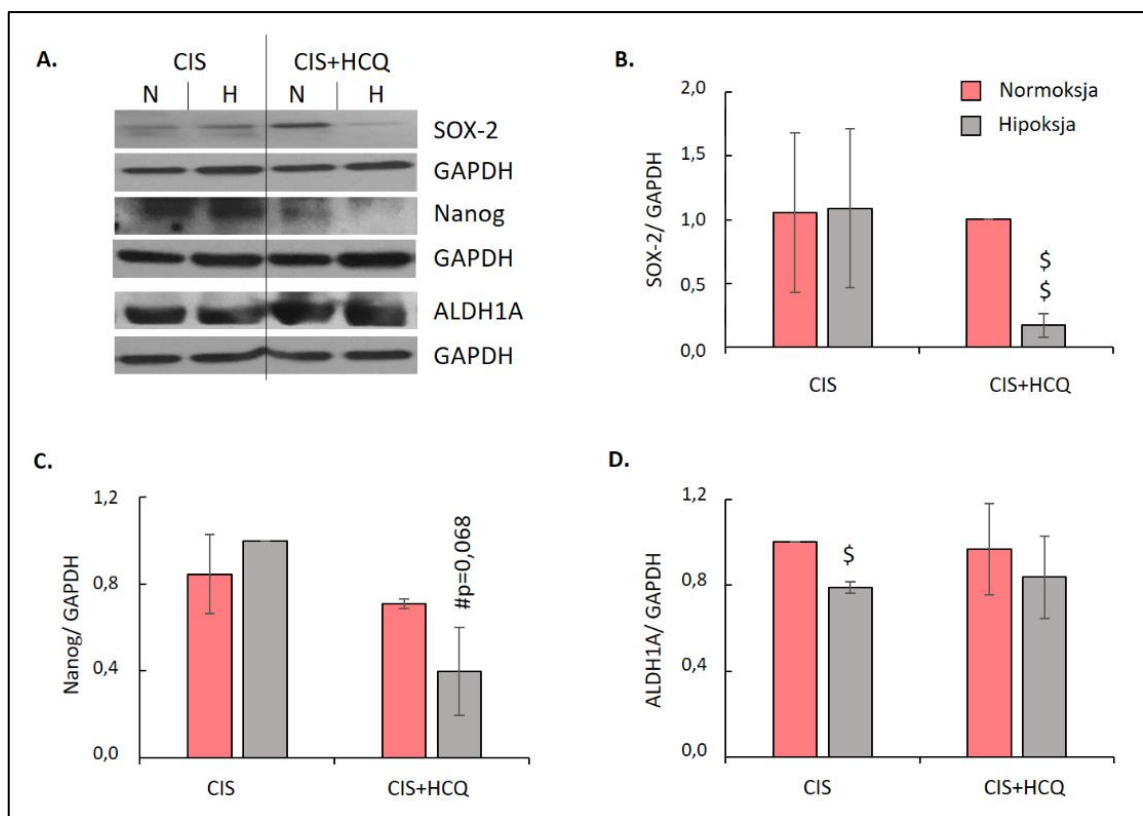


**Ryc. 4.26. Wpływ HCQ na ekspresję genów związanych z fenotypem macierzystym komórek A549 leczonych CIS w normoksji i hipoksji.**

Ekspresję genów SOX-2 (A), NANOG (B), ALDH1A (C) i OCT-3/4 (D) mierzono za pomocą qRT-PCR. PPIA zastosowano jako gen referencyjny. Za statystycznie istotne uznano  $P < 0,05$ , gdzie: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  porównując do kontroli w normoksji, # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$  porównując do kontroli w hipoksji, \$ $P < 0,05$ , \$\$ $P < 0,01$ , \$\$\$ $P < 0,001$  porównując niedotlenienie do normoksji. Każdy słupek reprezentuje średnią  $\pm$ SEM,  $N \geq 3$ .

Podanie HCQ zmniejszało ekspresję NANOG (Ryc. 4.26. B) i ALDH1 (Ryc. 4.26. C) w niedotlenionych komórkach traktowanych CIS. Natomiast w przypadku obu pozostałych genów: SOX2 (Ryc. 4.26. A) i OCT-3/4 (Ryc. 4.26. D) nie wykazano istotnych zmian na poziomie mRNA pod wpływem leczenia HCQ tych komórek.

Na poziomie białka HCQ zmniejszała ekspresję SOX-2 (Ryc. 4.27. A, B) i NANOG (Ryc. 4.27. A, C) w niedotlenionych komórkach traktowanych CIS. Poziom białka ALDH1 (Ryc. 4.27. A, D) w odróżnieniu do mRNA nie wykazywał istotnych różnic pod wpływem traktowania HCQ w niedotlenieniu.



**Ryc. 4.27. Wpływ HCQ na ekspresję białek związanych z fenotypem macierzystym komórek A549 leczonych CIS w normoksji i hipoksji.**

Reprezentatywne analizy western blot pokazujące ekspresję SOX-2, Nanog i ALDH1A (A). GAPDH zastosowano jako białko odniesienia. Kwantyfikację wyników przeprowadzono przy użyciu analizy densytometrycznej, które przedstawiono jako stosunek odpowiedniego białka do GAPDH dla SOX-2 (B), Nanog (C) i ALDH1A (D). Za statystycznie istotne uznano  $P < 0,05$ , przy czym: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  porównując do kontroli w normoksji, # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$  porównując do kontroli w hipoksji, \$ $P < 0,05$ , \$\$ $P < 0,01$ , \$\$\$ $P < 0,001$  porównując niedotlenienie do normoksji. Każdy słupek reprezentuje średnią  $\pm$  SEM,  $N \geq 3$ .

Podsumowując, wykazano, że ekspozycja na HCQ komórek leczonych CIS w połączeniu z hipoksją prowadziła do zmniejszenia ekspresji niektórych genów i białek związanych z fenotypem macierzystych komórek nowotworowych. Jednakże efekt ten wymaga weryfikacji w dłuższej perspektywie czasowej.

#### **4.7 Badanie wpływu hydroksychlorokiny na ekspresję genów z zastosowaniem metody sekwencjonowania następnej generacji**

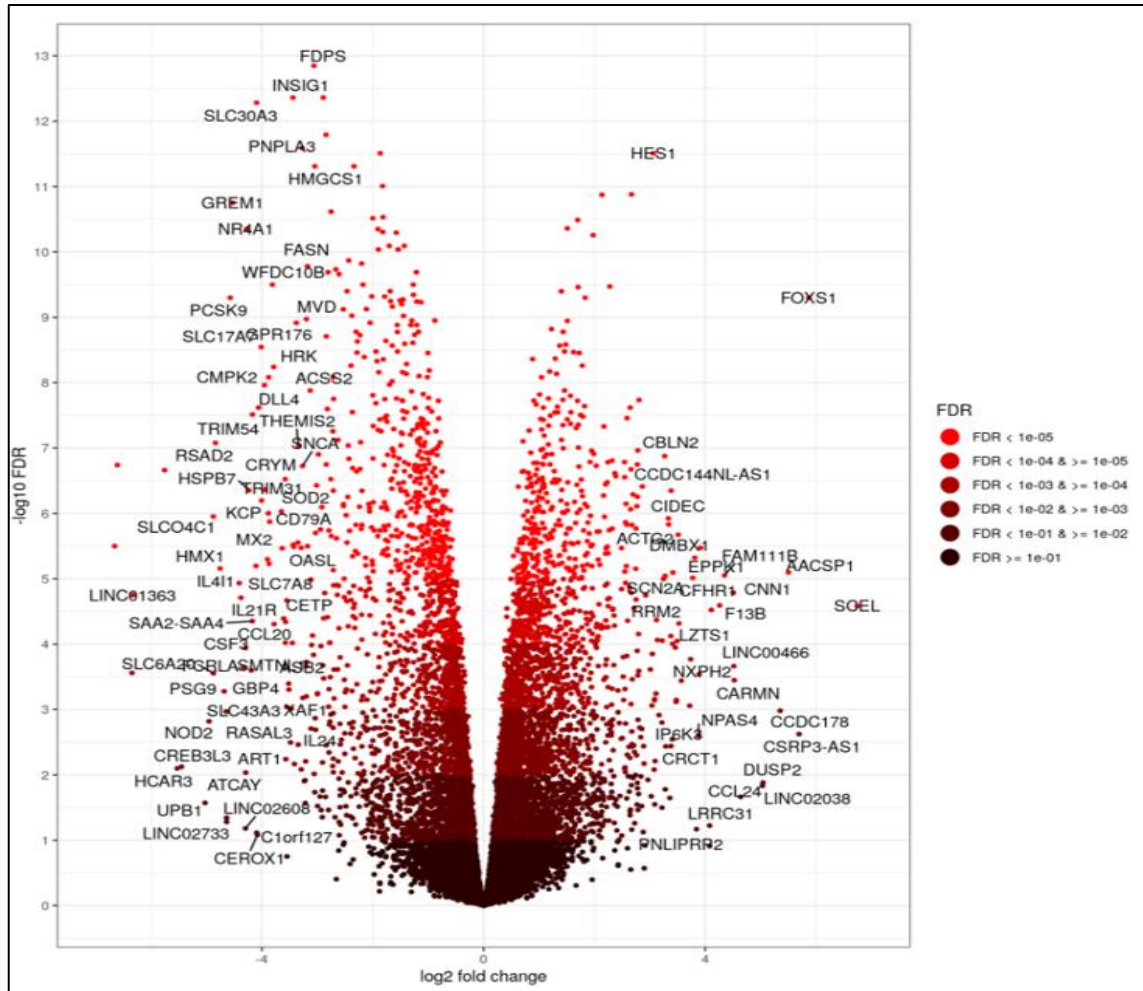
W świetle wyników dotyczących wpływu HCQ na ekspresję genów i białek związanych z EMT i macierzystością ważnych w kontekście klinicznym wykonano analizę ekspresji genów w szerszym zakresie z wykorzystaniem techniki sekwencjonowania następnej generacji (ang. Next Generation Sequencing, NGS). Ponadto poszukiwano nowych genów oraz szlaków ulegających zmianom w tym układzie eksperymentalnym. W tym celu po 24h leczenia HCQ, czyli w dziewiątym dniu eksperymentu (Ryc. 4.1.) wyizolowano RNA, którego stężenie, integralność oraz czystość zaprezentowano w tabeli 4.1.

Symbol próbki	Traktowanie	Numer powtórzeń	Stężenie ng/ $\mu$ l	260/230	260/280	RIN
WIM55	CIS 5 N	3	362,23	0,82	2,05	10
WIM56	CIS 5 N	2	426,15	1,56	2,10	10
WIM57	CIS 5 N	4	633,35	2,23	2,06	10
WIM58	CIS 5 + HCQ N	3	474,85	2,05	2,05	10
WIM59	CIS 5 + HCQ N	2	363,85	1,57	2,08	10
WIM60	CIS 5 + HCQ N	4	418,12	1,07	2,08	10
WIM70	CIS 5 H	3	292,46	1,19	2,06	10
WIM71	CIS 5 H	2	436,69	2,13	2,08	10
WIM72	CIS 5 H	4	393,42	1,25	2,08	10
WIM73	CIS 5 + HCQ H	3	241,54	1,14	2,07	10
WIM74	CIS 5 + HCQ H	2	358,08	1,89	2,09	10
WIM75	CIS 5 + HCQ H	4	380,19	1,61	2,07	10

**Tab. 4.1. Charakterystyka RNA użytego do sekwencjonowania.**

*Do charakterystyki wyizolowanego RNA zastosowano spektrofotometryczny pomiar stężenia i czystości poprzez współczynniki absorbancji 260/230 oraz 260/280, a także fluorometryczną analizę integralności RIN (ang. RNA Integrity Number).*

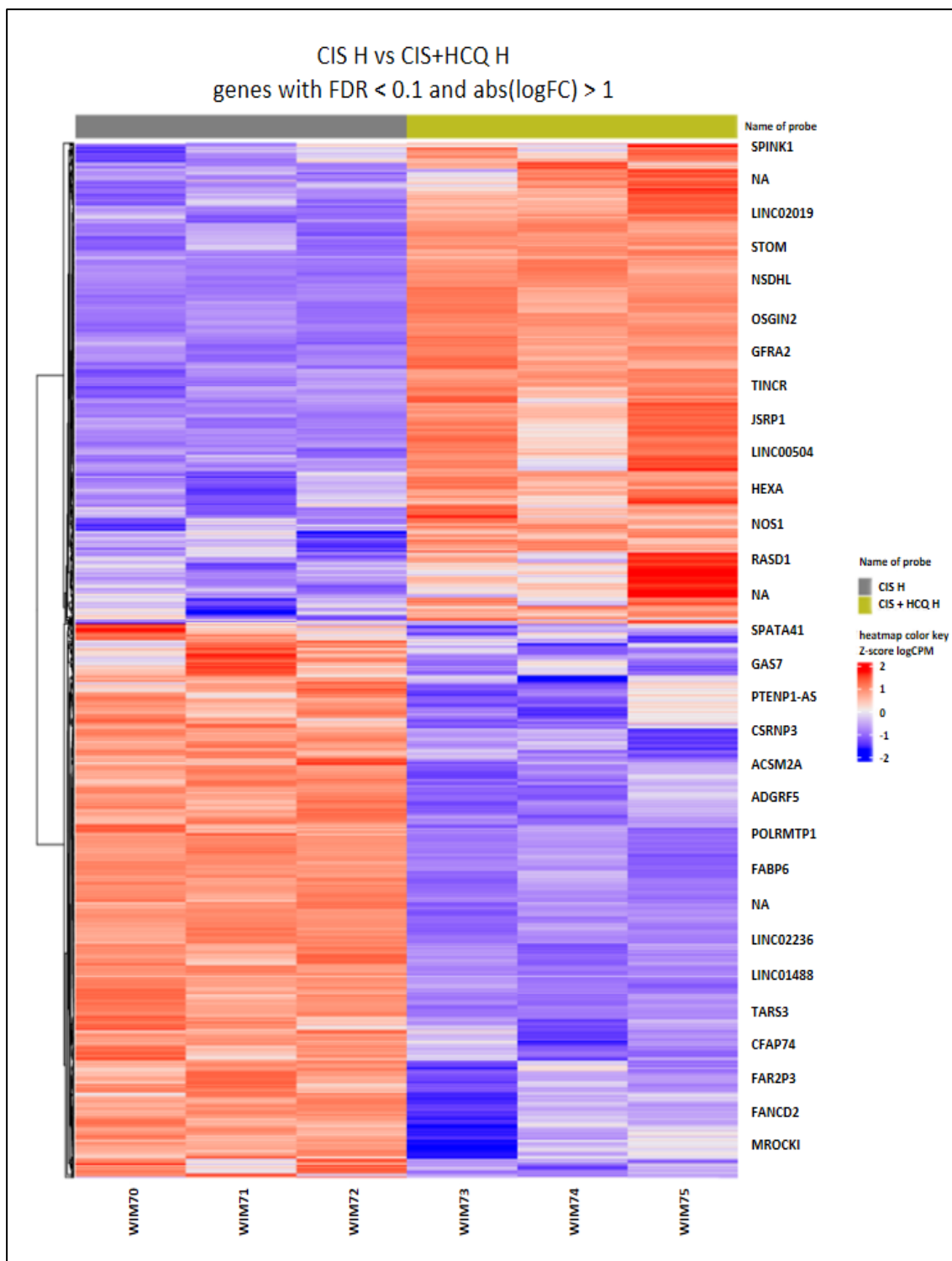
Następnie RNA zostało poddane sekwencjonowaniu następnej generacji. Porównanie transkryptomu wykazało istotnie zróżnicowaną ekspresję wielu genów przedstawioną na wykresie (Ryc. 4.28).



**Ryc. 4.28.** Volcano plot CIS H vs CIS 5+HCQ H.

Wykres wartości krotności zmian ( $\log_2$  fold change) oraz wartości FDR dla genów wykazujących zróżnicowaną ekspresję w porównywanych próbkach. Kropki po lewej stronie reprezentują geny wykazujące obniżoną ekspresję w komórkach leczonych CIS w hipoksji (CIS H) w porównaniu z dodatkowym traktowaniem HCQ (CIS 5+HCQ H), natomiast po prawej - podwyższona.

Do dalszych analiz wybrano parametry:  $FDR < 0,1$  oraz  $abs(\log_2 FC) > 1$ , który odpowiada minimum dwukrotności zmian ekspresji. Po uwzględnieniu powyższych parametrów uzyskano 2365 genów o statystycznie istotnych różnicach w poziomie ekspresji w obrębie badanych grup, które przedstawiono na poniższej mapie cieplnej (Ryc. 4.29).



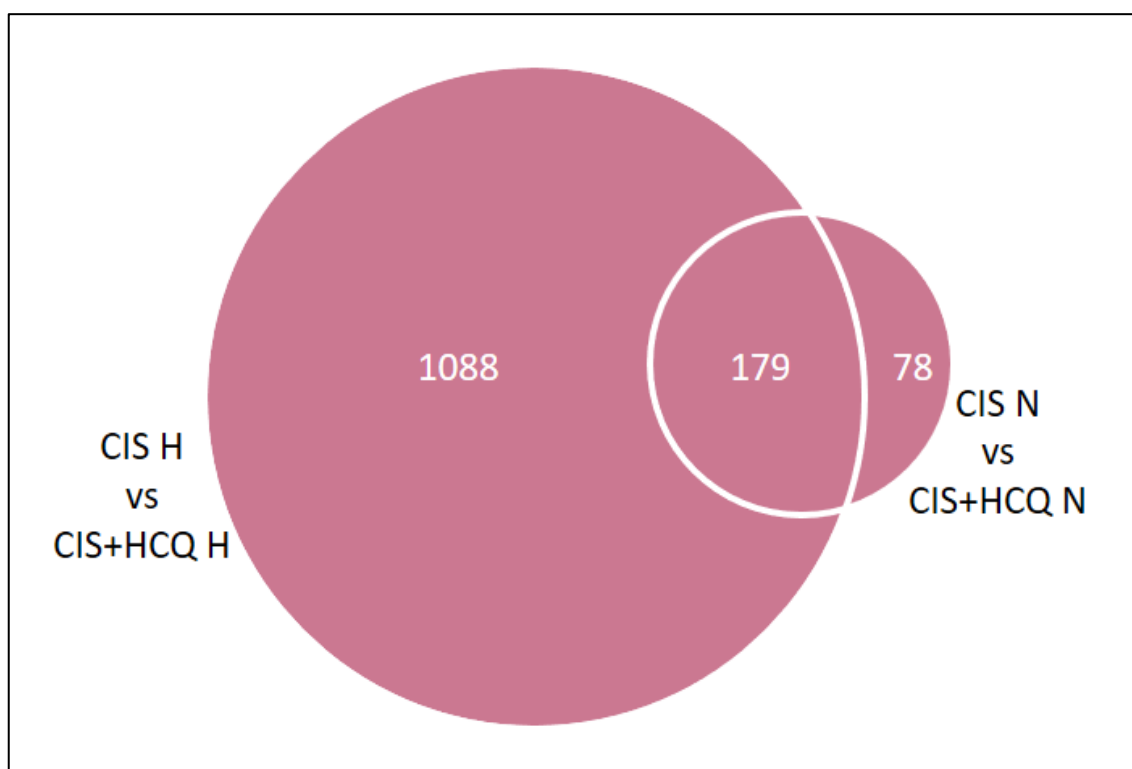
**Ryc. 4.29.** Mapa cieplna przedstawiająca geny o statystycznie istotnych różnicach dla porównania CIS H vs CIS +HCQ H.

Niebieskim kolorem oznaczono geny o obniżonej ekspresji, natomiast czerwonym geny o ekspresji zwiększonej. Po lewej stronie przedstawiono ekspresję genów dla komórek leczonych CIS w hipoksji (CIS H), a po prawej dla komórek traktowanych dodatkowo HCQ (CIS+HCQ H).



W celu wykluczenia genów zmienionych pod wpływem HCQ niezależnie od warunków tlenowych tożsame analizy wykonano dla komórek leczonych w warunkach normoksji. Stosując te same parametry FDR i  $\text{abs}(\log\text{FC})$ , wyodrębniono 626 genów o zmienionej ekspresji. Następnie pomiędzy zmianami w normoksji i w hipoksji porównano zmieniające się geny z podziałem na te o zwiększonej i zmniejszonej ekspresji.

Podczas analizy genów o podwyższonej ekspresji po leczeniu CIS w porównaniu do dodatkowego leczenia HCQ wykryto 1088 genów o zmienionej ekspresji (ang. Differentially expressed genes, DEGs) w warunkach niedotlenienia, 78 w normoksji, natomiast 179 genów było wspólnych dla obu warunków tlenowych (Ryc. 4.30.). Zatem w komórkach uciekających przed starzeniem w niedotlenieniu zmianie ekspresji ulega znacznie więcej genów pod wpływem traktowania HCQ niż w przypadku tego traktowania w warunkach normoksyjnych.

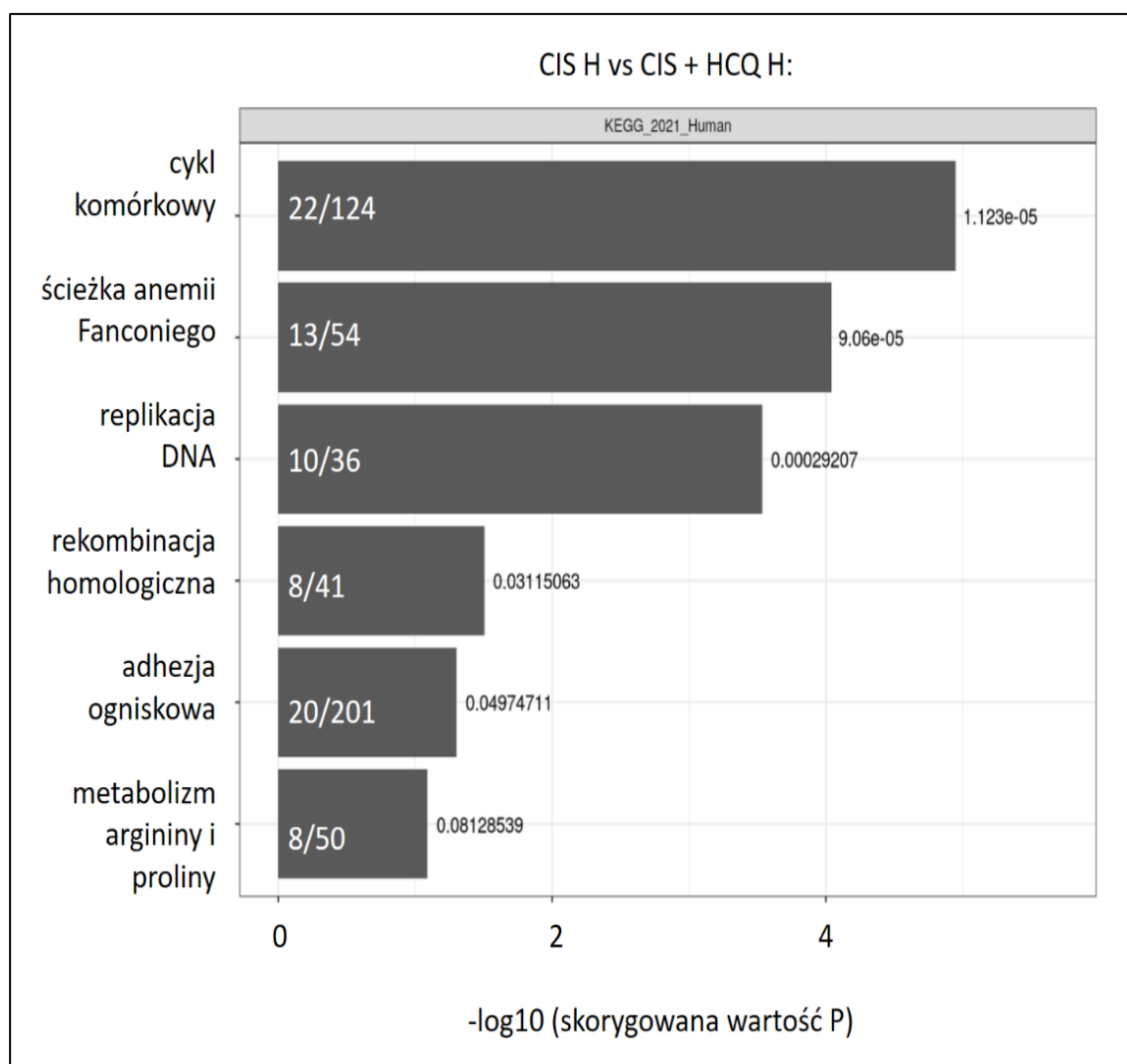


**Ryc. 4.30. Diagram Venna genów o zwiększonej ekspresji komórek leczonych CIS w porównaniu z dodatkowym leczeniem HCQ w hipoksji i normoksji.**

Po lewej stronie przedstawiono liczbę genów o zwiększonej ekspresji dla komórek leczonych CIS w hipoksji (CIS H) w porównaniu z komórkami traktowanymi dodatkowo HCQ (CIS+HCQ H), a po prawej dla komórek leczonych w normoksji.

W celu pogłębionej analizy dotyczącej procesów w jakie zaangażowane są zmienione geny z każdej grupy wykorzystano bazę KEGG (ang. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Za istotne uznano terminy, dla których skorygowana wartość P wynosiła poniżej 0,1.

Wśród genów o zwiększonej ekspresji w komórkach leczonych CIS w porównaniu do komórek leczonych dodatkowo HCQ w hipoksji istotnymi okazały się szlaki związane z cyklem komórkowym (22 DEGs) oraz replikacją DNA (10 DEGs) (Ryc. 4.31.).

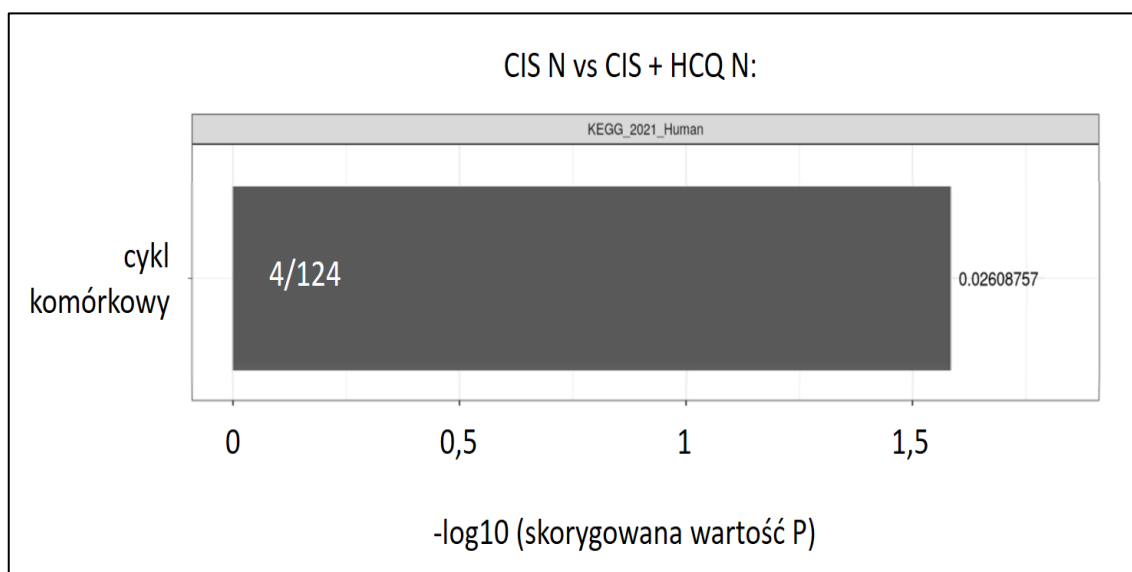


**Ryc. 4.31.** Analiza terminów bazy KEGG wśród genów o zwiększonej ekspresji w komórkach leczonych CIS w porównaniu z dodatkowym leczeniem HCQ w hipoksji.

Dla każdego terminu przedstawiono liczbę zmienionych genów po lewej stronie słupków wykresu oraz skorygowaną wartość P po prawej stronie.

Również rekombinacja homologiczna (8 DEGs) oraz ścieżka anemii Fanconiego (13 DEGs) mające kluczowe znaczenie w naprawie uszkodzeń DNA [202-205] wykazywały zwiększoną ekspresję w komórkach nieleczonych HCQ. Wynik ten potwierdza wcześniejsze obserwacje dotyczące zwiększonej proliferacji komórek leczonych CIS względem komórek po dodatkowym traktowaniu HCQ w niedotlenieniu (Ryc. 4.20. B, 4.21). Wśród genów o wzmożonej ekspresji w komórkach leczonych tylko CIS znalazły się również geny adhezji ogniskowej (20 DEGs) związanej z inwazyjnością nowotworu oraz tworzeniem przerzutów [206, 207]. W tej grupie wyodrębniono także geny metabolizmu aminokwasów argininy i proliny (8 DEGs), będące czynnikami wpływającymi na wzrost proliferacji komórek nowotworowych oraz modulację środowiska guza [208-210] (Ryc. 4.31.).

Porównując badane grupy w normoksji istotny okazał się tylko jeden termin, związany z cyklem komórkowym. Jednakże o wiele mniej genów wykazało istotność w tych warunkach tlenowych (4 DEGs) (Ryc. 4.32.).

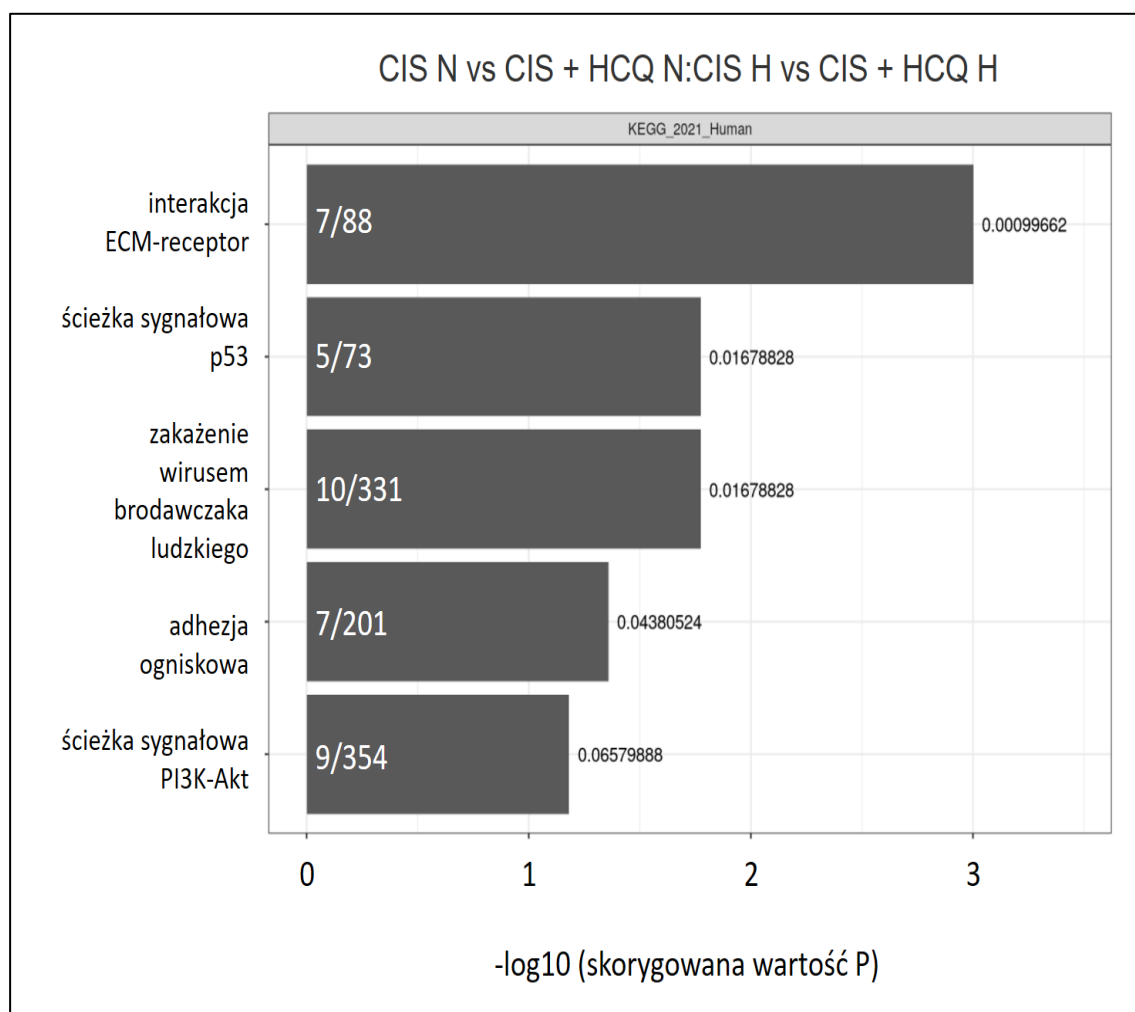


Ryc. 4.32. Analiza terminów bazy KEGG wśród genów o zwiększonej ekspresji w komórkach leczonych CIS w porównaniu z dodatkowym leczeniem HCQ w normoksji.

*Dla każdego terminu przedstawiono liczbę zmienionych genów po lewej stronie słupków wykresu oraz skorygowaną wartość P po prawej stronie.*

Podczas analizy genów o zwiększonej w obu warunkach tlenowych wykazano ich nadreprezentację w pięciu terminach bazy KEGG. Należą do nich: interakcja ECM-receptor (7 DEGs), ścieżka sygnalizacyjna p53 (5 DEGs), zakażenie wirusem

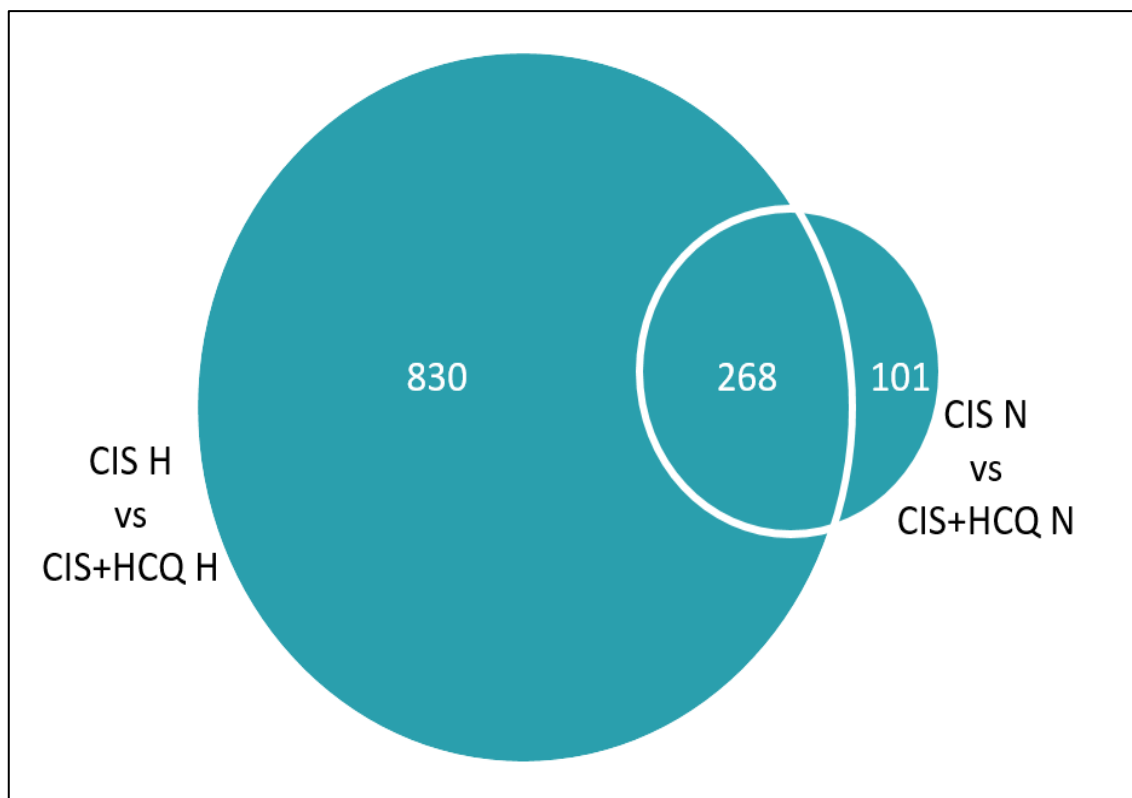
brodawczaka ludzkiego (10 DEGs), adhezja ogniskowa (7 DEGs) oraz ścieżka sygnałowa PI3K-Akt (9 DEGs) (Ryc. 4.33.).



**Ryc. 4.33. Analiza terminów bazy KEGG wśród genów o zwiększonej ekspresji w komórkach leczonych CIS w porównaniu z dodatkowym leczeniem HCQ w obu warunkach tlenowych.**

*Dla każdego terminu przedstawiono liczbę zmienionych genów po lewej stronie słupków wykresu oraz skorygowaną wartość P po prawej stronie.*

Następnie przeanalizowano geny o zmniejszonej ekspresji w komórkach leczonych CIS względem komórek po dodatkowym leczeniu HCQ. Tak jak poprzednio, najwięcej DEGs wystąpiło w niedotlenieniu (830), 101 w normoksji, natomiast 268 wspólnych dla obu warunków tlenowych (Ryc. 4.34.).

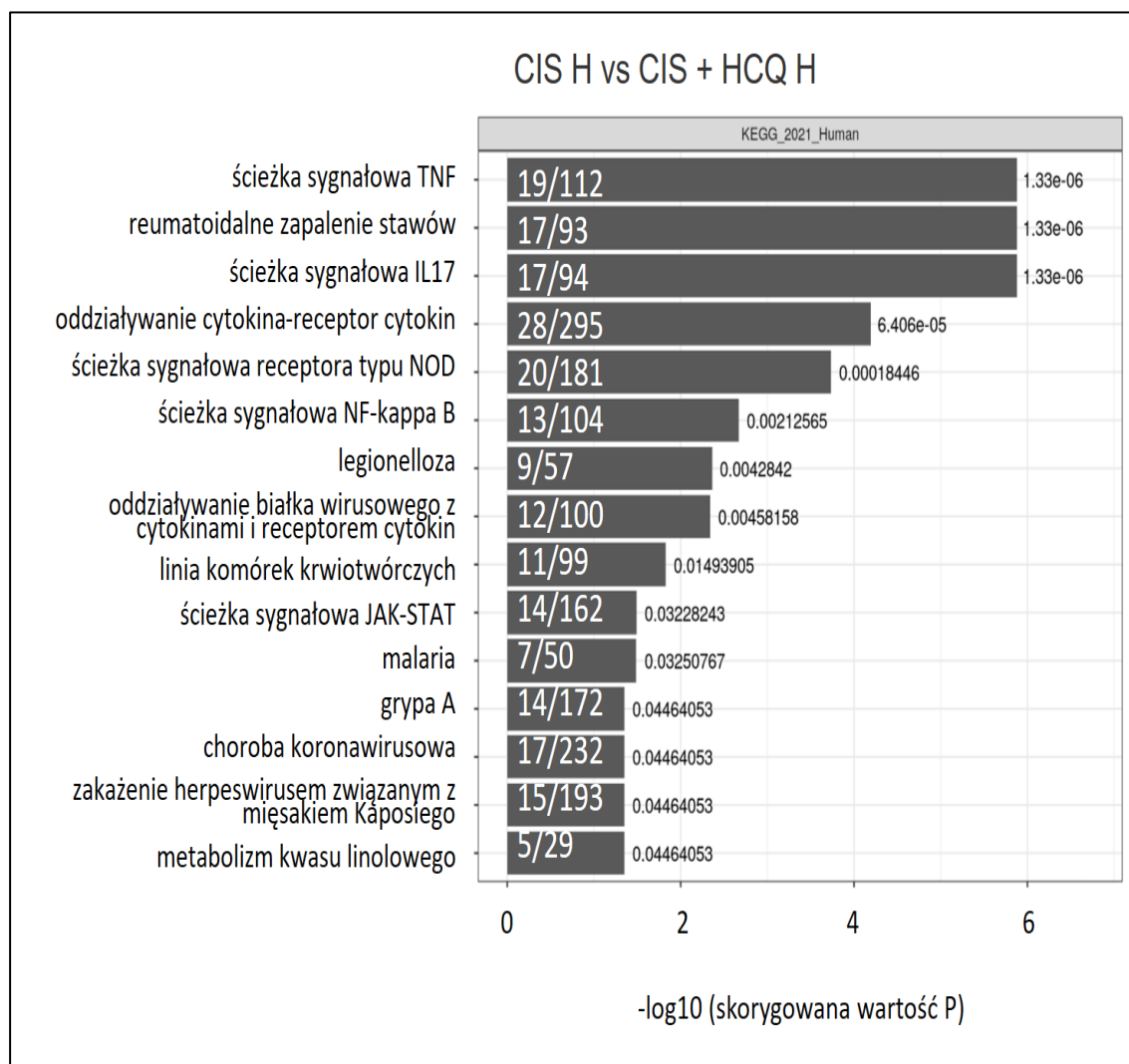


**Ryc. 4.34. Diagram Venna genów o zmniejszonej ekspresji komórek leczonych CIS w porównaniu z dodatkowym leczeniem HCQ w hipoksji i normoksji.**

Po lewej stronie przedstawiono liczbę genów o zmniejszonej ekspresji dla komórek leczonych CIS w hipoksji (CIS H) w porównaniu z komórkami traktowanymi dodatkowo HCQ (CIS+HCQ H), a po prawej dla komórek leczonych w normoksji.

Wśród genów o obniżonej ekspresji w komórkach poddanych terapii CIS w porównaniu do komórek dodatkowo leczonych HCQ podczas niedotlenienia wystąpiła ich nadreprezentacja w piętnastu istotnych statystycznie terminach z bazy KEGG (Ryc. 4.35.). Należą do nich terminy związane z infekcjami: legionelloza (9 DEGs), oddziaływanie białka wirusowego z cytokinami i receptorem cytokin (12 DEGs), malaria (7 DEGs), grypa A (14 DEGs), choroba koronawirusowa - COVID-19 (17 DEGs) oraz zakażenie herpeswirusem związanym z mięsakiem Kaposiego (15 DEGs). Wykryte terminy odnosiły się również do układu immunologicznego i reakcji zapalnej: reumatoidalne zapalenie stawów (17 DEGs), ścieżka sygnałowa IL17 (17 DEGs), oddziaływanie cytokina-receptor cytokin (28 DEGs), linia komórek krwiotwórczych (11 DEGs), ścieżka sygnałowa receptora typu NOD (20 DEGs), Zmiany dotyczyły również szlaków transdukcji sygnału: ścieżka sygnałowa TNF (19 DEGs), ścieżka sygnałowa NF-kappa B (13 DEGs) czy ścieżka sygnałowa JAK-STAT

(14 DEGs). Powszechnie znane jest przeciwdrobnoustrojowe działanie HCQ, a także jej wpływ na łagodzenie chorób immunologicznych takich jak reumatoidalne zapalenie stawów [211]. Jednakże wzmożona aktywność genów związanych z terminami dotyczącymi chorób zakaźnych, czy układu immunologicznego wystąpiła jedynie w niedotlenieniu.

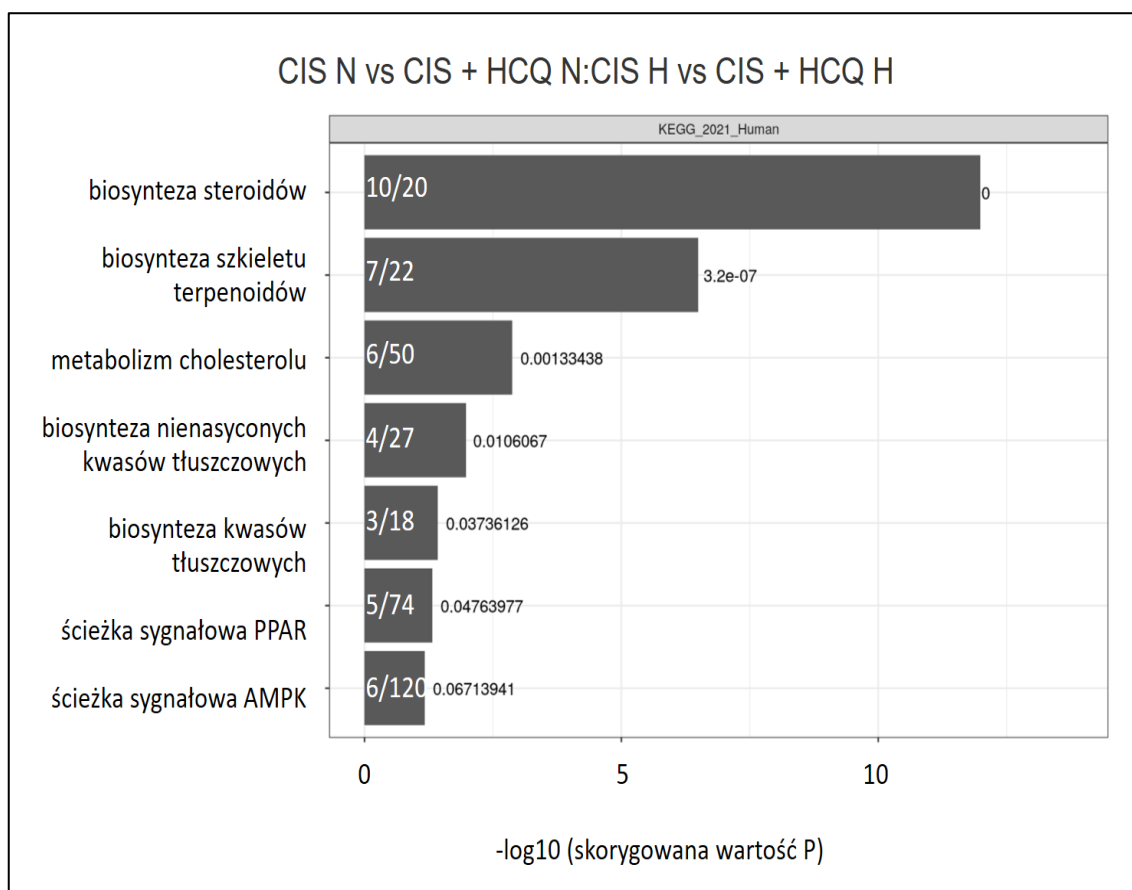


**Ryc. 4.35. Analiza terminów bazy KEGG wśród genów o zmniejszonej ekspresji w komórkach leczonych CIS w porównaniu z dodatkowym leczeniem HCQ w hipoksji.**

Dla każdego terminu przedstawiono liczbę zmienionych genów po lewej stronie słupków wykresu oraz skorygowaną wartość P po prawej stronie.

Podczas analizy genów o obniżonej ekspresji, żaden z terminów nie był istotny statystycznie w normoksji. Natomiast terminy istotne dla obu warunków tlenowych dotyczyły głównie szlaków metabolicznych: biosyntezy steroidów (10 DEGs), szkieletu

terpenów (7 DEGs), kwasów tłuszczowych (4 DEGs) i nienasyconych kwasów tłuszczowych (3 DEGs) oraz metabolizmu cholesterolu (6 DEGs). Ponadto zmiany były związane również z terminami ścieżek sygnałowych PPAR (5 DEGs) oraz AMPK (6 DEGs) (Ryc. 4.36).



**Ryc. 4.36. Analiza terminów bazy KEGG wśród genów o zmniejszonej ekspresji w komórkach leczonych CIS w porównaniu z dodatkowym leczeniem HCQ w obu warunkach tlenowych.**

Dla każdego terminu przedstawiono liczbę zmienionych genów po lewej stronie słupków wykresu oraz skorygowaną wartość P po prawej stronie.

Podsumowując, analiza NGS wykazała zmiany ekspresji wielu genów w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuca leczonych CIS po dodatkowym traktowaniu HCQ, zwłaszcza w warunkach niedotlenienia. W kontekście zahamowania ucieczki od starzenia szczególnie istotne wydaje się zmniejszenie ekspresji genów związanych z cyklem komórkowym, replikacją oraz naprawą DNA po traktowaniu HCQ. Dodatkowo wykryto szereg zmian pod wpływem HCQ w niedotlenieniu dotyczących wzrostu ekspresji genów związanych z układem immunologicznym i reakcją zapalną. Jednakże otrzymane wyniki wymagają weryfikacji z użyciem innych metod analizy

---

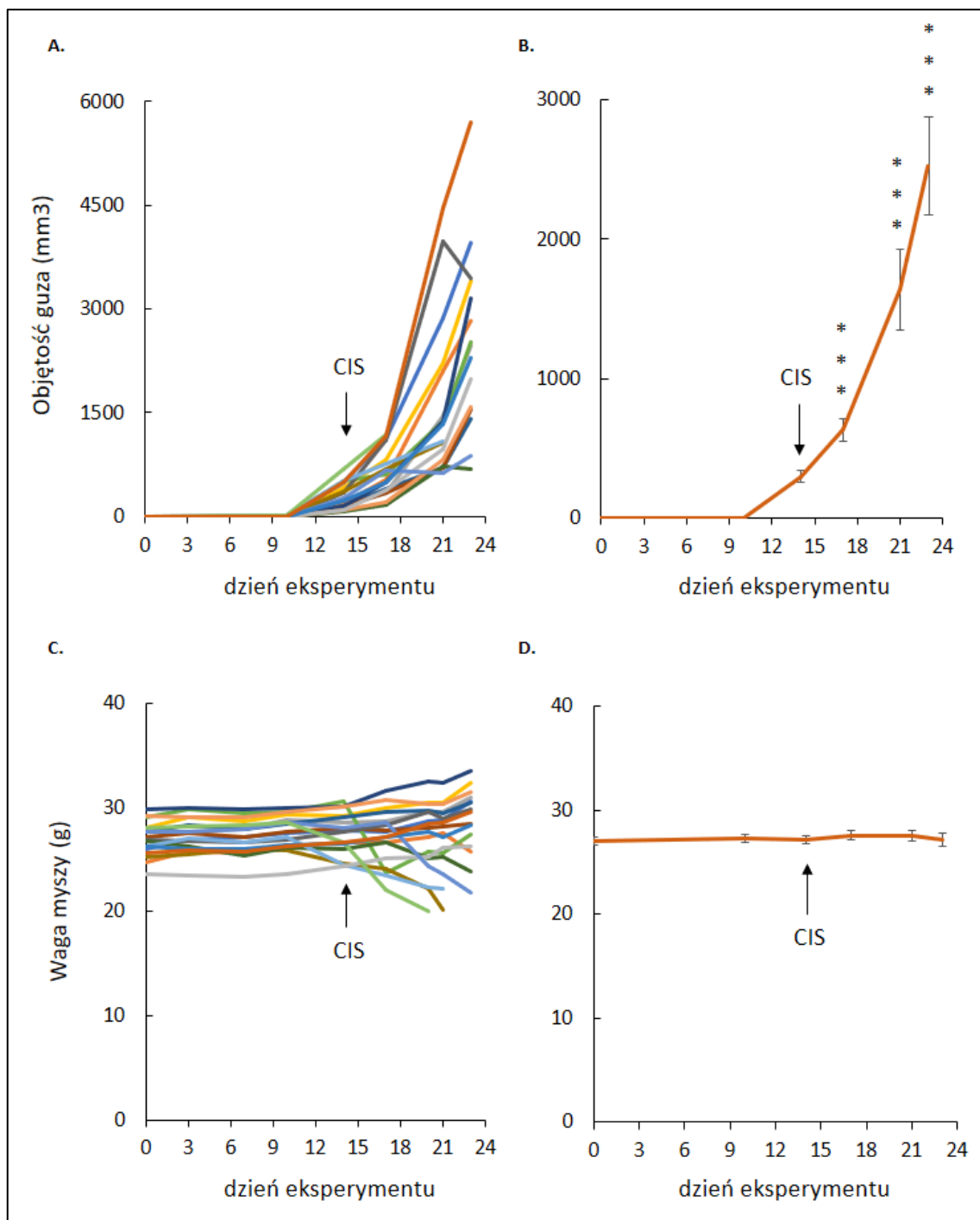
ekspresji genów takich jak RT-PCR, a także pogłębionych badań skutków traktowania HCQ w dłuższej perspektywie czasowej.

#### **4.8 Eksperyment pilotażowy *in vivo***

Aby zweryfikować tezę, że HCQ jest w stanie zahamować wzrost guza oraz poprawić wyniki terapii CIS *in vivo* zaprojektowano eksperyment na syngenicznym mysim modelu raka płuca. W tym celu samce szczepu C57BL/6J zaszczepiono mysimi komórkami raka płuca linii LLC1 (100 tys. komórek/mysz). Następnie po pojawieniu się guzów rozpoczęto leczenie CIS w schemacie co 3 dni. Co ciekawe, u dwóch osobników (co stanowiło 10% wszystkich zwierząt) guzy się nie pojawiły. Z tego powodu myszy te zostały wyłączone z analizy. Po 3 tygodniach leczenia CIS zaplanowano rozdział myszy do grup, z których jedna miała otrzymywać HCQ. Jednakże ze względu na gwałtowny wzrost guzów (Ryc. 4.37 A) ze względów etycznych eksperyment zakończono wcześniej, zanim doszło do planowanego podania HCQ. Średnia objętość guzów w trakcie leczenia CIS była istotnie wyższa niż objętość w dniu podania pierwszej dawki CIS, świadcząc o nieskuteczności zastosowanej terapii (Ryc. 4.37 B). U niektórych osobników masa ciała uległa spadkowi po terapii CIS (Ryc. 4.37. C), jednakże średnie wartości masy myszy po leczeniu CIS w kolejnych dniach eksperymentu (Ryc. 4.37. D) nie ulegają spadkowi, co może wynikać ze wzrostu objętości, a więc i masy samego guza.

Reasumując, w przedstawionych tu eksperymentach *in vivo* nie doszło do skutecznego zahamowania wzrostu guzów po podaniu CIS. Efekt ten może być spowodowany obserwowaną *in vitro* ucieczką od starzenia komórek traktowanych tym lekiem w warunkach niedotlenienia. Jednakże potwierdzenie tej hipotezy wymaga pogłębionych analiz. Dodatkowo opracowanie modelu *in vivo* do oceny znaczenia HCQ dla starzenia oraz ucieczki od starzenia się komórek NDRP pod wpływem CIS wymaga dopracowania, szczególnie w aspekcie schematu podawania chemioterapii skutecznie hamującej wzrost guza.





**Ryc. 4.37** Wpływ leczenia CIS na objętość i masę guzów.

Wykres objętości guzów w którym każda linia prezentuje wartość dla jednego osobnika (A) oraz wartość średnią (B) dla wszystkich zwierząt leczonych CIS. Wykres wagi myszy w którym każda linia prezentuje wartość dla jednego osobnika (C) oraz wartość średnią (D) dla wszystkich zwierząt leczonych CIS (+/- SEM, N=15-18). Za statystycznie istotne uznano  $P < 0,05$ , przy czym: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  porównując do dnia 14, w którym podano pierwszą dawkę CIS.

#### 4.9 Markery niedotlenienia i macierzystości w guzach od pacjentów z NDRP

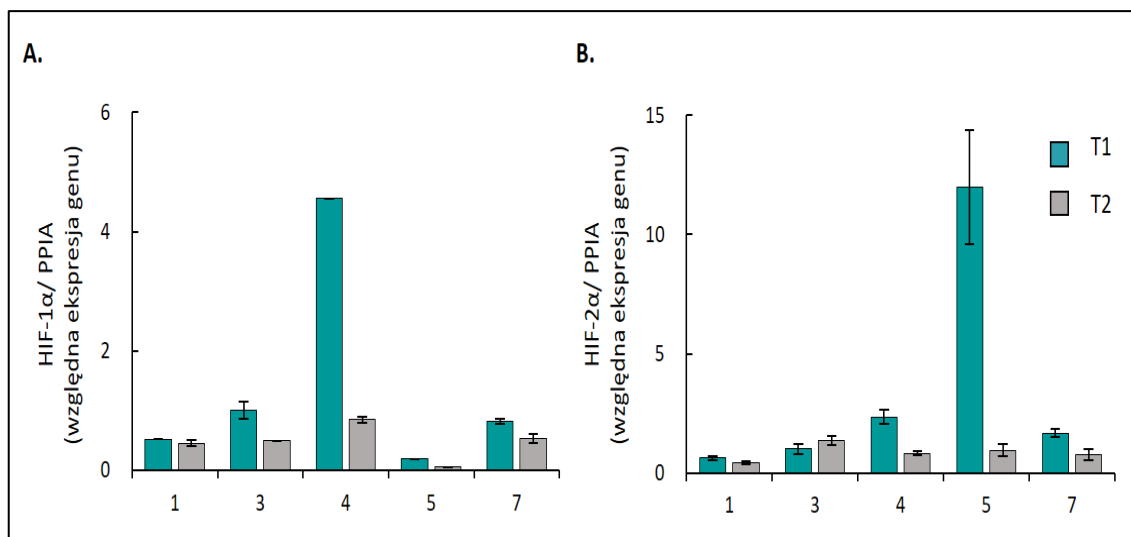
Ponieważ hipoksja okazała się czynnikiem indukującym ucieczkę przed starzeniem komórek raka płuca poddanych działaniu ciplatyny zbadano ekspresję markerów niedotlenienia w guzach pobranych od pacjentów z rakiem płuca. W tym celu od pięciu pacjentów pobrano po 2 wycinki guza podczas resekcji chirurgicznej. Następnie z homogenatów tkankowych wyizolowano RNA, przeprowadzono odwrotną transkrypcję oraz ilościowy PCR w czasie rzeczywistym z użyciem sond typu TaqMan.

Nazwa próbki	Stężenie ng/ $\mu$ l	260/230	260/280
1 T1	<b>693,54</b>	1,30	1,96
1 T2	<b>2196,77</b>	1,86	2,09
3 T1	<b>2395,27</b>	1,82	1,91
3 T2	<b>1380,77</b>	1,92	2,06
4 T1	<b>103,23</b>	0,79	2,02
4 T2	<b>211,46</b>	1,24	1,95
5 T1	<b>94,62</b>	0,79	1,88
5 T2	<b>523,00</b>	1,60	1,98
7 T1	<b>697,62</b>	1,82	2,02
7 T2	<b>741,31</b>	1,75	1,94

**Tab. 4.2. Charakterystyka RNA wyizolowanego z guzów od pacjentów z NDRP użytego do odwrotnej transkrypcji.**

*Do charakterystyki wyizolowanego RNA zastosowano spektrofotometryczny pomiar stężenia i czystości poprzez współczynniki absorbancji 260/230 oraz 260/280.*

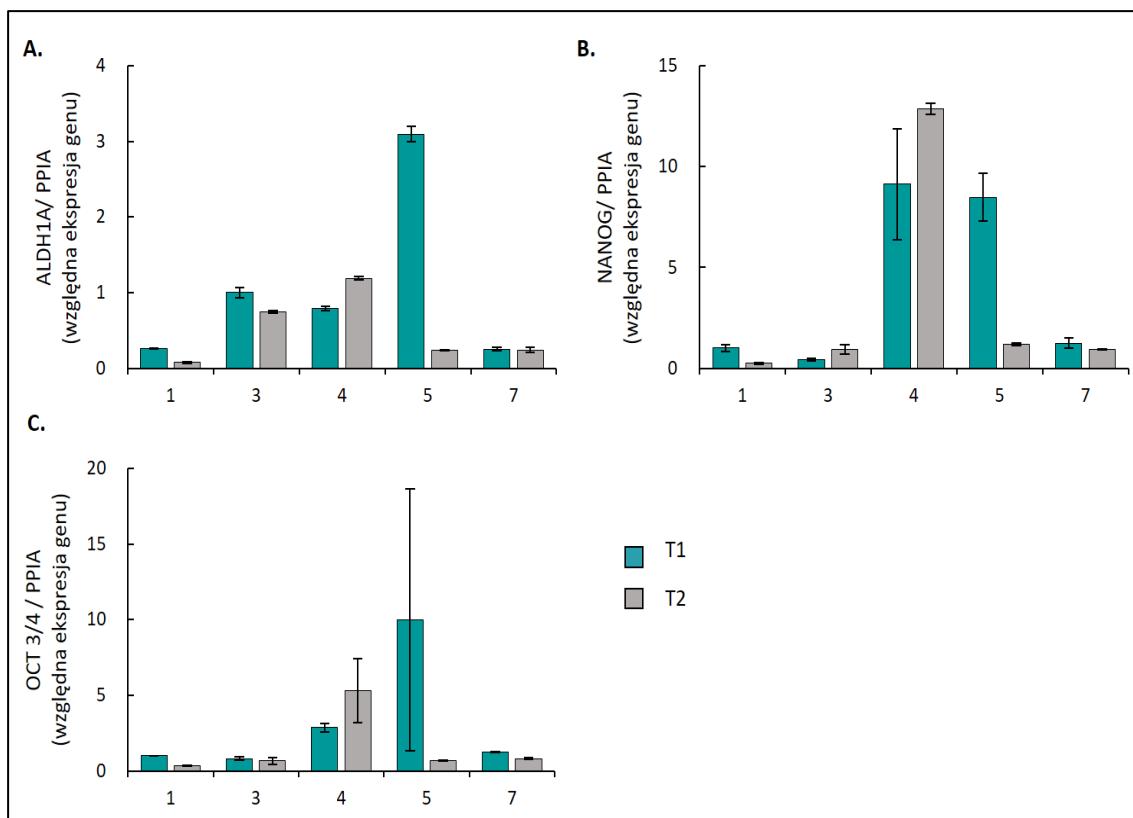
Podczas analizy ekspresji genów HIF okazało się, że najwyższa obserwowana ekspresja wystąpiła w innych próbkach dla obu genów - dla HIF-1 była to próbka 4T1 (Ryc. 4.38. A), natomiast dla genu HIF-2 najwyższą ekspresję zaobserwowano w 5T1 (Ryc. 4.38.). U wszystkich pacjentów przynajmniej jeden z dwóch badanych genów HIF był wyższy w próbce T1. Analizując badane geny pod kątem heterogenności guza dla genu HIF-1, największe różnice zaobserwowano pomiędzy próbkami od pacjenta 3, 4 i 5, natomiast w przypadku genu HIF-2- 4, 5 i 7.



**Ryc. 4.38. Analiza ekspresji genów związanych z niedotlenieniem w tkankach pacjentów z rakiem płuc.**

*Ekspresja genu HIF-1 (A) oraz HIF-2 (B) u pacjentów z NDRP. Cyfry oznaczają kolejnych pacjentów z NDRP, T1 – pierwszy fragment guza, T2 – drugi fragment guza.*

Przeanalizowano również ekspresję trzech genów związanych z macierzystością: ALDH1A, NANOG oraz OCT-3/4 (Ryc. 4.39.). Wszystkie geny wykazywały podwyższoną ekspresję w obu fragmentach guza pobranych od pacjenta 4 oraz w pierwszym fragmencie od pacjenta 5 (5T1). Różnice w poziomie ekspresji genów pomiędzy fragmentami guzów zaobserwowano głównie u pacjenta 1 (1T1 vs 1T2) oraz u pacjenta 5 (5T1 vs 5T2). Ponadto można zauważyć, że spośród próbek pobranych od pięciu pacjentów w trzech z nich występuje korespondencja z markerami niedotlenienia- dla markera ALDH1A u pacjentów 1, 3 i 5, natomiast dla NANOG i OCT3/4 u pacjentów 1,5 i 7.



**Ryc. 4.39. Analiza ekspresji genów związanych z macierzystością w tkankach pacjentów z rakiem płuc.**

Ekspresja genu *ALDH1A* (A), *NANOG* (B) oraz *OCT-3/4* (C) u pacjentów z NDRP. Cyfry oznaczają kolejnych pacjentów z NDRP, T1 – pierwszy fragment guza, T2 – drugi fragment guza.

Podsumowując, u części pacjentów wykazano zróżnicowaną ekspresję czynników indukowanych hipoksją w obu badanych próbkach, wskazując na heterogenność guzów. Ponadto ekspresja genów HIF częściowo korespondowała z ekspresją markerów macierzystości, potwierdzając rolę niedotlenienia w promowaniu macierzystego fenotypu komórek raka płuca. Wyniki te w połączeniu z wnioskami z eksperymentów *in vitro* wskazują, że zasadnym jest badanie markerów niedotlenienia w guzach od pacjentów z rakiem płuca przed podaniem chemioterapii opartej o leki platynowe. Wykrycie u pacjentów niedotlenionych obszarów guza może sugerować niepowodzenie takiej terapii w związku z możliwą ucieczką przed starzeniem oraz rozwojem fenotypu macierzystego.

---

## 5 Dyskusja

Niedotlenienie jest istotną cechą mikrośrodowiska guza związaną ze zwiększoną proliferacją i metabolizmem komórek nowotworowych oraz upośledzoną funkcją naczyń odpowiedzialnych za zaopatrzenie w tlen [212]. Efektem tego zjawiska jest niedotlenienie, mające istotne znaczenie w rozwoju chemooporności nowotworów oraz niepowodzeniach terapeutycznych [213]. Przez wiele lat celem leczenia przeciwnowotworowego było zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych na drodze starzenia komórkowego, jednakże stwierdzono, że stare komórki nowotworowe mogą powracać do aktywności proliferacyjnej, przyczyniając się do nawrotu choroby odpornej na terapię [214, 215]. Niewiele doniesień łączy hipoksję ze starzeniem się komórek [216], co jest spowodowane między innymi pomijaniem aspektu niedotlenienia w badaniach *in vitro*. Dlatego też celem pracy było zbadanie wpływu niedotlenienia na wywołane terapią starzenie się komórek raka płuc, a także modulacji metabolizmu beztlenowego oraz autofagii na starzenie się komórek w tych warunkach.

Główne wnioski otrzymane z przeprowadzonych badań są następujące: a) hodowle komórek raka płuca wykazywały wyższą oporność na cisplatinę w warunkach niedotlenienia niż w normoksji; b) po ekspozycji na niedotlenienie, komórki raka płuc uciekły przed starzeniem się indukowanym cisplatiną, opartego na ścieżce sygnałowej p53/p21; c) hamowanie autofagii przez HCQ zmniejszyło ucieczkę przed starzeniem się komórek raka płuca leczonych cisplatiną w niedotlenieniu, d) w niedotlenionych komórkach traktowanych cisplatiną HCQ powodowała zróżnicowany wpływ na ekspresję markerów macierzystości - niektóre z nich ulegały zmniejszeniu, a inne pozostawały bez zmian, e) analizy NGS wykazały, że w komórkach raka płuc poddanych działaniu cisplatiny i ekspozowanych na niedotlenienie HCQ wywołała obniżenie ekspresji genów odpowiedzialnych za cykl komórkowy oraz naprawę DNA, natomiast zwiększała związane z odpowiedzią na infekcję oraz z układem immunologicznym i reakcją zapalną, co może stanowić ryzyko progresji nowotworu, f) w modelu *in vivo* CIS nie zahamowała wzrostu guzów, co może wynikać z obserwowanej *in vitro* ucieczki przed starzeniem podczas leczenia CIS w niedotlenieniu. Jednakże weryfikacja tej hipotezy wymaga pogłębionych badań. Dodatkowo model do oceny skuteczności HCQ w zahamowaniu ucieczki komórek przed starzeniem wymaga dopracowania w aspekcie podawania chemioterapii w celu lepszej kontroli wzrostu guzów, g) guzy gruczolakoraka płuc wykazały heterogenność pod względem niedotlenienia oraz fenotypu macierzystego. Niedotlenione obszary guza

---

mogą wiązać się z niepowodzeniem chemioterapii opartej na lekach platynowych w wyniku ucieczki komórek przed starzeniem.

Cisplatyna (CIS) jest lekiem stosowanym od lat w leczeniu różnych typów nowotworów, w tym raka płuca. CIS działa między innymi poprzez zaburzenie struktury DNA, tworząc addukty oraz pęknięcia pojedynczej lub podwójnej nici. Ze względu na zdolność sieciowania zasad purynowych CIS zaburza systemy naprawcze DNA, wywołując zatrzymanie cyklu komórkowego oraz apoptozę [27, 217, 218]. Wszystkie te mechanizmy mogą wpływać na chemooporność komórek rakowych w warunkach niedotlenienia. Dane literaturowe wskazują, że hipoksja odgrywa rolę w oporności komórek niedrobnokomórkowego raka płuca na czynniki uszkodzające DNA, w tym na cisplatynę [219-224]. Istnieją również doniesienia łączące oporność na leki platynowe ze starzeniem się komórek [225], przy czym rola niedotlenienia w indukcji starzenia się komórek pod wpływem cisplatyny w dużej mierze pozostaje nieznana.

W badaniach zaprezentowanych w niniejszej rozprawie zaobserwowano, że ludzkie (A549) i mysie (LLC1) linie komórkowe raka płuca cechowały się zwiększoną opornością na cisplatynę w warunkach niedotlenienia niż podczas standardowej hodowli normoksyjnej. Co więcej, leczenie cisplatyną indukowało starzenie komórkowe, cechujące się między innymi przejściem komórek do stanu nabłonkowego. Niedotlenienie odwróciło ten fenotyp, prowadząc do ucieczki przed starzeniem. Analiza liczby komórek wykazała, że istotny wzrost liczby komórek w niedotlenieniu można zaobserwować dopiero w punkcie końcowym eksperymentu. Wynik ten sugeruje, że ucieczkę przed starzeniem w hipoksji poprzedzało zahamowanie proliferacji komórek, jednak określenie dokładnego etapu starzenia w którym dochodzi do obserwowanej ucieczki wymaga pogłębionych badań. Chemooporności w niedotlenieniu towarzyszyło osłabienie sygnalizacji głównego szlaku starzenia, p53/p21, co potwierdziły eksperymenty z nutliną-3 (NUT). Akumulacja białka p53 w efekcie działania NUT w komórkach raka płuca traktowanych CIS w hipoksji powodowała zahamowanie ucieczki od starzenia. Objawem tego było zahamowanie proliferacji komórek na skutek wzmożonej sygnalizacji p53/p21.

Obserwacja ta jest zgodna z badaniem Rohwer i współpracowników, w którym stwierdzono, że aktywacja czynnika indukowanego hipoksją  $1\alpha$  (HIF-1  $\alpha$ ) powodowała zmniejszenie starzenia się komórek w wyniku obniżenia ekspresji p53 i p21 w raku

---

żołądka leczonym cisplatyną. Co więcej, wyciszenie HIF-1 $\alpha$  za pomocą interferencji RNA uwrażliwiało komórki nowotworowe na chemioterapię [225]. Dodatkowo mezenchymalne komórki zrębowe (ang. Mesenchymal Stromal Cells, MSC) były mniej wrażliwe na uszkodzenia genotoksyczne w warunkach niedotlenienia. Obserwowanej oporności towarzyszyło obniżenie prostarzeniowej sygnalizacji p53/p21, a także zmniejszenie akumulacji komórek w fazie G2/M cyklu komórkowego. Co więcej, MSC z wyciszonym za pośrednictwem metody shRNA p53 cechowały się wzrostem ekspresji cykliny B i cdc-2 oraz zmniejszonym zahamowaniem cyklu komórkowego. Jednakże w tym przypadku wyciszenie p53 nie miało wpływu na zmianę oporności na cisplatynę [226]. Rola białka p53 w oporności komórek nowotworowych w niedotlenieniu została zaprezentowana również w badaniach na komórkach raka jajnika. Autorzy tej pracy zastosowali topotekan w celu zahamowania translacji HIF-1 $\alpha$ , co skutkowało wzrostem ekspresji białka p53 i w konsekwencji uwrażliwiało komórki na CIS [227]. Przeciwnie do prezentowanych tu wyników Guo i współpracownicy zaobserwowali wzrost ekspresji białek p53 i p21 pod wpływem niedotlenienia czemu towarzyszyła oporność na CIS [228]. Wyjaśnieniem tej rozbieżności może być fakt, że eksperymenty tej grupy badawczej były prowadzone w krótkiej perspektywie czasowej.

Wyniki uzyskane z badań komórek traktowanych uszkodzającą DNA cisplatyną porównano z danymi otrzymanymi z komórek traktowanych lekami zaburzającymi dynamikę mikrotubul. Docetaksel (DOC) to taksan drugiej generacji, którego mechanizm działania polega na hamowaniu fizjologicznej depolimeryzacji i rozpadu mikrotubul poprzez wiązanie i stabilizację tubuliny. Skutkiem działania DOC jest zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M prowadzące do śmierci komórki [229]. Innym badanym tu lekiem jest vinorelbina (VIN) należąca do alkaloidów vinca, która wiążąc się z tubuliną, zapobiega jej dołączaniu do mikrotubuli, promując jej depolimeryzację [230]. Oba leki powodują zatrzymanie cyklu komórkowego w wyniku zaburzenia funkcji mikrotubul.

Wykazano tu, że zarówno DOC, jak i VIN indukowały starzenie się komórek raka płuca A549 w normoksji i hipoksji, ale nie było znaczących różnic w oporności na lek w żadnym z tych warunków tlenowych. Przedstawione w rozprawie doświadczenia *in vitro* sugerują, że zarówno VIN jak i DOC są silniejszymi induktorami starzenia niż CIS. Obserwowana indukcja starzenia zachodziła już przy nanomolowych stężeniach trucizn mikrotubul, podczas gdy w przypadku CIS były to stężenia mikromolowe.

---

Dodatkowo oba leki z tej grupy hamowały ucieczkę przed starzeniem się skuteczniej niż CIS. Chociaż nie stwierdzono zmian fenotypowych związanych z ucieczką ze starzenia, zmniejszeniu uległa ekspresja białek p21 i E-kadheryny po ekspozycji na hipoksję komórek leczonych DOC, co może sugerować bardzo wczesny etap ucieczki przed starzeniem.

Dane literaturowe dokumentują, że DOC powoduje starzenie się komórek nowotworowych, a zahamowanie tego procesu wywołuje oporność na lek w warunkach normoksyjnych [231, 232]. Ponadto szereg prac prezentuje, że HIF-1 $\alpha$  może zwiększać oporność na leki celujące w równowagę mikrotubul [233-236], jednakże nie ma jednoznacznych dowodów łączących ten efekt z TIS. Na przykład badania dotyczące chemooporności w raku płuca wykazały, że HIF-1 $\alpha$  zwiększał oporność na winorelbinę poprzez wzrost ekspresji anhidrazy węglanowej IX, transbłonowego białka neutralizującego kwasicę wewnątrzkomórkową indukowaną przez metabolizm beztlenowy [236]. Inny mechanizm chemooporności na trucizny mikrotubul w hipoksji przedstawiono w najnowszym badaniu przeprowadzonym na komórkach potrójnie negatywnego raka piersi. W niedotlenieniu obserwowano wzrost ekspresji surwiwiny, będącej białkiem związanym z przeżyciem komórek. Autorzy zidentyfikowali szlak HIF-1 $\alpha$ /miR-494/surwiwina jako odpowiedzialny za oporność na docetaksel [237]. Surwiwina została zidentyfikowana również jako białko współdziałające z cdc-2/cdk1 w hamowaniu apoptozy po chemioterapii i promowaniu ucieczki przed starzeniem się [238]. Badania innej grupy wykazały skuteczność tanshinonu IIA, lipofilowego składnika korzenia szalwi czerwonej, w zmniejszeniu oporności na docetaksel poprzez obniżenie ekspresji HIF-1 $\alpha$  w komórkach raka piersi. Obserwowanemu zwiększeniu wrażliwości komórek na lek towarzyszyło zmniejszenie ekspresji markerów EMT [239]. Podobny efekt wykazała grupa badawcza stosująca propofol (2,6-diizopropylofenol), będący również związkiem zmniejszającym ekspresję HIF-1 $\alpha$ . Propofol odwracał wywołaną hipoksją oporność na DOC w raku prostaty, czemu towarzyszyło zmniejszenie indukowanej hipoksją EMT, uwrażliwiając komórki nowotworowe na leczenie DOC [240].

Reasumując, prezentowane wyniki wykazały, że badane tu leki należące do trucizn mikrotubul silniej indukują starzenie komórek niedrobnokomórkowego raka płuca niż CIS, a także skuteczniej niż CIS hamują ich ucieczkę przed starzeniem. Dodatkowo wpływ prężności tlenu na ucieczkę przed starzeniem po leczeniu DOC i VIN nie jest tak widoczny jak w przypadku CIS. Niemniej jednak, zmniejszenie ekspresji białka p21



---

oraz E-kadheryny podczas traktowania DOC w niedotlenieniu może wskazywać na bardzo wczesny etap ucieczki komórek przed starzeniem. Jednakże postawiona hipoteza wymaga pogłębionych badań.

Rola Efektu Warburga w oporności na chemioterapię od lat pozostaje tematem zainteresowań naukowców na całym świecie. Jednak związek pomiędzy przeprogramowaniem metabolizmu energetycznego komórek nowotworowych, a indukowanymi glikolizą molekularnymi mechanizmami chemooporności pozostaje niejasny [176]. Światowe badania wskazują na rolę dehydrogenaz mleczanowych w oporności na terapie przeciwnowotworowe [241-243]. Na przykład wykazano związek pomiędzy zmniejszoną ekspresją HIF-1 $\alpha$  wywołaną cetuksymabem, a obniżeniem ekspresji LDHA. W badaniu tym dowiedziono również, że hamowanie LDHA może indukować apoptozę oraz hamować cykl komórkowy opornego na cetuksymab płaskonabłonkowego raka głowy i szyi [241]. Dodatkowo w mysim modelu szpizaka mnogiego wykazano wysoką ekspresję LDHA, która odpowiadała za zwiększoną proliferację oraz wzrost guza. Po wyciszeniu ekspresji LDHA zaobserwowano zmniejszenie proliferacji wraz ze zwiększeniem produkcji ROS, wzmożoną apoptozą i w konsekwencji zahamowaniem wzrostu guza [242]. Z kolei inna grupa wykazała istotną rolę glikolizy w oporności na sorafenib w raku wątrobowokomórkowym poprzez oś circUBE2D2 / miR-889-3p / LDHA. Również w tym przypadku stwierdzono, że zaburzenie osi sygnałowej prowadzącej do obniżenia ekspresji LDHA powodowało zahamowanie wzrostu guza *in vivo* [243].

Ze względu na przedstawioną rolę szlaku glikolitycznego w chemooporności oraz fakt, że nadekspresja LDHA, będącego kluczowym regulatorem szlaku glikolizy została wykryta w zmianach przednowotworowych i nowotworowych u pacjentów z rakiem płuc [244], zbadano rolę hamowania enzymów LDH w przełamaniu zaobserwowanej oporności na cisplatinę w niedotlenieniu. W tym celu zastosowano pojędście hamowania ekspresji LDH z użyciem siLDH oraz ich aktywności z zastosowaniem farmakologicznego inhibitora LDHA - oksamatu sodu (SO). Przedstawione doświadczenia sugerują, że hamowanie glikolizy ma znikomy wpływ na obserwowaną w niedotlenieniu oporność na cisplatinę. W eksperymentach z zastosowaniem wyciszania genów LDHA i LDHB zaobserwowano jedynie nieznaczne obniżenie aktywności metabolicznej w komórkach z jednocześnie wyciszonymi dwoma genami. Należy podkreślić, że zahamowanie ekspresji genów przeprowadzono przed indukcją

---

starzenia komórek. Przeciwnie, farmakologiczny inhibitor SO zaaplikowano na komórki poddane wcześniej chemioterapeutycznej indukcji starzenia. Również w tym przypadku nie stwierdzono efektu hamowania glikolizy na ucieczkę od starzenia komórek poddanych działaniu cisplatyny w niedotlenieniu. Może to wynikać z faktu, że oksamat sodu jest inhibitorem LDHA, a nie innych izoenzymów, z których LDHB jest w stanie kompensować brak LDHA [186, 245]. Ponadto konieczność stosowania wysokich stężeń SO sprawia, że jego potencjalne zastosowanie kliniczne jest istotnie ograniczone [245]. Obserwacje te są zgodne z badaniami Feng i współpracowników, prowadzonymi na komórkach raka jamy ustnej. Wykazali oni, że to obniżenie ekspresji LDHA, a nie jej podwyższenie jest przyczyną oporności na leczenie cisplatyną [246]. Inna grupa w badaniach nad kostniakomięśakiem doszła do przeciwnego wniosku. Autorzy powiązali oporność na cisplatynę ze wzrostem ekspresji LDHA. Dodatkowo wykazali, że transfekcja komórek miR-329-3p, którego celem jest LDHA, uwrażliwiała komórki na leczenie cisplatyną poprzez zmniejszenie ekspresji tego enzymu [247]. Wskazówką, że zaburzony metabolizm glukozy może mieć istotne znaczenie również w przypadku oporności na cisplatynę w niedotlenieniu było badanie komórek płaskonabłonkowego raka jamy ustnej. Badano w nim transporter glukozy GLUT-1 odpowiedzialny za napływ glukozy do komórek, którego wzrost ekspresji zaobserwowano jako odpowiedź na niedotlenienie komórek. Wykazano, że wyciszenie ekspresji GLUT-1 w niedotlenieniu uwrażliwiała komórki HSC-2, Ca9- 22 oraz SAS na leczenie cisplatyną [248].

Podsumowując, w prezentowanych tu badaniach nie wykazano znaczącego wpływu hamowania aktywności dehydrogenaz mleczanowych na obserwowaną oporność na CIS w niedotlenieniu. Tak więc zrozumienie roli metabolizmu glukozy oraz LDH w oporności komórek raka płuca na cisplatynę w niedotlenieniu wymaga dalszych badań.

Zidentyfikowano związek pomiędzy autofagią, a chemoopornością w warunkach hipoksji w kilku typach nowotworów, w tym w oporności na cisplatynę [249, 250]. Na przykład ekspozycja komórek A549 na hipoksję stymulowała indukcję autofagiczną i oporność komórek rakowych na cisplatynę, a hamowanie autofagii z użyciem siRNA LC3B przywróciło wrażliwość komórek rakowych na chemioterapię [251]. Jednak wpływ TIS na nabytą lekooporność i rola hamowania autofagii na starzenie się komórek w warunkach hipoksji nie został szczegółowo zbadany. Jak wykazano w badaniach na

---

komórkach raka jelita grubego i glejaka modulacja autofagii wpływa na ucieczkę komórek przed starzeniem zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Zahamowanie autofagii z zastosowaniem BAF A1 spowodowało zmniejszenie proliferacji komórek raka okrężnicy poddanych wcześniej chemioterapii. Jednakże w dłuższej perspektywie czasowej po odstawieniu inhibitora doszło do reaktywacji tego procesu i wzrostu tempa proliferacji w subpopulacji komórek TIS [105]. Badania te stały się podstawą do zweryfikowania hipotezy, że inhibicja autofagii może powstrzymać ucieczkę przed starzeniem komórek raka płuca traktowanych CIS w niedotlenieniu.

Jak wykazano w przedstawionych powyżej eksperymentach transfekcja komórek raka płuca przy użyciu siRNA przeciwko: ATG5, ATG7 lub Beclin1 przed leczeniem CIS zarówno w normoksji, jak i w hipoksji nie zmieniły ich zdolności do indukcji/ucieczki przed starzeniem. Wynik ten jest zbieżny z otrzymanym przez Saleha i współpracowników, którzy hamowali autofagię z zastosowaniem farmakologicznych inhibitorów autofagii BAF A1/HCQ oraz wyciszania ATG5 z zastosowaniem metody shRNA przed indukcją starzenia [252]. Podczas gdy metoda siRNA polega na wprowadzeniu egzogennych krótkich fragmentów interferującego RNA, w shRNA kwas rybonukleinowy dostarczany jest do komórek za pomocą wektora, który w jądrze komórkowym ulega ekspresji. Dzięki temu wyciszanie RNA z użyciem shRNA daje bardziej trwałe efekty, jednakże zastosowane przez wspomnianych badaczy shRNA przeciwko ATG5 również nie wpłynęło na zdolność komórek nowotworowych do starzenia lub ucieczki z tego stanu [252]. Dlatego następnie zbadano tu wpływ hamowania autofagii na komórki, które wcześniej uległy starzeniu oraz ich zdolność do reaktywacji proliferacji.

Badania zaprezentowane w niniejszej rozprawie wykazały, że HCQ może zapobiegać ucieczce przed starzeniem komórek raka płuc wywołanych niedotlenieniem podczas leczenia CIS. HCQ znacząco zmniejszyła liczbę komórek i ekspresję markerów proliferacji, ale nie zmieniła ekspresji markerów starzenia. Wcześniejsze badania nad komórkami raka okrężnicy i glejaka wskazywały że starzejące się komórki były bardziej odporne na inhibitor autofagii BAF A1 niż te, które nie uległy starzeniu [105]. Z drugiej strony Wakita i współpracownicy wykazali, że aktywacja autofagii z użyciem degradatora białek z rodziny BET prowadzi do eliminacji starzejących się komórek gwiaździstych wątroby na drodze senolizy, ograniczając rozwój raka wątroby [253]. W związku z tym pozostaje niejasne, czy mierzone hamowanie ucieczki przed starzeniem komórek podczas leczenia inhibitorami autofagii wynika ze zmniejszonej

---

zdolności starzejących się komórek rakowych do ponownej aktywacji proliferacji, czy też działaniem na poziomie komórek potomnych.

Kolejną istotną kwestią w badaniu roli HCQ w przezwycięzeniu ucieczki przed starzeniem w niedotlenieniu było sprawdzenie, czy HCQ zmienia ekspresję czynników indukowanych hipoksją. Po podaniu HCQ do komórek raka płuca leczonych CIS zaobserwowano indukcję HIF-2 $\alpha$ , ale nie ekspresję genu HIF-1 $\alpha$ . Ekspresja HIF jest zależna od czasu, a szczyty występują po 24 godzinach w niedotlenieniu. HIF-1 $\alpha$  jest wcześniejszym, a HIF-2 $\alpha$  późniejszym czynnikiem indukowanym przez hipoksję [254, 255]. Zastosowany model badawczy zapewniał długoterminowe warunki eksperymentalne, co mogło być powodem, dla którego nie zaobserwowano wzrostu ekspresji HIF-1 $\alpha$ . Zgodnie z tą obserwacją, Saint-Martin i in. wykazali, że zahamowana autofagia i hamowanie mTOR mogą zwiększać śmierć komórek, a remisja nowotworu była aktywowana tylko w komórkach z wyciszeniem HIF-2 $\alpha$  [256]. Dlatego HCQ poprzez podwyższenie poziomu HIF-2 $\alpha$  może prowadzić do rozwoju oporności wtórnej. Aby to zweryfikować sprawdziliśmy poziom ekspresji nabłonkowego markera E-kadheryny. Wykazaliśmy, że jej ekspresja w traktowanych CIS niedotlenionych komórkach A549 była dodatkowo zmniejszona po traktowaniu HCQ, co sugeruje pojawienie się komórek o fenotypie mezenchymalnym. Fenotyp mezenchymalny jest jedną z cech nowotworowych komórek macierzystych pośredniczącą w zwiększonym potencjale przerzutowym i chemooporności komórek nowotworowych [257, 258]. Dlatego przetestowano również ekspresję kilku markerów macierzystości. Spośród nich HCQ w niedotlenionych komórkach traktowanych cisplatyną powoduje spadek ekspresji genów NANOG i ALDH1A, a także białek NANOG i SOX-2. Zgodnie z tym wykazano, że leczenie innym inhibitorem autofagii BAF A1 komórek raka okrężnicy powodowało spadek ekspresji markerów nowotworowych komórek macierzystych. Jednakże efekt ten okazał się być przejściowy [105]. Ponadto w badaniach nad niedrobnokomórkowym rakiem płuc udowodniono, że cisplatyna powoduje wzrost odsetka komórek dodatnich pod względem markera CD133. Dodatkowo komórki te charakteryzowały się wyższymi poziomami autofagii. Hamowanie tego procesu za pomocą HCQ zmniejszało proporcję nowotworowych komórek macierzystych oraz poprawiało skuteczność leczenia cisplatyną *in vivo* [259]. Co więcej Rahim i współpracownicy wykazali, że komórki glejaka aktywowały autofagię związaną z ATG9A jako mechanizm przeżycia w środowisku hipoksji, a leczenie chlorokiną *in*

---

*vivo* znacząco zwiększało przeżywalność ksenoprzeszczepów pochodzących od pacjentów z glejakiem [260].

Podsumowując, modulowanie autofagii wydaje się pełnić pozytywną rolę w zmniejszeniu fenotypu macierzystego w perspektywie krótkoterminowej. Jednakże jej wpływ na długotrwałe efekty nie jest dostatecznie wyjaśniony, dlatego powinien być przedmiotem dalszych badań.

Działanie HCQ oprócz inhibicji autofagii obejmuje między innymi aktywność przeciwzapalną, immunomodulującą, przeciwmalaryczną oraz przeciwwirusową, które wynikają głównie z alkalizacji lizosomów i endosomów [261]. Ze względu na tak szerokie spektrum działania tego leku przy użyciu wysokoprzepustowej metody sekwencjonowania następczej generacji przetestowano tu globalne efekty leczenia HCQ na ekspresję genów komórek raka płuca leczonych CIS w niedotlenieniu

Przeprowadzone analizy sugerują, że HCQ powoduje obniżenie sygnalizacji związanej z cyklem komórkowym oraz replikacją DNA, co potwierdza wcześniejsze obserwacje dotyczące zmniejszenia ekspresji białek związanych z progresją cyklu komórkowego oraz zmniejszeniem proliferacji tych komórek. Wnioski te są zbieżne z obserwacjami prowadzonymi na mysim modelu raka jelita grubego, w których stwierdzono, że HCQ hamuje wzrost nowotworu poprzez zahamowanie cyklu komórkowego oraz indukcję apoptozy [262]. Dodatkowo badania raka endometrium potwierdziły, że hamowanie autofagii zmniejszało proliferację komórek nowotworowych oraz ich oporność na cisplatynę [263]. Przedstawiona tu analiza wykazała również, że zastosowanie HCQ obniża ekspresję genów metabolizmu aminokwasów argininy i proliny, które wpływają na wzrost proliferacji komórek nowotworowych oraz modulację środowiska guza [208-210]. Arginina biorąc udział w wielu szlakach metabolicznych, zapewnia dostęp do związków niezbędnych dla wzrostu komórek nowotworowych, natomiast zubożenie hodowli w argininę jest w stanie zahamować proliferację komórek nowotworowych oraz wywołać ich śmierć [209, 264, 265]. Dostępność argininy i aktywność arginazy, która katabolizuje hydrolizę argininy są konsekwentnie powiązane z dwoma głównymi mechanizmami pronowotworowymi. Należą do nich synteza NO, poliaminy i proliny, które są związane z progresją nowotworu oraz aktywacja immunologicznych komórek efektorowych, zmniejszając nadzór immunologiczny nad guzem [208]. Ponadto doniesienia naukowe wskazują, że HCQ zakłóca funkcję deiminazy

---

peptydyloargininowej 4 (ang. Peptidyl arginine deiminase 4, PAD4), biorącej udział w konwersji argininy do cytruliny [261, 266]. Wykazano, że działanie PAD4 jest niezbędne do tworzenia neutrofilowych pułapek zewnątrzkomórkowych (ang. Neutrophil extracellular traps, NETs), które mogą zaostrzać agresywność nowotworu poprzez zwiększenie migracji i zdolności inwazji, a także ponowne uruchomienie proliferacji uśpionych komórek nowotworowych [261, 267].

Analiza NGS zaprezentowana w tej rozprawie wykazała również, że wśród genów o obniżonej ekspresji przez HCQ występuje nadreprezentacja genów związanych z rekombinacją homologiczną oraz ścieżką anemii Fanconiego. Oba terminy mają istotne znaczenie w naprawie uszkodzeń DNA [202-205], co bezpośrednio wiąże się z opornością na leki celujące w DNA. Dane literaturowe przedstawiają dowody na znaczenie naprawy DNA w oporności na cisplatynę [268-270]. Na przykład zaobserwowano korelację pomiędzy zwiększoną ekspresją genu ERCC1 (ang. Excision Repair Cross-Complementing 1), odpowiedzialnego za naprawę DNA, a opornością na cisplatynę pacjentek z rakiem jajnika. Dodatkowo interferencja ERCC1 przy użyciu siRNA uwrażliwiła linie komórkowe raka jajnika na leczenie cisplatyną [271]. Jest to zbieżne z wnioskami grupy badającej opornego na cisplatynę raka jajnika linii SKOV3. Po transfekcji rekombinowanym plazmidem shERCC1 komórki wykazywały zwiększoną wrażliwość na cisplatynę, czemu towarzyszyła zwiększona apoptoza oraz zahamowanie proliferacji i zatrzymanie cyklu komórkowego [272]. Podobne obserwacje dotyczące białka ERCC1 otrzymano w badaniach na modelach raka żołądka oraz raka płuc [273, 274]. Dowodem potwierdzającym znaczenie naprawy DNA w oporności na cisplatynę jest również praca dotycząca jądrowego antygenu dzielącej się komórki PCNA (ang. Proliferating Cell Nuclear Antigen). Białko PCNA w komórce jest zaangażowane między innymi w replikację DNA oraz jego naprawę, natomiast zastosowanie inhibitora PCNA hamuje naprawę wiązań krzyżowych oraz wzmacnia pęknięcie podwójnej nici DNA, co uwrażliwiło komórki nowotworowe na cisplatynę [275]. Ponadto w szlaku anemii Fanconiego występują geny FANC, których utrata funkcji powoduje aktywację szlaku DDR i wynikającej z niej aktywację sygnału ATM, p53, p21 i p16. Skutkiem tej aktywacji jest indukcja fenotypu starzeniowego w postaci zahamowania cyklu komórkowego, wzmożonej ekspresji SAHF i aktywności SA- $\beta$ -gal oraz indukcji SASP [276].

Pośród genów o zmniejszonej ekspresji pod wpływem leczenia HCQ w niedotlenieniu znalazły się także geny adhezji ogniskowej, zapewniające połączenia

---

aktywnego szkieletu komórkowego z macierzą zewnątrzkomórkową. Połączenia te kontrolują ruch komórek i są związane z inwazyjnością nowotworu oraz tworzeniem przerzutów [206, 207]. Zgadza się to z obserwacjami grup badawczych, że inhibicja autofagii wpływa na hamowanie adhezji ogniskowej i w konsekwencji zmniejszenie ruchliwości komórek oraz zdolności do tworzenia przerzutów [277, 278]. Wynik ten jest rozbieżny z prezentowanymi tu wnioskami dotyczącymi ekspresji epitelialnej E-kadheryny, która ulegała obniżeniu pod wpływem HCQ w niedotlenionych komórkach raka płuca leczonych CIS, wskazując na sprzyjanie tworzeniu przerzutów po leczeniu HCQ. Dlatego też rola HCQ w metastazie tych komórek w świetle przedstawionych wyników wydaje się być niejednoznaczna i wymaga pogłębionych badań. Co istotne, dane literaturowe wskazują, że w starzejących się komórkach dochodzi do obniżenia ekspresji białek adhezji ogniskowej paksyliny oraz c-Src [279]. Zatem obniżenie ekspresji genów adhezji ogniskowej komórek leczonych HCQ w niedotlenieniu może potwierdzać, że HCQ hamuje ucieczkę przed starzeniem w tych warunkach. Dodatkowo kinaza adhezji ogniskowej (ang. Focal Adhesion Kinase, FAK) poza wzrostem migracji komórek nowotworowych powoduje również indukcję angiogenezy oraz wzrost przepuszczalności naczyń krwionośnych, a także promuje wzrost guza nowotworowego poprzez indukcję immunosupresyjnego środowiska [280, 281]. Co bardzo istotne w kontekście starzenia, FAK poprzez ubikwitynację może promować degradację p53, prowadząc w ten sposób do proliferacji komórek [282]. Zatem obniżenie ekspresji FAK może przyczyniać się do hamowania ucieczki przed starzeniem komórek poprzez hamowanie ich proliferacji.

Zgodnie z analizą bazy KEGG, najbardziej wzbogaconymi szlakami dla genów o wzmożonej ekspresji po zastosowaniu HCQ w niedotlenieniu były geny związane z terminami dotyczącymi infekcji oraz układu immunologicznego i reakcji zapalnej.

Powszechnie znane jest przeciwpatogenne działanie HCQ, a także jego rola w leczeniu chorób immunologicznych takich jak reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) [211]. Do mechanizmów dzięki którym HCQ wykazuje efekt przeciwdrobnoustrojowy należy alkalizacja kwasowych pęcherzyków (lizosomów, endosomów, pęcherzyków Golgiego), powodująca zahamowanie wzrostu niektórych bakterii i grzybów wewnątrzkomórkowych. W przypadku wirusów HCQ powoduje zaburzenia ich wnikania do wnętrza komórki poprzez wzrost pH oraz zmiany potranslacyjnych modyfikacji nowo zsyntetyzowanych białek, szczególnie poprzez hamowanie glikozylacji [211, 283]. Co ciekawe, wzrost ekspresji genów związanych

---

z terminami bazy KEGG dotyczącymi chorób infekcyjnych oraz RZS pod wpływem HCQ zaobserwowano jedynie w warunkach niedotlenienia, co może być związane z obniżonym pH w tych warunkach [284]. Jak wykazano kwaśne pH może wpływać na zmniejszone wnikanie HCQ do komórek, jak również na zmniejszoną zdolność do hamowania autofagii w tych warunkach [285].

Geny, których ekspresja wzrastała pod wpływem HCQ w niedotlenieniu, odnosiły się również do terminów związanych z układem immunologicznym oraz reakcją zapalną. Należą do nich ścieżki sygnałowe IL-17, TNF, NF- $\kappa$ B, receptora typu NOD, czy JAK-STAT.

IL-17 jest cytokiną prozapalną przyczyniającą się do powstania oraz wzrostu nowotworu, a także tworzenia przerzutów [286]. Prozapalna rola IL-17 wiąże się z aktywacją NF- $\kappa$ B, prozapalnych cytokin takich jak TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-6 oraz chemokin, w tym IL-8. Dodatkowo IL-17 indukuje ekspresję metaloproteinaz macierzy (MMPs), powodujących degradację macierzy zewnątrzkomórkowej, co jest związane z EMT i tworzeniem przerzutów [134, 287, 288]. Wykazano, że IL-17 powoduje ogólnoustrojową ekspansję neutrofilii, tłumiących cytotoksyczne limfocyty T CD8+, które ograniczają powstawanie przerzutów u myszy z nowotworem sutka. Natomiast neutralizacja IL-17 zapobiega akumulacji neutrofilii, co w konsekwencji zmniejsza tworzenie przerzutów [289]. Również w próbkach od pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca wykazano, że IL-17 może odgrywać rolę w metastazie raka płuc poprzez promowanie limfangiogenezy [290]. Natomiast w badaniach histopatologicznych stwierdzono, że IL-17 może ułatwiać rozwój raka jelita grubego, indukując angiogenezę poprzez wzrost VEGF [291]. Ponadto stwierdzono korelację pomiędzy wysokim stężeniem IL-17, a słabym przeżyciem pacjentów nowotworowych [290-293]. Co ważne w badaniach komórek śródbłonna naczyniowego wykazano, że IL-17 może indukować starzenie poprzez aktywację szlaku NF- $\kappa$ B/p53/Rb [294].

Inną ścieżką wzbogaconą w geny o zwiększonej ekspresji pod wpływem HCQ w niedotlenieniu jest ścieżka sygnałowa TNF. TNF jest cytokiną o działaniu prozapalnym i immunosupresyjnym, która może promować lub hamować aktywność komórek odpornościowych i komórek rakowych w guzach [295]. Działanie prozapalne tej cytokiny związane jest z indukcją produkcji IL-6, IL-8 oraz prozapalnego fenotypu makrofagów, podczas gdy przeciwzapalna funkcja TNF dotyczy promowania supresyjnej roli limfocytów T regulatorowych [296-298]. Pierwotnie TNF został



---

opisany jako czynnik, który może wywoływać martwicę nowotworu, jednak obecnie wiadomo, że pełni wiele różnych funkcji w biologii raka. Wykazuje efekt przeciwnowotworowy, indukując krwotoczną martwicę guza poprzez działanie prokoagulacyjne, a także błonowy TNF ma bezpośrednie działanie cytotoksyczne na komórki rakowe [299, 300]. Z drugiej strony, wykazano, TNF może działać pronowotworowo poprzez indukcję angiogenezy oraz migracji komórek poprzez wzrost swoistych białek oraz ekspresji NF- $\kappa$ B w komórce [301, 302]. Dodatkowo wykazano, że TNF może wspomagać proliferację komórek nowotworowych oraz zmniejszać nadzór immunologiczny nad nowotworem [303, 304].

Aktywowana przez TNF ścieżka czynnika jądrowego kappa B (Nuclear Factor Kappa B, NF- $\kappa$ B) również została wzbogacona w geny o zwiększonej ekspresji w niedotlenieniu pod wpływem HCQ. NF- $\kappa$ B wpływa na proces onkogenezy poprzez indukcję ekspresji genów biorących udział w proliferacji komórek, przerzutach, angiogenezie i supresji apoptozy [305]. Wykazano, że aktywacja NF- $\kappa$ B wiąże się z procesami onkogennymi guzów litych oraz niekorzystnym rokowaniem w chorobach nowotworowych, w tym raka płuca [306-310]. Dodatkowo sygnalizacja NF- $\kappa$ B jest związana z opornością na chemioterapię [311-313]. Badania nad oporną na cisplatynę linią raka naskórkowego wykazały, że oporność wynika między innymi z aktywacji NF- $\kappa$ B. Natomiast zastosowanie kurkuminy, będącej inhibitorem NF- $\kappa$ B uwrażliwiło komórki na cisplatynę. Było to związane ze zmniejszeniem ekspresji białek antyapoptotycznych Bcl-2, Bcl-xL i surwiwiny, które są regulowane przez NF- $\kappa$ B [313]. Zbieżne wnioski otrzymano z doświadczeń przeprowadzonych na komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc. W porównaniu do wrażliwej na cisplatynę w linii odpornej wykryto zwiększoną ekspresję miR-192, który znacząco zwiększał ilość białka jądrowego i transkrypcyjną aktywację NF- $\kappa$ B, a w konsekwencji hamował apoptozę, zwiększał proliferację i nadawał oporność na cisplatynę. Również w tym przypadku kurkumina zahamowała szlak sygnałowy NF- $\kappa$ B, co odwróciło wpływ nadekspresji miR-192 [311]. Bardzo istotny jest fakt, że sygnalizacja NF- $\kappa$ B jest głównym szlakiem sygnałowym, który stymuluje pojawienie się SASP [314]. Chociaż czynniki SASP mogą pełnić zarówno korzystną jak i negatywną rolę, w tkankach nowotworowych obserwowane są głównie efekty sprzyjające wzrostowi guza w postaci wzmożonej inwazyjności, migracji, sprzyjające tworzeniu przerzutów czy zwiększeniu proliferacji [315]. Wszystkie te niekorzystne aspekty związane z aktywacją ścieżki NF- $\kappa$ B stanowią

---

potencjalne ryzyko dla wspomagania leczenia raka płuca hamowaniem autofagii z użyciem HCQ.

Inną ścieżką której geny wykazują wzmożoną ekspresję pod wpływem HCQ w niedotlenieniu jest ścieżka receptora typu NOD (ang. Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like Receptors, NLR). Receptory typu NOD reprezentują grupę sygnalizacyjnych regulatorów zaangażowanych między innymi w odpowiedź zapalną, onkogenezę, macierzystość oraz starzenie się komórek. Na przykład NLRP6 znacząco hamuje proliferację komórek raka żołądka poprzez zatrzymanie przejścia komórek z fazy G1 do S, związanego ze starzeniem komórkowym zależnym od p53 [316]. Aktywacja receptorów NLR powoduje nadmierne wydzielanie cytokin i chemokin, wpływających na proliferację, różnicowanie, inwazję i migrację komórek nowotworowych. Między innymi IL-1 i IL-6 mogą działać stymulująco na wzrost komórek, niektóre chemokiny z rodziny CXC (CXCL1-3, CXCL5-8 i CXCL 12) wykazują aktywność proangiogenną, natomiast wiele chemokin CC i TNF indukuje produkcję proteaz związanych z inwazyjnością i przerzutowaniem [317, 318]. Ponadto molekuly NOD1 i NOD2 mogą indukować autofagię poprzez rekrutację białek ATG [319]. Może to się wiązać z późniejszą reaktywacją autofagii, co zaobserwowano w starzejących się komórkach raka jelita grubego po zahamowaniu autofagii bafilomycyną 1A. Dodatkowo badanie to wykazało, że ucieczce przed starzeniem komórek raka jelita grubego towarzyszyło przejście do stanu mezenchymalnego (EMT) [105]. W modelu raka płaskonabłonkowego głowy i szyi wykazano, że NLRP3 promuje zdolność tworzenia sfer i kolonii wraz ze wzrostem ekspresji macierzystych ALDH1 i CD44. Dodatkowo blokada NLRP3 przez inhibitor MCC950 odwraca ten efekt [320]. Inna praca pokazała, że silna ekspresja NLRP3 prowadzi do promowania migracji i tworzenia przerzutów raka jelita grubego [321]. Istnieje zatem ryzyko, że terapia skojarzona cisplatyny i HCQ w niedotlenieniu może promować rozwój fenotypu macierzystego oraz przerzutów w perspektywie długoterminowej.

Przedstawiona tu analiza wykazała nadreprezentację genów związanych z sygnalizacją JAK-STAT (ang. Janus kinase-signal transducer and activator of transcription) w komórkach leczonych CIS i HCQ w niedotlenieniu. Białka STAT są mieczem obosiecznym w kontekście raka, ponieważ z jednej strony zostały powiązane z inicjacją i progresją guza (STAT3 i STAT5), z drugiej natomiast są częścią obrony przeciwnowotworowej (STAT1 i STAT2). Pronowotworowa aktywność białek STAT opiera się na stymulacji chemokin i cytokin oraz czynników wzrostu, promując wzrost

---

nowotworu oraz powstawanie przerzutów. Natomiast proimmunogenna funkcja białek STAT związana jest z indukcją interferonu, uznanego za kluczowy mediator odporności przeciwnowotworowej [322]. W modelu szpizaka mnogiego zaobserwowano, że indukcji autofagii towarzyszyło hamowanie szlaku sygnałowego STAT3 oraz zahamowanie migracji i inwazji [323]. Z drugiej strony również zahamowanie autofagii z użyciem HCQ spowodowało inaktywację STAT3 oraz zahamowanie wzrostu komórek raka płuc [324]. W badaniach komórek macierzystych ścięgien wykazano pozytywną rolę szlaku sygnałowego JAK-STAT w starzeniu komórkowym. Zaobserwowano, że hamowaniu ścieżki JAK-STAT towarzyszyło zmniejszenie starzenia komórkowego oraz SASP [325]. Zatem obserwana nadreprezentacja genów tego szlaku wzmacnia wniosek, że HCQ w niedotlenionych komórkach raka płuca może pełnić prostarzeniową rolę.

Podsumowując, zahamowanie autofagii poprzez zastosowanie HCQ zmniejsza oporność na cisplatinę niedotlenionych komórek raka płuc w perspektywie krótkoterminowej. HCQ wywala korzystny efekt w postaci zmniejszenia proliferacji komórek oraz zmniejszenia ekspresji niektórych markerów komórek macierzystych. Ponadto analiza NGS wskazuje, że leczenie HCQ może promować starzenie oraz hamować towarzyszącą ucieczce od starzenia proliferację. Jednakże niektóre geny o zwiększonej ekspresji po traktowaniu HCQ są związane ze ścieżkami wykazującymi również niekorzystne efekty jak zwiększenie inwazyjności i migracji, czy ekspresji SASP. Z tego względu konieczne wydaje się zbadanie długofalowych efektów leczenia HCQ, szczególnie w kontekście fenotypu sekrecyjnego, macierzystego oraz zdolności do tworzenia przerzutów.

Próba oceny wpływu HCQ na starzejące się komórki raka płuca w mysim modelu *in vivo* nie powiodła się z powodu gwałtownego wzrostu guzów, którego nie zatrzymało leczenie cisplatiną. Może to wynikać w szybkiego tempa proliferacji komórek LLC1, co było obserwowane już w pierwszych badaniach prowadzonych na tej linii komórkowej [326]. Z tego powodu już na etapie prezentowanych tu doświadczeń *in vitro* z zastosowaniem komórek LLC1 konieczna była znaczna redukcja liczby wysiewanych komórek. Jednakże niedawno opublikowana praca wykazała, że chociaż subklony pochodzące z linii LLC1 różniły się między sobą tempem proliferacji *in vitro*, to ich wzrost *in vivo* był określony przez mikrośrodowisko guza [327]. Zatem jedną z hipotez tłumaczących niedostateczne działanie cisplatyny jest rozwój niedotlenienia

---

w szybko rosnących guzach przyczyniający się do oporności na cisplatynę, co wykazały przeprowadzone badania *in vitro* oraz eksperymenty innych grup badawczych. Na przykład w modelu mysiego raka płuca wykazano że uwrażliwieniu guza na cisplatynę pod wpływem aspiryny towarzyszyło obniżenie HIF-1 $\alpha$  [328]. Jednakże weryfikacja tej hipotezy wymaga pogłębionych badań. W pracy Kang i współpracowników porównywano różne warunki eksperymentalne syngenicznego modelu raka płuca dla mysiego szczepu C57BL/6N. Autorzy podawali komórki w różnej liczbie do myszy pochodzących z trzech różnych hodowli (z Korei Południowej, Japonii i Stanów Zjednoczonych), a następnie leczyli je kilkoma dawkami cisplatyny. Okazało się, że wielkość guzów była zależna od wszczepionej liczby komórek oraz stężenia podawanej cisplatyny, a nie od pochodzenia użytej do eksperymentu hodowli [329]. Tak więc nieskuteczne zahamowanie wzrostu guzów może wynikać z obserwowanej *in vitro* ucieczki przed starzeniem komórek leczonych CIS w niedotlenieniu. Potwierdzenie tej hipotezy wymaga jednak pogłębionych badań markerów hipoksji i starzenia komórkowego w pobranym materiale tkankowym. Na podstawie otrzymanych danych model *in vivo* do oceny starzenia komórek raka płuca pod wpływem CIS wymaga dopracowania, przy czym najbardziej istotne wydaje się doprecyzowanie schematu podawania leku skutecznie hamującego wzrost guza.

Ponieważ przeprowadzone badania wykazały, że niedotlenienie jest czynnikiem wywołującym oporność na cisplatynę zbadano ekspresję czynników indukowanych niedotlenieniem HIF w materiale tkankowym od pacjentów z gruczolakorakiem płuc. Wyniki wskazują, że u części badanych pacjentów ekspresja genów HIF była wzmożona, ale tylko w jednej z dwóch próbek pobranych od tego samego pacjenta, wskazując na heterogenność guzów pod względem niedotlenienia. Podobne wnioski otrzymano w modelu szczurzego raka wątrobowokomórkowego, w którym wykorzystano pozytonową tomografię emisyjną (PET) do obrazowania niedotlenionych regionów guza. W guzach stwierdzono heterogeniczną akumulację znacznika wykrywającego niedotlenienie oraz obecność markerów angiogennych w regionach niedotlenienia, co może sprzyjać przerzutom nowotworowym [330]. Heterogenna sygnalizacja niedotlenienia w guzie może indukować selekcję nowotworowych komórek macierzystych, przyczyniających się do nawrotów choroby nowotworowej [331]. Potwierdza to obserwacje Beucken i współpracowników stwierdzających, że niedotlenienie sprzyja przejściu nabłonka do mezenchymalnego i prowadzi do nabycia

---

przez komórki fenotypu macierzystego [332]. Przedstawione tu badania markerów macierzystości: OCT-3/4, ALDH1A oraz NANOG wykazały heterogenność części badanych guzów pod względem cech macierzystości, co w dużej mierze korespondowało z niedotlenieniem. Spośród próbek pobranych od pięciu pacjentów u trzech z nich występowała korespondencja z markerami niedotlenienia. Jednakże wzór ekspresji dla markera ALDH1A częściowo różnił się od wzoru ekspresji dla NANOG i OCT3/4. Podwyższona ekspresja genu ALDH1A występowała w próbkach 3T1, 3T2, 4T1, 4T2 oraz 5T1, natomiast dla pozostałych dwóch genów były to próbki 4T1, 4T2 oraz 5T1. Różnice pomiędzy ekspresją markerów zauważono również w przedstawionych badaniach *in vitro*. Z wymienionych wcześniej markerów macierzystości ekspresja genów OCT-3/4 i NANOG wzrastała w komórkach A549 pod wpływem hipoksji, natomiast ALDH1A ulegała obniżeniu. Różnica pomiędzy ekspresją genów OCT-3/4 i NANOG, a ALDH1A może wynikać z odmiennych funkcji pełnionych przez te markery. Markery OCT-3/4 i NANOG należą do czynników transkrypcyjnych odpowiadających między innymi za kontrolę transkrypcji genów związanych z pluripotencją. Natomiast ALDH1A jest enzymem wewnątrzkomórkowym biorącym udział w metabolizmie alkoholu i reakcji na stres oksydacyjny [333].

W świetle tych wyników można wnioskować, że niedotlenione obszary guza mogą wiązać się z ryzykiem rozwoju cech macierzystości komórek nowotworowych. W połączeniu z otrzymanymi wynikami *in vitro* racjonalnym podejściem jest badanie markerów niedotlenienia przed podaniem chemioterapii platynowej w celu oceny ryzyka ucieczki komórek nowotworowych przed starzeniem. Ze względu na heterogenność guzów gruczolaka płuc pod względem niedotlenienia odpowiedź na terapię lekami platynowymi może prowadzić do selekcji komórek opornych w niedotlenionych regionach guzów. Mogą one w konsekwencji doprowadzić do nawrotu choroby po zakończeniu leczenia. Należy jednak pamiętać, że przedstawione badania nad heterogennością guzów przeprowadzono na niewielkiej liczbie próbek, więc w celu potwierdzenia przedstawionych tu zależności należy rozszerzyć badanie o większą liczbę pacjentów.

---

## 6 Wnioski

Przedstawione w rozprawie wyniki wskazują, że hipoksja poprzez ucieczkę od starzenia zwiększa odporność linii komórkowych raka płuca na cisplatynę. Eksperymenty *in vitro* dowiodły, że ekspozycja komórek raka płuc na niedotlenienie podczas leczenia cisplatyną zmniejsza sygnalizację starzeniową poprzez ścieżkę sygnałową p53/p21. Towarzyszy temu wzrost ekspresji białek związanych z progresją cyklu komórkowego. Hamowanie glikolizy poprzez inhibicję aktywności dehydrogenaz mleczanowych ma znikomy wpływ na obserwowaną w niedotlenieniu ucieczkę od starzenia podczas leczenia cisplatyną. Natomiast skuteczne do przewyciężenia oporności wywołanej cisplatyną niedotlenionych komórek niedrobnokomórkowego raka płuca okazało się hamowanie autofagii przez leczenie HCQ. Działanie to oparte jest głównie na zahamowaniu proliferacji komórek oraz ekspresji białek związanych z progresją cyklu komórkowego *in vitro*. Zastosowanie HCQ powodowało również obniżenie ekspresji genów macierzystości: NANOG, ALDH1A i SOX-2, a także markera epitelialnego E-kadheryny. Zatem obok efektu na zahamowanie ucieczki przed starzeniem HCQ może wiązać się z ryzykiem rozwoju fenotypu mezenchymalnego, które należy ocenić w perspektywie długoterminowej. Mysi model *in vivo* do oceny efektów takiej terapii wymaga dopracowania z powodu niedostatecznego zahamowania wzrostu guzów. Wytlumaczeniem tego zjawiska może być obserwowana ucieczka komórek przed starzeniem w niedotlenieniu podczas leczenia CIS, jednakże potwierdzenie tej hipotezy wymaga przeprowadzenia dodatkowych analiz. Ponadto przedstawione tu badania *in vivo* tkanek pobranych od pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca wykazały heterogenność części badanych guzów od pod względem cech macierzystości, co w dużej mierze korespondowało z niedotlenieniem. Wyniki sekwencjonowania następnej generacji dodatkowo wzmacniają wniosek, że HCQ obniża proliferację i wzmacnia starzeniowy fenotyp komórek niedrobnokomórkowego raka płuca poddanych leczeniu cisplatyną w hipoksji. Jednakże analiza NGS wskazała również na aktywację ścieżek związanych z indukcją fenotypu sekrecyjnego związanego ze starzeniem, zdolnością komórek do inwazji i migracji, a także rozwojem fenotypu macierzystego. Otrzymane wyniki dotyczące zahamowania ucieczki przed starzeniem poprzez użycie HCQ rodzą zatem ważne pytania w kontekście długoterminowych konsekwencji leczenia chemioterapeutycznego w połączeniu z inhibitorami autofagii. Niemniej jednak hamowanie autofagii w celu

---

zablokowania ucieczki przed starzeniem otwiera nowe możliwości w medycynie personalizowanej dla pacjentów leczonych cisplatyną w celu uniknięcia chemooporności niedotlenionych obszarów guza.

---

## 7 Bibliografia

1. Torre, L.A., R.L. Siegel, and A. Jemal, *Lung Cancer Statistics*. Adv Exp Med Biol, 2016. **893**: p. 1-19.
2. Thai, A.A., et al., *Lung cancer*. Lancet, 2021. **398**(10299): p. 535-554.
3. Schabath, M.B. and M.L. Cote, *Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2019. **28**(10): p. 1563-1579.
4. Barta, J.A., C.A. Powell, and J.P. Wisnivesky, *Global Epidemiology of Lung Cancer*. Ann Glob Health, 2019. **85**(1).
5. Alexander, M., S.Y. Kim, and H. Cheng, *Update 2020: Management of Non-Small Cell Lung Cancer*. Lung, 2020. **198**(6): p. 897-907.
6. Couraud, S., et al., *Lung cancer in never smokers--a review*. Eur J Cancer, 2012. **48**(9): p. 1299-311.
7. Duma, N., R. Santana-Davila, and J.R. Molina, *Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment*. Mayo Clin Proc, 2019. **94**(8): p. 1623-1640.
8. Rudin, C.M., et al., *Small-cell lung cancer*. Nat Rev Dis Primers, 2021. **7**(1): p. 3.
9. Huang, R., et al., *Associated Links Among Smoking, Chronic Obstructive Pulmonary Disease, and Small Cell Lung Cancer: A Pooled Analysis in the International Lung Cancer Consortium*. EBioMedicine, 2015. **2**(11): p. 1677-85.
10. George, J., et al., *Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer*. Nature, 2015. **524**(7563): p. 47-53.
11. Wang, S., et al., *Current Diagnosis and Management of Small-Cell Lung Cancer*. Mayo Clin Proc, 2019. **94**(8): p. 1599-1622.
12. Higgins, K.A., et al., *Recent developments in limited stage small cell lung cancer*. Transl Lung Cancer Res, 2019. **8**(Suppl 2): p. S147-S152.
13. Kalemkerian, G.P. and B.J. Schneider, *Advances in Small Cell Lung Cancer*. Hematol Oncol Clin North Am, 2017. **31**(1): p. 143-156.
14. Mathieu, L., et al., *FDA Approval Summary: Atezolizumab and Durvalumab in Combination with Platinum-Based Chemotherapy in Extensive Stage Small Cell Lung Cancer*. Oncologist, 2021. **26**(5): p. 433-438.
15. Zappa, C. and S.A. Mousa, *Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances*. Transl Lung Cancer Res, 2016. **5**(3): p. 288-300.
16. Denisenko, T.V., I.N. Budkevich, and B. Zhivotovsky, *Cell death-based treatment of lung adenocarcinoma*. Cell Death Dis, 2018. **9**(2): p. 117.
17. Kris, M.G., et al., *Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs*. JAMA, 2014. **311**(19): p. 1998-2006.
18. Pan, Y., et al., *Recent advances in preclinical models for lung squamous cell carcinoma*. Oncogene, 2021. **40**(16): p. 2817-2829.
19. Santos, E.S. and L. Hart, *Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Lung: Current Treatment Approaches and the Role of Afatinib*. Onco Targets Ther, 2020. **13**: p. 9305-9321.
20. Testa, U., G. Castelli, and E. Pelosi, *Lung Cancers: Molecular Characterization, Clonal Heterogeneity and Evolution, and Cancer Stem Cells*. Cancers (Basel), 2018. **10**(8).
21. Liam, C.K., et al., *Lung cancer staging now and in the future*. Respirology, 2015. **20**(4): p. 526-34.
22. Woodard, G.A., K.D. Jones, and D.M. Jablons, *Lung Cancer Staging and Prognosis*. Cancer Treat Res, 2016. **170**: p. 47-75.
23. Vinod, S.K. and E. Hau, *Radiotherapy treatment for lung cancer: Current status and future directions*. Respirology, 2020. **25** Suppl 2: p. 61-71.
24. Bujko, K., *Podstawy radioterapii*. Gastroenterologia Kliniczna. Postępy i Standardy, 2010. **2**(4): p. 121-126.



- 
25. Jarosz-Biej, M., et al., *Tumor Microenvironment as A "Game Changer" in Cancer Radiotherapy*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(13).
  26. Casares, C., et al., *Reactive oxygen species in apoptosis induced by cisplatin: review of physiopathological mechanisms in animal models*. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2012. **269**(12): p. 2455-9.
  27. Ghosh, S., *Cisplatin: The first metal based anticancer drug*. *Bioorg Chem*, 2019. **88**: p. 102925.
  28. Dasari, S. and P.B. Tchounwou, *Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action*. *Eur J Pharmacol*, 2014. **740**: p. 364-78.
  29. Hawrylkiewicz, A. and N. Ptaszynska, *Gemcitabine Peptide-Based Conjugates and Their Application in Targeted Tumor Therapy*. *Molecules*, 2021. **26**(2).
  30. Bailly, C., *Irinotecan: 25 years of cancer treatment*. *Pharmacol Res*, 2019. **148**: p. 104398.
  31. Solomon, B. and P.A. Bunn, Jr., *Clinical activity of pemetrexed: a multitargeted antifolate anticancer agent*. *Future Oncol*, 2005. **1**(6): p. 733-46.
  32. Long, K. and K. Suresh, *Pulmonary toxicity of systemic lung cancer therapy*. *Respirology*, 2020. **25 Suppl 2**: p. 72-79.
  33. Martino, E., et al., *Vinca alkaloids and analogues as anti-cancer agents: Looking back, peering ahead*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2018. **28**(17): p. 2816-2826.
  34. Schirmacher, V., *From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review)*. *Int J Oncol*, 2019. **54**(2): p. 407-419.
  35. Pearce, A., et al., *Incidence and severity of self-reported chemotherapy side effects in routine care: A prospective cohort study*. *PloS one*, 2017. **12**(10): p. e0184360.
  36. Osmani, L., et al., *Current WHO guidelines and the critical role of immunohistochemical markers in the subclassification of non-small cell lung carcinoma (NSCLC): Moving from targeted therapy to immunotherapy*. *Semin Cancer Biol*, 2018. **52**(Pt 1): p. 103-109.
  37. Lemjabbar-Alaoui, H., et al., *Lung cancer: Biology and treatment options*. *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1856**(2): p. 189-210.
  38. Rodak, O., et al., *Current Landscape of Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Histological Classification, Targeted Therapies, and Immunotherapy*. *Cancers (Basel)*, 2021. **13**(18).
  39. Bardhan, K., T. Anagnostou, and V.A. Boussiotis, *The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation*. *Frontiers in Immunology*, 2016. **7**.
  40. Dong, P., et al., *Tumor-Intrinsic PD-L1 Signaling in Cancer Initiation, Development and Treatment: Beyond Immune Evasion*. *Frontiers in Oncology*, 2018. **8**.
  41. Patel, S.A. and J. Weiss, *Advances in the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer: Immunotherapy*. *Clin Chest Med*, 2020. **41**(2): p. 237-247.
  42. Tian, W., et al., *Anti-Angiogenic Therapy in the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer*. *Onco Targets Ther*, 2020. **13**: p. 12113-12129.
  43. Wang, K., B. Yu, and J.L. Pathak, *An update in clinical utilization of photodynamic therapy for lung cancer*. *J Cancer*, 2021. **12**(4): p. 1154-1160.
  44. Meng, X., et al., *Triggered All-Active Metal Organic Framework: Ferroptosis Machinery Contributes to the Apoptotic Photodynamic Antitumor Therapy*. *Nano Lett*, 2019. **19**(11): p. 7866-7876.
  45. Shepherd, R.W. and C. Radchenko, *Bronchoscopic ablation techniques in the management of lung cancer*. *Ann Transl Med*, 2019. **7**(15): p. 362.
  46. Roberson, R.S., et al., *Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers*. *Cancer Res*, 2005. **65**(7): p. 2795-803.

- 
47. Giatromanolaki, A., et al., *A Novel Lipofuscin-detecting Marker of Senescence Relates With Hypoxia, Dysregulated Autophagy and With Poor Prognosis in Non-small-cell-lung Cancer*. In vivo (Athens, Greece), 2020. **34**(6): p. 3187-3193.
  48. Basu, A., *The interplay between apoptosis and cellular senescence: Bcl-2 family proteins as targets for cancer therapy*. Pharmacol Ther, 2022. **230**: p. 107943.
  49. McHugh, D. and J. Gil, *Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues*. J Cell Biol, 2018. **217**(1): p. 65-77.
  50. He, S. and N.E. Sharpless, *Senescence in Health and Disease*. Cell, 2017. **169**(6): p. 1000-1011.
  51. Bielak-Zmijewska, A., W. Grabowska, and D. Przybylska, *[Impact of cellular senescence on organismal aging and age-related diseases]*. Postepy Biochem, 2014. **60**(2): p. 147-60.
  52. 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.
  53. Hayflick, L. and P.S. Moorhead, *The serial cultivation of human diploid cell strains*. Exp Cell Res, 1961. **25**: p. 585-621.
  54. de Magalhaes, J.P. and J.F. Passos, *Stress, cell senescence and organismal ageing*. Mech Ageing Dev, 2018. **170**: p. 2-9.
  55. Olovnikov, A.M., *A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon*. J Theor Biol, 1973. **41**(1): p. 181-90.
  56. Roake, C.M. and S.E. Artandi, *Regulation of human telomerase in homeostasis and disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020. **21**(7): p. 384-397.
  57. Mohamad Kamal, N.S., et al., *Ageing of the cells: Insight into cellular senescence and detection Methods*. Eur J Cell Biol, 2020. **99**(6): p. 151108.
  58. Serrano, M., et al., *Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a*. Cell, 1997. **88**(5): p. 593-602.
  59. Chen, Q. and B.N. Ames, *Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(10): p. 4130-4.
  60. Lee, S. and J.S. Lee, *Cellular senescence: a promising strategy for cancer therapy*. BMB Rep, 2019. **52**(1): p. 35-41.
  61. Wang, X., et al., *Evidence of cisplatin-induced senescent-like growth arrest in nasopharyngeal carcinoma cells*. Cancer Res, 1998. **58**(22): p. 5019-22.
  62. 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.
  63. Ghorai, A., et al., *Sustained inhibition of PARP-1 activity delays glioblastoma recurrence by enhancing radiation-induced senescence*. Cancer Lett, 2020. **490**: p. 44-53.
  64. Saleh, T., et al., *Expression of therapy-induced senescence markers in breast cancer samples upon incomplete response to neoadjuvant chemotherapy*. Biosci Rep, 2021. **41**(5).
  65. Korwek, Z. and O. Alster, *Rola szlaku indukowanego uszkodzeniami DNA w apoptozie i starzeniu komórkowym*. Postepy Biochem, 2014. **60**(2): p. 248-262.
  66. Smith, U., et al., *Cellular senescence and its role in white adipose tissue*. Int J Obes (Lond), 2021. **45**(5): p. 934-943.
  67. Mijit, M., et al., *Role of p53 in the Regulation of Cellular Senescence*. Biomolecules, 2020. **10**(3).
  68. Smith, H.L., et al., *DNA damage checkpoint kinases in cancer*. Expert Rev Mol Med, 2020. **22**: p. e2.
  69. Kasthuber, E.R. and S.W. Lowe, *Putting p53 in Context*. Cell, 2017. **170**(6): p. 1062-1078.

- 
70. Fischer, M. and G.A. Muller, *Cell cycle transcription control: DREAM/MuvB and RB-E2F complexes*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2017. **52**(6): p. 638-662.
  71. Lee, M. and J.S. Lee, *Exploiting tumor cell senescence in anticancer therapy*. BMB Rep, 2014. **47**(2): p. 51-9.
  72. Rufini, A., et al., *Senescence and aging: the critical roles of p53*. Oncogene, 2013. **32**(43): p. 5129-43.
  73. van den Heuvel, S., *Cell-cycle regulation*. WormBook, 2005: p. 1-16.
  74. Saleh, T., L. Tyutyunyk-Massey, and D.A. Gewirtz, *Tumor Cell Escape from Therapy-Induced Senescence as a Model of Disease Recurrence after Dormancy*. Cancer Res, 2019. **79**(6): p. 1044-1046.
  75. Galanos, P., et al., *Chronic p53-independent p21 expression causes genomic instability by deregulating replication licensing*. Nat Cell Biol, 2016. **18**(7): p. 777-89.
  76. Rovillain, E., et al., *An RNA interference screen for identifying downstream effectors of the p53 and pRB tumour suppressor pathways involved in senescence*. BMC Genomics, 2011. **12**: p. 355.
  77. Alster, O. and Z. Korwek, *[Markers of cellular senescence]*. Postepy Biochem, 2014. **60**(2): p. 138-46.
  78. Beck, J., I. Horikawa, and C. Harris, *Cellular Senescence: Mechanisms, Morphology, and Mouse Models*. Vet Pathol, 2020. **57**(6): p. 747-757.
  79. Herranz, N. and J. Gil, *Mechanisms and functions of cellular senescence*. J Clin Invest, 2018. **128**(4): p. 1238-1246.
  80. 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.
  81. Itahana, K., Y. Itahana, and G.P. Dimri, *Colorimetric detection of senescence-associated beta galactosidase*. Methods Mol Biol, 2013. **965**: p. 143-56.
  82. Maier, A.B., R.G. Westendorp, and V.A.N.H. D, *Beta-galactosidase activity as a biomarker of replicative senescence during the course of human fibroblast cultures*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1100**: p. 323-32.
  83. Childs, B.G., T.J. Bussian, and D.J. Baker, *Cellular Identification and Quantification of Senescence-Associated beta-Galactosidase Activity In Vivo*. Methods Mol Biol, 2019. **1896**: p. 31-38.
  84. Gorgoulis, V., et al., *Cellular Senescence: Defining a Path Forward*. Cell, 2019. **179**(4): p. 813-827.
  85. Regulski, M.J., *Cellular Senescence: What, Why, and How*. Wounds, 2017. **29**(6): p. 168-174.
  86. Campisi, J., *Aging, cellular senescence, and cancer*. Annu Rev Physiol, 2013. **75**: p. 685-705.
  87. Childs, B.G., et al., *Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy*. Nat Med, 2015. **21**(12): p. 1424-35.
  88. Fitsiou, E., A. Soto-Gamez, and M. Demaria, *Biological functions of therapy-induced senescence in cancer*. Semin Cancer Biol, 2021.
  89. Acosta, J.C., et al., *A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(8): p. 978-90.
  90. Birch, J. and J. Gil, *Senescence and the SASP: many therapeutic avenues*. Genes Dev, 2020. **34**(23-24): p. 1565-1576.
  91. Kang, T.W., et al., *Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development*. Nature, 2011. **479**(7374): p. 547-51.
  92. Eggert, T., et al., *Distinct Functions of Senescence-Associated Immune Responses in Liver Tumor Surveillance and Tumor Progression*. Cancer Cell, 2016. **30**(4): p. 533-547.
  93. Bavik, C., et al., *The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms*. Cancer Res, 2006. **66**(2): p. 794-802.

- 
94. Was, H., et al., *Polyploidy formation in cancer cells: How a Trojan horse is born*. *Semin Cancer Biol*, 2022. **81**: p. 24-36.
  95. Coward, J. and A. Harding, *Size does matter: why polyploid tumor cells are critical drug targets in the war on cancer*. *Frontiers in oncology*, 2014. **4**: p. 123.
  96. Lin, K.C., et al., *The role of heterogeneous environment and docetaxel gradient in the emergence of polyploid, mesenchymal and resistant prostate cancer cells*. *Clin Exp Metastasis*, 2019. **36**(2): p. 97-108.
  97. Rajaraman, R., et al., *Stem cells, senescence, neosis and self-renewal in cancer*. *Cancer Cell Int*, 2006. **6**: p. 25.
  98. Erenpreisa, J., et al., *The "virgin birth", polyploidy, and the origin of cancer*. *Oncoscience*, 2015. **2**(1): p. 3-14.
  99. Telleria, C.M., *Repopulation of ovarian cancer cells after chemotherapy*. *Cancer Growth Metastasis*, 2013. **6**: p. 15-21.
  100. 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.
  101. Narita, M., et al., *Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence*. *Cell*, 2003. **113**(6): p. 703-16.
  102. Chandra, T., *Senescence Associated Heterochromatic Foci: SAHF*. 2016. p. 205-218.
  103. Ewald, J.A., et al., *Therapy-induced senescence in cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 2010. **102**(20): p. 1536-46.
  104. Faget, D.V., Q. Ren, and S.A. Stewart, *Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2019. **19**(8): p. 439-453.
  105. 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.
  106. Saleh, T., et al., *Tumor cell escape from therapy-induced senescence*. *Biochemical Pharmacology*, 2019. **162**: p. 202-212.
  107. Walcher, L., et al., *Cancer Stem Cells-Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 1280.
  108. 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.
  109. Prasad, S., et al., *Cancer cells stemness: A doorstep to targeted therapy*. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020. **1866**(4): p. 165424.
  110. 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.
  111. Pan, G., et al., *EMT-associated microRNAs and their roles in cancer stemness and drug resistance*. *Cancer Commun (Lond)*, 2021. **41**(3): p. 199-217.
  112. 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.
  113. Salmina, K., et al., *Up-regulation of the embryonic self-renewal network through reversible polyploidy in irradiated p53-mutant tumour cells*. *Exp Cell Res*, 2010. **316**(13): p. 2099-112.
  114. 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.
  115. Nacarelli, T., et al., *NAMPT Inhibition Suppresses Cancer Stem-like Cells Associated with Therapy-Induced Senescence in Ovarian Cancer*. *Cancer research*, 2020. **80**(4): p. 890-900.
  116. Rohnlter, V., et al., *A multi-stage process including transient polyploidization and EMT precedes the emergence of chemoresistent ovarian carcinoma cells with a*

- 
- dedifferentiated and pro-inflammatory secretory phenotype*. *Oncotarget*, 2015. **6**(37): p. 40005-25.
117. Aiello, N.M. and Y. Kang, *Context-dependent EMT programs in cancer metastasis*. *J Exp Med*, 2019. **216**(5): p. 1016-1026.
  118. Lo, U.G., et al., *The Role and Mechanism of Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Prostate Cancer Progression*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(10).
  119. Borowa-Mazgaj, B., [*Pancreatic cancer--mechanisms of chemoresistance*]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2016. **70**: p. 169-79.
  120. Gos, M., J. Miloszewska, and M. Przybyszewska, [*Epithelial-mesenchymal transition in cancer progression*]. *Postepy Biochem*, 2009. **55**(2): p. 121-8.
  121. Mendonsa, A.M., T.Y. Na, and B.M. Gumbiner, *E-cadherin in contact inhibition and cancer*. *Oncogene*, 2018. **37**(35): p. 4769-4780.
  122. Loh, C.Y., et al., *The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges*. *Cells*, 2019. **8**(10).
  123. Serrano-Gomez, S.J., M. Maziveyi, and S.K. Alahari, *Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications*. *Mol Cancer*, 2016. **15**: p. 18.
  124. Shih, J.-Y. and P.-C. Yang, *The EMT regulator slug and lung carcinogenesis*. *Carcinogenesis*, 2011. **32**(9): p. 1299-1304.
  125. Nowak, E. and I. Bednarek, *Aspects of the Epigenetic Regulation of EMT Related to Cancer Metastasis*. *Cells*, 2021. **10**(12).
  126. Zhang, P., Y. Sun, and L. Ma, *ZEB1: at the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance*. *Cell Cycle*, 2015. **14**(4): p. 481-7.
  127. Chen, B., et al., *Prognostic value of ZEB-1 in solid tumors: a meta-analysis*. *BMC Cancer*, 2019. **19**(1): p. 635.
  128. PRZYBYŁA, T., M. SAKOWICZ-BURKIEWICZ, and I. MACIEJEWSKA, *TWIST1– JEDNYM Z KLUCZOWYCH CZYNNIKÓW TRANSFORMACJI NABŁONKOWO--MEZENCHYMALNEJ W NOWOTWORACH*. 2014.
  129. Pieniazek, M., et al., [*The role of TGF-beta-related signal transduction pathways in pathogenesis of epithelial-mesenchymal transition as a key element in cancer development and progression*]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2012. **66**: p. 583-91.
  130. Cummins, P.M., *Occludin: one protein, many forms*. *Mol Cell Biol*, 2012. **32**(2): p. 242-50.
  131. Soini, Y., *Tight junctions in lung cancer and lung metastasis: a review*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2012. **5**(2): p. 126-36.
  132. Popow-Woźniak, A., D. Nowak, and M. Malicka-Błaszkiwicz, *Types of tumor cells movement*. *POSTĘPY BIOCHEMII*, 2009. **26**: p. 120.
  133. Satelli, A. and S. Li, *Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy*. *Cell Mol Life Sci*, 2011. **68**(18): p. 3033-46.
  134. Scheau, C., et al., *The Role of Matrix Metalloproteinases in the Epithelial-Mesenchymal Transition of Hepatocellular Carcinoma*. *Anal Cell Pathol (Amst)*, 2019. **2019**: p. 9423907.
  135. Wang, S.S., et al., *Links between cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition*. *Onco Targets Ther*, 2015. **8**: p. 2973-80.
  136. Wen, F.C., et al., *hRAD9 functions as a tumor suppressor by inducing p21-dependent senescence and suppressing epithelial-mesenchymal transition through inhibition of Slug transcription*. *Carcinogenesis*, 2014. **35**(7): p. 1481-90.
  137. Mulcahy Levy, J.M. and A. Thorburn, *Autophagy in cancer: moving from understanding mechanism to improving therapy responses in patients*. *Cell Death Differ*, 2020. **27**(3): p. 843-857.
  138. Zaarour, R.F., et al., *Role of Hypoxia-Mediated Autophagy in Tumor Cell Death and Survival*. *Cancers (Basel)*, 2021. **13**(3).

- 
139. Deter, R.L. and C. De Duve, *Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes*. J Cell Biol, 1967. **33**(2): p. 437-49.
140. Li, Y.J., et al., *Autophagy and multidrug resistance in cancer*. Chin J Cancer, 2017. **36**(1): p. 52.
141. Hurley, J.H. and L.N. Young, *Mechanisms of Autophagy Initiation*. Annu Rev Biochem, 2017. **86**: p. 225-244.
142. Parzych, K.R. and D.J. Klionsky, *An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation*. Antioxid Redox Signal, 2014. **20**(3): p. 460-73.
143. Chavez-Dominguez, R., et al., *The Double-Edge Sword of Autophagy in Cancer: From Tumor Suppression to Pro-tumor Activity*. Front Oncol, 2020. **10**: p. 578418.
144. Yu, L., Y. Chen, and S.A. Tooze, *Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms*. Autophagy, 2018. **14**(2): p. 207-215.
145. Polewska, J., *[Autophagy--molecular mechanism, apoptosis and cancer]*. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2012. **66**: p. 921-36.
146. Glick, D., S. Barth, and K.F. Macleod, *Autophagy: cellular and molecular mechanisms*. J Pathol, 2010. **221**(1): p. 3-12.
147. Wysokinska, E. and W. Kalas, *[Detection of autophagy based on conversions of MAP1LC3 and p62/SQSTM1]*. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2013. **67**: p. 442-8.
148. Onorati, A.V., et al., *Targeting autophagy in cancer*. Cancer, 2018. **124**(16): p. 3307-3318.
149. Lisiak, N., E. Toton, and M. Rybczynska, *[Autophagy, new perspectives in anticancer therapy]*. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2014. **68**: p. 925-35.
150. Noman, M.Z., et al., *Blocking hypoxia-induced autophagy in tumors restores cytotoxic T-cell activity and promotes regression*. Cancer Res, 2011. **71**(18): p. 5976-86.
151. Levy, J.M.M., C.G. Towers, and A. Thorburn, *Targeting autophagy in cancer*. Nat Rev Cancer, 2017. **17**(9): p. 528-542.
152. Thorburn, A., D.H. Thamm, and D.L. Gustafson, *Autophagy and cancer therapy*. Mol Pharmacol, 2014. **85**(6): p. 830-8.
153. Gewirtz, D.A., *Autophagy and senescence in cancer therapy*. J Cell Physiol, 2014. **229**(1): p. 6-9.
154. Rajendran, P., et al., *Autophagy and senescence: A new insight in selected human diseases*. J Cell Physiol, 2019. **234**(12): p. 21485-21492.
155. Kang, C., et al., *The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4*. Science, 2015. **349**(6255): p. aaa5612.
156. Bouleftour, W., et al., *A Review of the Role of Hypoxia in Radioresistance in Cancer Therapy*. Med Sci Monit, 2021. **27**: p. e934116.
157. Abou Khouzam, R., et al., *Tumor Hypoxia Regulates Immune Escape/Invasion: Influence on Angiogenesis and Potential Impact of Hypoxic Biomarkers on Cancer Therapies*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 613114.
158. Gilkes, D.M., G.L. Semenza, and D. Wirtz, *Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(6): p. 430-9.
159. Gray, L.H., et al., *The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy*. Br J Radiol, 1953. **26**(312): p. 638-48.
160. Jing, X., et al., *Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment*. Mol Cancer, 2019. **18**(1): p. 157.
161. Carreau, A., et al., *Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia*. J Cell Mol Med, 2011. **15**(6): p. 1239-53.
162. Gasińska, A. and B. Biesaga, *Dwa oblicza hipoksji nowotworów*. Nowotwory. Journal of Oncology, 2010. **60**(4): p. 332-332.
163. Hadanny, A. and S. Efrati, *The Hyperoxic-Hypoxic Paradox*. Biomolecules, 2020. **10**(6).
164. Ancel, J., et al., *Hypoxia in Lung Cancer Management: A Translational Approach*. Cancers (Basel), 2021. **13**(14).

- 
165. 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.
  166. Sygitowicz, G. and D. Sitkiewicz, *Jak komórki adaptują się do zmienionej dostępności tlenu–rola czynnika indukowanego hipoksją HIF-1*.
  167. Lee, J.W., et al., *Hypoxia signaling in human diseases and therapeutic targets*. *Exp Mol Med*, 2019. **51**(6): p. 1-13.
  168. Serocki, M., et al., *miRNAs regulate the HIF switch during hypoxia: a novel therapeutic target*. *Angiogenesis*, 2018. **21**(2): p. 183-202.
  169. Yang, S.L., et al., *Progress on hypoxia-inducible factor-3: Its structure, gene regulation and biological function (Review)*. *Mol Med Rep*, 2015. **12**(2): p. 2411-6.
  170. Riera-Domingo, C., et al., *Immunity, Hypoxia, and Metabolism-the Menage a Trois of Cancer: Implications for Immunotherapy*. *Physiol Rev*, 2020. **100**(1): p. 1-102.
  171. Manoochehri Khoshinani, H., S. Afshar, and R. Najafi, *Hypoxia: A Double-Edged Sword in Cancer Therapy*. *Cancer Invest*, 2016. **34**(10): p. 536-545.
  172. Heddleston, J., et al., *Hypoxia inducible factors in cancer stem cells*. *British journal of cancer*, 2010. **102**(5): p. 789-795.
  173. Kozal, K., P. Jozwiak, and A. Krzeslak, *Contemporary Perspectives on the Warburg Effect Inhibition in Cancer Therapy*. *Cancer Control*, 2021. **28**: p. 10732748211041243.
  174. Poff, A., et al., *Targeting the Warburg effect for cancer treatment: Ketogenic diets for management of glioma*. *Semin Cancer Biol*, 2019. **56**: p. 135-148.
  175. Liu, Y., et al., *Metabolic reprogramming results in abnormal glycolysis in gastric cancer: a review*. *Onco Targets Ther*, 2019. **12**: p. 1195-1204.
  176. Liu, C., Y. Jin, and Z. Fan, *The Mechanism of Warburg Effect-Induced Chemoresistance in Cancer*. *Front Oncol*, 2021. **11**: p. 698023.
  177. Yu, M., et al., *The prognostic value of GLUT1 in cancers: a systematic review and meta-analysis*. *Oncotarget*, 2017. **8**(26): p. 43356-43367.
  178. Yi, M., et al., *6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3 and 4: A pair of valves for fine-tuning of glucose metabolism in human cancer*. *Mol Metab*, 2019. **20**: p. 1-13.
  179. van Niekerk, G. and A.M. Engelbrecht, *Role of PKM2 in directing the metabolic fate of glucose in cancer: a potential therapeutic target*. *Cell Oncol (Dordr)*, 2018. **41**(4): p. 343-351.
  180. Wang, Y., et al., *PKM2 Inhibitor Shikonin Overcomes the Cisplatin Resistance in Bladder Cancer by Inducing Necroptosis*. *Int J Biol Sci*, 2018. **14**(13): p. 1883-1891.
  181. Urbanska, K. and A. Orzechowski, *Unappreciated Role of LDHA and LDHB to Control Apoptosis and Autophagy in Tumor Cells*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(9).
  182. Pascale, R.M., et al., *The Warburg Effect 97 Years after Its Discovery*. *Cancers (Basel)*, 2020. **12**(10).
  183. Zhai, X., et al., *Inhibition of LDH-A by oxamate induces G2/M arrest, apoptosis and increases radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma cells*. *Oncol Rep*, 2013. **30**(6): p. 2983-91.
  184. Liu, X., et al., *Effects of the suppression of lactate dehydrogenase A on the growth and invasion of human gastric cancer cells*. *Oncol Rep*, 2015. **33**(1): p. 157-62.
  185. Le, A., et al., *Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(5): p. 2037-42.
  186. Cassim, S., et al., *Warburg and Beyond: The Power of Mitochondrial Metabolism to Collaborate or Replace Fermentative Glycolysis in Cancer*. *Cancers (Basel)*, 2020. **12**(5).
  187. Giatromanolaki, A., et al., *A Novel Lipofuscin-detecting Marker of Senescence Relates With Hypoxia, Dysregulated Autophagy and With Poor Prognosis in Non-small-cell-lung Cancer*. *In Vivo*, 2020. **34**(6): p. 3187-3193.
  188. Castedo, M., et al., *Cyclin-dependent kinase-1: linking apoptosis to cell cycle and mitotic catastrophe*. *Cell Death & Differentiation*, 2002. **9**(12): p. 1287-1293.

- 
189. Zhang, H., *Molecular signaling and genetic pathways of senescence: Its role in tumorigenesis and aging*. J Cell Physiol, 2007. **210**(3): p. 567-74.
190. Shen, H. and C.G. Maki, *Pharmacologic activation of p53 by small-molecule MDM2 antagonists*. Curr Pharm Des, 2011. **17**(6): p. 560-8.
191. Fedorova, O., et al., *Novel isatin-derived molecules activate p53 via interference with Mdm2 to promote apoptosis*. Cell Cycle, 2018. **17**(15): p. 1917-1930.
192. Ye, W., et al., *Oxamate Improves Glycemic Control and Insulin Sensitivity via Inhibition of Tissue Lactate Production in db/db Mice*. PLOS ONE, 2016. **11**(3): p. e0150303.
193. Saoudaoui, S., et al., *mTOR as a senescence manipulation target: A forked road*. Adv Cancer Res, 2021. **150**: p. 335-363.
194. Blagosklonny, M.V., *Hypoxia, MTOR and autophagy: converging on senescence or quiescence*. Autophagy, 2013. **9**(2): p. 260-2.
195. Patel, N.H., et al., *Autophagy and senescence in cancer therapy*. Adv Cancer Res, 2021. **150**: p. 1-74.
196. Jiang, W., et al., *RagC GTPase regulates mTOR to promote chemoresistance in senescence-like HepG2 cells*. Frontiers in Physiology, 2022. **13**.
197. Tang, W., R.J. Newton, and D.A. Weidner, *Differential gene silencing induced by short interfering RNA in cultured pine cells associates with the cell cycle phase*. Planta, 2006. **224**(1): p. 53-60.
198. Ferreira, P.M.P., et al., *Chloroquine and hydroxychloroquine in antitumor therapies based on autophagy-related mechanisms*. Pharmacol Res, 2021. **168**: p. 105582.
199. Li, Y., et al., *Hydroxychloroquine-loaded hollow mesoporous silica nanoparticles for enhanced autophagy inhibition and radiation therapy*. Journal of Controlled Release, 2020. **325**: p. 100-110.
200. Agnoletto, C., C. Caruso, and C. Garofalo, *Heterogeneous Circulating Tumor Cells in Sarcoma: Implication for Clinical Practice*. Cancers (Basel), 2021. **13**(9).
201. Daniel, Y., et al., *Interplay between Metabolism Reprogramming and Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer Stem Cells*. Cancers (Basel), 2021. **13**(8).
202. Che, R., et al., *Multifaceted Fanconi Anemia Signaling*. Trends Genet, 2018. **34**(3): p. 171-183.
203. Repczyńska, A. and O. Haus, *Genetyczne podłoże i diagnostyka anemii Fanconiego*. Postepy Hig Med Dosw (online), 2020. **74**: p. 589-601.
204. Wright, W.D., S.S. Shah, and W.D. Heyer, *Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks*. J Biol Chem, 2018. **293**(27): p. 10524-10535.
205. Ranjha, L., S.M. Howard, and P. Cejka, *Main steps in DNA double-strand break repair: an introduction to homologous recombination and related processes*. Chromosoma, 2018. **127**(2): p. 187-214.
206. Shen, J., et al., *Hippo component YAP promotes focal adhesion and tumour aggressiveness via transcriptionally activating THBS1/FAK signalling in breast cancer*. J Exp Clin Cancer Res, 2018. **37**(1): p. 175.
207. Carragher, N.O. and M.C. Frame, *Focal adhesion and actin dynamics: a place where kinases and proteases meet to promote invasion*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(5): p. 241-9.
208. Matos, A., et al., *Arginine and Arginases Modulate Metabolism, Tumor Microenvironment and Prostate Cancer Progression*. Nutrients, 2021. **13**(12).
209. Grabon, W., *[Arginine as a crucial amino acid in carcinogenesis and tumor growth]*. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2006. **60**: p. 483-9.
210. Phang, J.M., *Proline Metabolism in Cell Regulation and Cancer Biology: Recent Advances and Hypotheses*. Antioxid Redox Signal, 2019. **30**(4): p. 635-649.
211. Ben-Zvi, I., et al., *Hydroxychloroquine: from malaria to autoimmunity*. Clin Rev Allergy Immunol, 2012. **42**(2): p. 145-53.



- 
212. Hockel, M. and P. Vaupel, *Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects*. J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(4): p. 266-76.
  213. Godet, I., et al., *Post-hypoxic cells promote metastatic recurrence after chemotherapy treatment in TNBC*. Cancers, 2021. **13**(21): p. 5509.
  214. Demaria, M., et al., *Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse* Cellular Senescence and Chemotherapy. Cancer discovery, 2017. **7**(2): p. 165-176.
  215. Saleh, T., et al., *Therapy-induced senescence: an "old" friend becomes the enemy*. Cancers, 2020. **12**(4): p. 822.
  216. Sullivan, R., et al., *Hypoxia-induced resistance to anticancer drugs is associated with decreased senescence and requires hypoxia-inducible factor-1 activity*. Molecular cancer therapeutics, 2008. **7**(7): p. 1961-1973.
  217. Rabik, C.A. and M.E. Dolan, *Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents*. Cancer Treat Rev, 2007. **33**(1): p. 9-23.
  218. Gasiorkiewicz, B.M., et al., *Autophagy modulating agents as chemosensitizers for cisplatin therapy in cancer*. Invest New Drugs, 2021. **39**(2): p. 538-563.
  219. Shin, D.H., Y.J. Choi, and J.W. Park, *SIRT1 and AMPK mediate hypoxia-induced resistance of non-small cell lung cancers to cisplatin and doxorubicin*. Cancer Res, 2014. **74**(1): p. 298-308.
  220. Liu, Y., et al., *Oroxylin A reverses hypoxia-induced cisplatin resistance through inhibiting HIF-1alpha mediated XPC transcription*. Oncogene, 2020. **39**(45): p. 6893-6905.
  221. Pandey, N., et al., *Allicin Overcomes Hypoxia Mediated Cisplatin Resistance in Lung Cancer Cells through ROS Mediated Cell Death Pathway and by Suppressing Hypoxia Inducible Factors*. Cell Physiol Biochem, 2020. **54**(4): p. 748-766.
  222. Song, X., et al., *Hypoxia-induced resistance to cisplatin and doxorubicin in non-small cell lung cancer is inhibited by silencing of HIF-1alpha gene*. Cancer Chemother Pharmacol, 2006. **58**(6): p. 776-84.
  223. Devarajan, N., R. Manjunathan, and S.K. Ganesan, *Tumor hypoxia: The major culprit behind cisplatin resistance in cancer patients*. Crit Rev Oncol Hematol, 2021. **162**: p. 103327.
  224. Rosa, P., et al., *BK channels blockage inhibits hypoxia-induced migration and chemoresistance to cisplatin in human glioblastoma cells*. J Cell Physiol, 2018. **233**(9): p. 6866-6877.
  225. Rohwer, N., et al., *Hypoxia-inducible factor 1alpha determines gastric cancer chemosensitivity via modulation of p53 and NF-kappaB*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12038.
  226. Lutzkendorf, J., et al., *Resistance for Genotoxic Damage in Mesenchymal Stromal Cells Is Increased by Hypoxia but Not Generally Dependent on p53-Regulated Cell Cycle Arrest*. PLoS One, 2017. **12**(1): p. e0169921.
  227. Parmakhtiar, B., et al., *HIF Inactivation of p53 in Ovarian Cancer Can Be Reversed by Topotecan, Restoring Cisplatin and Paclitaxel Sensitivity*. Mol Cancer Res, 2019. **17**(8): p. 1675-1686.
  228. Guo, Q., et al., *Hypoxia exposure induced cisplatin resistance partially via activating p53 and hypoxia inducible factor-1alpha in non-small cell lung cancer A549 cells*. Oncol Lett, 2018. **16**(1): p. 801-808.
  229. Imran, M., et al., *Docetaxel: An update on its molecular mechanisms, therapeutic trajectory and nanotechnology in the treatment of breast, lung and prostate cancer*. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2020. **60**: p. 101959.
  230. Gerhards, N.M., et al., *Haploid genetic screens identify genetic vulnerabilities to microtubule-targeting agents*. Mol Oncol, 2018. **12**(6): p. 953-971.

- 
231. Budka, J.A., et al., *Common ELF1 deletion in prostate cancer bolsters oncogenic ETS function, inhibits senescence and promotes docetaxel resistance*. *Genes Cancer*, 2018. **9**(5-6): p. 198-214.
232. Simova, J., et al., *Tumor growth accelerated by chemotherapy-induced senescent cells is suppressed by treatment with IL-12 producing cellular vaccines*. *Oncotarget*, 2016. **7**(34): p. 54952-54964.
233. Wang, L., et al., *Activation of hypoxia-inducible factor-1alpha by prolonged in vivo hyperinsulinemia treatment potentiates cancerous progression in estrogen receptor-positive breast cancer cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017. **491**(2): p. 545-551.
234. Lv, Y., et al., *Hypoxia-inducible factor-1alpha induces multidrug resistance protein in colon cancer*. *Onco Targets Ther*, 2015. **8**: p. 1941-8.
235. Samanta, D., et al., *Hypoxia-inducible factors are required for chemotherapy resistance of breast cancer stem cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(50): p. E5429-38.
236. Sowa, T., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 promotes chemoresistance of lung cancer by inducing carbonic anhydrase IX expression*. *Cancer Med*, 2017. **6**(1): p. 288-297.
237. Li, H., et al., *Hypoxia induces docetaxel resistance in triple-negative breast cancer via the HIF-1 $\alpha$ /miR-494/Survivin signaling pathway*. *Neoplasia*, 2022. **32**: p. 100821.
238. Wang, Q., et al., *Survivin and escaping in therapy-induced cellular senescence*. *Int J Cancer*, 2011. **128**(7): p. 1546-58.
239. Fu, P., et al., *Tanshinone IIA blocks epithelial-mesenchymal transition through HIF-1 $\alpha$  downregulation, reversing hypoxia-induced chemotherapy resistance in breast cancer cell lines*. *Oncol Rep*, 2014. **31**(6): p. 2561-2568.
240. Qian, J., et al., *Propofol Reversed Hypoxia-Induced Docetaxel Resistance in Prostate Cancer Cells by Preventing Epithelial-Mesenchymal Transition by Inhibiting Hypoxia-Inducible Factor 1alpha*. *Biomed Res Int*, 2018. **2018**: p. 4174232.
241. Lu, H., et al., *Cetuximab reverses the Warburg effect by inhibiting HIF-1-regulated LDH-A*. *Mol Cancer Ther*, 2013. **12**(10): p. 2187-99.
242. Zhang, H., et al., *PGC1 $\beta$  regulates multiple myeloma tumor growth through LDHA-mediated glycolytic metabolism*. *Mol Oncol*, 2018. **12**(9): p. 1579-1595.
243. Huang, H., et al., *Circular RNA circUBE2D2 functions as an oncogenic factor in hepatocellular carcinoma sorafenib resistance and glycolysis*. *Am J Transl Res*, 2021. **13**(6): p. 6076-6086.
244. Ooi, A.T. and B.N. Gomperts, *Molecular Pathways: Targeting Cellular Energy Metabolism in Cancer via Inhibition of SLC2A1 and LDHA*. *Clin Cancer Res*, 2015. **21**(11): p. 2440-4.
245. Valvona, C.J. and H.L. Fillmore, *Oxamate, but Not Selective Targeting of LDH-A, Inhibits Medulloblastoma Cell Glycolysis, Growth and Motility*. *Brain Sciences*, 2018. **8**(4): p. 56.
246. Feng, L., et al., *Synergistic cytotoxicity of cisplatin and Taxol in overcoming Taxol resistance through the inhibition of LDHA in oral squamous cell carcinoma*. *Oncol Lett*, 2015. **9**(4): p. 1827-1832.
247. Li, G., Y. Li, and D.-y. Wang, *Overexpression of miR-329-3p sensitizes osteosarcoma cells to cisplatin through suppression of glucose metabolism by targeting LDHA*. *Cell Biology International*, 2021. **45**(4): p. 766-774.
248. Shimanishi, M., et al., *Silencing of GLUT-1 inhibits sensitization of oral cancer cells to cisplatin during hypoxia*. *J Oral Pathol Med*, 2013. **42**(5): p. 382-8.
249. Galluzzi, L., et al., *Molecular mechanisms of cisplatin resistance*. *Oncogene*, 2012. **31**(15): p. 1869-83.
250. Silva, M.M., et al., *The balance between NRF2/GSH antioxidant mediated pathway and DNA repair modulates cisplatin resistance in lung cancer cells*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 17639.
251. Lee, J.G., et al., *Autophagy contributes to the chemo-resistance of non-small cell lung cancer in hypoxic conditions*. *Respir Res*, 2015. **16**: p. 138.

- 
252. 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).
253. Wakita, M., et al., *A BET family protein degrader provokes senolysis by targeting NHEJ and autophagy in senescent cells*. *Nat Commun*, 2020. **11**(1): p. 1935.
254. Bartoszewski, R., et al., *Primary endothelial cell-specific regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 and HIF-2 and their target gene expression profiles during hypoxia*. *FASEB J*, 2019. **33**(7): p. 7929-7941.
255. Wu, H.M., et al., *Hypoxia-induced autophagy mediates cisplatin resistance in lung cancer cells*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 12291.
256. Saint-Martin, A., et al., *Functional Interaction of Hypoxia-Inducible Factor 2-Alpha and Autophagy Mediates Drug Resistance in Colon Cancer Cells*. *Cancers (Basel)*, 2019. **11**(6).
257. Gener, P., et al., *Dynamism, Sensitivity, and Consequences of Mesenchymal and Stem-Like Phenotype of Cancer Cells*. *Stem Cells Int*, 2018. **2018**: p. 4516454.
258. Lu, W. and Y. Kang, *Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression and Metastasis*. *Dev Cell*, 2019. **49**(3): p. 361-374.
259. Hao, C., G. Liu, and G. Tian, *Autophagy inhibition of cancer stem cells promotes the efficacy of cisplatin against non-small cell lung carcinoma*. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*, 2019. **13**: p. 1753466619866097.
260. Abdul Rahim, S.A., et al., *Regulation of hypoxia-induced autophagy in glioblastoma involves ATG9A*. *Br J Cancer*, 2017. **117**(6): p. 813-825.
261. Niemann, B., et al. *Biologic Functions of Hydroxychloroquine in Disease: From COVID-19 to Cancer*. *Pharmaceutics*, 2022. **14**, DOI: 10.3390/pharmaceutics14122551.
262. Yao, J., et al., *Therapeutic effect of hydroxychloroquine on colorectal carcinogenesis in experimental murine colitis*. *Biochem Pharmacol*, 2016. **115**: p. 51-63.
263. Fukuda, T., et al., *The anti-malarial chloroquine suppresses proliferation and overcomes cisplatin resistance of endometrial cancer cells via autophagy inhibition*. *Gynecol Oncol*, 2015. **137**(3): p. 538-45.
264. Philip, R., E. Campbell, and D.N. Wheatley, *Arginine deprivation, growth inhibition and tumour cell death: 2. Enzymatic degradation of arginine in normal and malignant cell cultures*. *Br J Cancer*, 2003. **88**(4): p. 613-23.
265. Wheatley, D.N., *Controlling cancer by restricting arginine availability--arginine-catabolizing enzymes as anticancer agents*. *Anticancer Drugs*, 2004. **15**(9): p. 825-33.
266. Koushik, S., et al., *PAD4: pathophysiology, current therapeutics and future perspective in rheumatoid arthritis*. *Expert Opin Ther Targets*, 2017. **21**(4): p. 433-447.
267. Demkow, U. *Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Cancer Invasion, Evasion and Metastasis*. *Cancers*, 2021. **13**, DOI: 10.3390/cancers13174495.
268. Bouwman, P. and J. Jonkers, *The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance*. *Nat Rev Cancer*, 2012. **12**(9): p. 587-98.
269. Rocha, C.R.R., et al., *DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship*. *Clinics (Sao Paulo)*, 2018. **73**(suppl 1): p. e478s.
270. Cheng, Y., et al., *The Molecular Basis and Therapeutic Aspects of Cisplatin Resistance in Oral Squamous Cell Carcinoma*. *Front Oncol*, 2021. **11**: p. 761379.
271. Liu, G.Y., et al., *[Relationship between nucleotide excision repair gene ERCC1 and resistance to cisplatin in ovarian cancer]*. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 2008. **30**(3): p. 184-7.
272. Du, P., et al., *Lentivirus-Mediated RNAi silencing targeting ERCC1 reverses cisplatin resistance in cisplatin-resistant ovarian carcinoma cell line*. *DNA Cell Biol*, 2015. **34**(7): p. 497-502.
273. Li, W., et al., *ERCC1 siRNA ameliorates drug resistance to cisplatin in gastric carcinoma cell lines*. *Mol Med Rep*, 2014. **9**(6): p. 2423-8.

- 
274. Shang, X.B., et al., [*RNA interference silencing excision repair cross-complementing 1 gene and affecting cisplatin sensitivity on lung cancer cell lines*]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2008. **88**(39): p. 2799-802.
275. Inoue, A., et al., *A small molecule inhibitor of monoubiquitinated Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) inhibits repair of interstrand DNA cross-link, enhances DNA double strand break, and sensitizes cancer cells to cisplatin*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(10): p. 7109-7120.
276. Helbling-Leclerc, A., C. Garcin, and F. Rosselli, *Beyond DNA repair and chromosome instability—Fanconi anaemia as a cellular senescence-associated syndrome*. *Cell Death & Differentiation*, 2021. **28**(4): p. 1159-1173.
277. Sharifi, M.N., et al., *Autophagy Promotes Focal Adhesion Disassembly and Cell Motility of Metastatic Tumor Cells through the Direct Interaction of Paxillin with LC3*. *Cell Rep*, 2016. **15**(8): p. 1660-72.
278. Strzyz, P., *Autophagy consumes integrin junctions*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2016. **17**(4): p. 202-202.
279. Nishio, K. and A. Inoue, *Senescence-associated alterations of cytoskeleton: extraordinary production of vimentin that anchors cytoplasmic p53 in senescent human fibroblasts*. *Histochemistry and Cell Biology*, 2005. **123**(3): p. 263-273.
280. Murphy, J.M., et al., *Targeting focal adhesion kinase in cancer cells and the tumor microenvironment*. *Experimental & Molecular Medicine*, 2020. **52**(6): p. 877-886.
281. Mao, X., et al., *Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment: new findings and future perspectives*. *Molecular Cancer*, 2021. **20**(1): p. 131.
282. Zhou, J., Q. Yi, and L. Tang, *The roles of nuclear focal adhesion kinase (FAK) on Cancer: a focused review*. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2019. **38**(1): p. 250.
283. Rolain, J.M., P. Colson, and D. Raoult, *Recycling of chloroquine and its hydroxyl analogue to face bacterial, fungal and viral infections in the 21st century*. *Int J Antimicrob Agents*, 2007. **30**(4): p. 297-308.
284. Parks, S.K., Y. Cormerais, and J. Pouyssegur, *Hypoxia and cellular metabolism in tumour pathophysiology*. *J Physiol*, 2017. **595**(8): p. 2439-2450.
285. Pellegrini, P., et al., *Acidic extracellular pH neutralizes the autophagy-inhibiting activity of chloroquine: implications for cancer therapies*. *Autophagy*, 2014. **10**(4): p. 562-71.
286. Zhao, J., et al., *The role of interleukin-17 in tumor development and progression*. *J Exp Med*, 2020. **217**(1).
287. Amatya, N., A.V. Garg, and S.L. Gaffen, *IL-17 Signaling: The Yin and the Yang*. *Trends Immunol*, 2017. **38**(5): p. 310-322.
288. Onishi, R.M. and S.L. Gaffen, *Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease*. *Immunology*, 2010. **129**(3): p. 311-21.
289. Coffelt, S.B., et al., *IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis*. *Nature*, 2015. **522**(7556): p. 345-348.
290. Chen, X., et al., *Increased IL-17-producing cells correlate with poor survival and lymphangiogenesis in NSCLC patients*. *Lung Cancer*, 2010. **69**(3): p. 348-54.
291. Liu, J., et al., *IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **407**(2): p. 348-54.
292. Punt, S., et al., *The correlations between IL-17 vs. Th17 cells and cancer patient survival: a systematic review*. *Oncoimmunology*, 2015. **4**(2): p. e984547.
293. Gorczynski, R.M., *IL-17 Signaling in the Tumor Microenvironment*. *Adv Exp Med Biol*, 2020. **1240**: p. 47-58.
294. Zhang, L., et al., *Th17/IL-17 induces endothelial cell senescence via activation of NF- $\kappa$ B/p53/Rb signaling pathway*. *Lab Invest*, 2021. **101**(11): p. 1418-1426.


- 
295. Chen, A.Y., J.D. Wolchok, and A.R. Bass, *TNF in the era of immune checkpoint inhibitors: friend or foe?* Nat Rev Rheumatol, 2021. **17**(4): p. 213-223.
296. Kunisch, E., et al., *Predominant activation of MAP kinases and pro-destructive/pro-inflammatory features by TNF alpha in early-passage synovial fibroblasts via TNF receptor-1: failure of p38 inhibition to suppress matrix metalloproteinase-1 in rheumatoid arthritis.* Ann Rheum Dis, 2007. **66**(8): p. 1043-51.
297. Koelink, P.J., et al., *Anti-TNF therapy in IBD exerts its therapeutic effect through macrophage IL-10 signalling.* Gut, 2020. **69**(6): p. 1053-1063.
298. Housley, W.J., et al., *Natural but not inducible regulatory T cells require TNF-alpha signaling for in vivo function.* J Immunol, 2011. **186**(12): p. 6779-87.
299. Waters, J.P., J.S. Pober, and J.R. Bradley, *Tumour necrosis factor and cancer.* J Pathol, 2013. **230**(3): p. 241-8.
300. Caron, G., et al., *Human NK cells constitutively express membrane TNF-alpha (mTNFalpha) and present mTNFalpha-dependent cytotoxic activity.* Eur J Immunol, 1999. **29**(11): p. 3588-95.
301. Li, B., et al., *Low levels of tumor necrosis factor alpha increase tumor growth by inducing an endothelial phenotype of monocytes recruited to the tumor site.* Cancer Res, 2009. **69**(1): p. 338-48.
302. Walkiewicz, K., et al., *Znaczenie białek z rodziny ADAM w nowotworach złośliwych.* Advances in Hygiene & Experimental Medicine/Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej, 2016. **70**.
303. Landsberg, J., et al., *Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation.* Nature, 2012. **490**(7420): p. 412-6.
304. Torrey, H., et al., *Targeting TNFR2 with antagonistic antibodies inhibits proliferation of ovarian cancer cells and tumor-associated Tregs.* Sci Signal, 2017. **10**(462).
305. Baldwin, A.S., *Regulation of cell death and autophagy by IKK and NF-κB: critical mechanisms in immune function and cancer.* Immunological reviews, 2012. **246**(1): p. 327-345.
306. Chen, P.-M., et al., *Activation of NF-κB by SOD2 promotes the aggressiveness of lung adenocarcinoma by modulating NKX2-1-mediated IKKβ expression.* Carcinogenesis, 2013. **34**(11): p. 2655-2663.
307. Li, J., et al., *Association of constitutive nuclear factor-κB activation with aggressive aspects and poor prognosis in cervical cancer.* International Journal of Gynecologic Cancer, 2009. **19**(8).
308. Karin, M. and F.R. Greten, *NF-κB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression.* Nature reviews immunology, 2005. **5**(10): p. 749-759.
309. Ross, J.S., et al., *Expression of nuclear factor-κB and IκBα proteins in prostatic adenocarcinomas: correlation of nuclear factor-κB immunoreactivity with disease recurrence.* Clinical Cancer Research, 2004. **10**(7): p. 2466-2472.
310. Huber, M.A., et al., *NF-κB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression.* The Journal of clinical investigation, 2004. **114**(4): p. 569-581.
311. Li, Y., et al., *MiR-192/NKRF axis confers lung cancer cell chemoresistance to cisplatin via the NF-κB pathway.* Thorac Cancer, 2022. **13**(3): p. 430-441.
312. Chen, J., et al., *TAB3 overexpression promotes cell proliferation in non-small cell lung cancer and mediates chemoresistance to CDDP in A549 cells via the NF-κB pathway.* Tumour Biol, 2016. **37**(3): p. 3851-61.
313. Oiso, S., et al., *Involvement of NF-kappaB activation in the cisplatin resistance of human epidermoid carcinoma KCP-4 cells.* Oncol Rep, 2012. **28**(1): p. 27-32.
314. Salminen, A., A. Kauppinen, and K. Kaarniranta, *Emerging role of NF-κB signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP).* Cell Signal, 2012. **24**(4): p. 835-45.

- 
315. Takasugi, M., et al., *The role of cellular senescence and SASP in tumour microenvironment*. The FEBS Journal, 2023. **290**(5): p. 1348-1361.
316. Wang, H., et al., *NLRP6 targeting suppresses gastric tumorigenesis via P14 ARF &ndash;Mdm2&ndash;P53-dependent cellular senescence*. Oncotarget, 2017. **8**(67).
317. Liu, P., et al., *NOD-like receptor signaling in inflammation-associated cancers: From functions to targeted therapies*. Phytomedicine, 2019. **64**: p. 152925.
318. Romagnani, P., et al., *CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis*. Trends in Immunology, 2004. **25**(4): p. 201-209.
319. ŻEROMSKI, J., et al., *Rola receptorów NOD-podobnych w immunobiologii i medycynie*. 2017.
320. Huang, C.-F., et al., *NLRP3 inflammasome activation promotes inflammation-induced carcinogenesis in head and neck squamous cell carcinoma*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2017. **36**(1): p. 116.
321. Deng, Q., et al., *NLRP3 inflammasomes in macrophages drive colorectal cancer metastasis to the liver*. Cancer Letters, 2019. **442**: p. 21-30.
322. Owen, K.L., N.K. Brockwell, and B.S. Parker, *JAK-STAT Signaling: A Double-Edged Sword of Immune Regulation and Cancer Progression*. Cancers (Basel), 2019. **11**(12).
323. Yingchun, L., et al., *Antitumor Activity of Asiaticoside Against Multiple Myeloma Drug-Resistant Cancer Cells Is Mediated by Autophagy Induction, Activation of Effector Caspases, and Inhibition of Cell Migration, Invasion, and STAT-3 Signaling Pathway*. Med Sci Monit, 2019. **25**: p. 1355-1361.
324. Lyu, X., et al., *Hydroxychloroquine suppresses lung tumorigenesis via inducing FoxO3a nuclear translocation through STAT3 inactivation*. Life Sci, 2020. **246**: p. 117366.
325. Chen, M., et al., *Inhibition of JAK-STAT Signaling Pathway Alleviates Age-Related Phenotypes in Tendon Stem/Progenitor Cells*. Front Cell Dev Biol, 2021. **9**: p. 650250.
326. Bertram, J.S. and P. Janik, *Establishment of a cloned line of Lewis lung carcinoma cells adapted to cell culture*. Cancer Letters, 1980. **11**(1): p. 63-73.
327. Xu, B.L., et al., *In vivo growth of subclones derived from Lewis lung carcinoma is determined by the tumor microenvironment*. Am J Cancer Res, 2022. **12**(11): p. 5255-5270.
328. Zhao, M., T. Wang, and Z. Hui, *Aspirin overcomes cisplatin resistance in lung cancer by inhibiting cancer cell stemness*. Thoracic cancer, 2020. **11**(11): p. 3117-3125.
329. Kang, M.J., et al., *Comparison of responsiveness to cancer development and anti-cancer drug in three different C57BL/6N stocks*. Laboratory Animal Research, 2019. **35**(1): p. 17.
330. Kis, A., et al., *In Vivo Imaging of Hypoxia and Neoangiogenesis in Experimental Syngeneic Hepatocellular Carcinoma Tumor Model Using Positron Emission Tomography*. BioMed Research International, 2020. **2020**: p. 4952372.
331. Qian, J. and E.B. Rankin, *Hypoxia-Induced Phenotypes that Mediate Tumor Heterogeneity*. Adv Exp Med Biol, 2019. **1136**: p. 43-55.
332. van den Beucken, T., et al., *Hypoxia promotes stem cell phenotypes and poor prognosis through epigenetic regulation of DICER*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5203.
333. Zheng, Y., et al., *Lung Cancer Stem Cell Markers as Therapeutic Targets: An Update on Signaling Pathways and Therapies*. Frontiers in Oncology, 2022. **12**.

## 8 Opinia Komisji Bioetycznej lub Etycznej

### 8.1 Opinia Komisji Bioetycznej

**OPINIA**  
**nr 1072.6120.23.2021 z dnia 17 lutego 2021 roku**

  
UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Na zebraniu w dniu 17 lutego 2021 r. Komisja zapoznała się z wnioskiem z dnia 3 lutego 2021 r. złożonym:  
przez kierownika tematu: **dr n. med. Tomasz Gil**  
zatrudnionego **Klinika Chirurgii Klatki Piersiowej**  
**Instytut Fizjoterapii UJCM**  
**31 – 202 Kraków, ul. Prądnicka 80**

Komisja Bioetyczna  
Uniwersytetu  
Jagiellońskiego

oraz jego merytorycznym uzasadnieniem dotyczącym przeprowadzenia eksperymentu medycznego pt. „Rola autofagii i starzenia w chemooporności komórek nowotworowych: badania in vitro, in vivo i analiza materiału klinicznego”.

Do wniosku dołączono:

1. Protokół badania, wersja 1 z dnia 30.01.2021 r.
2. Informacja dla pacjenta, wersja 1 z dnia 30.01.2021 r.
3. Formularz świadomej zgody uczestnika badania, wersja 1 z dnia 30.01.2021 r.
4. Informacja o przetwarzaniu danych osobowych, wersja 1 z dnia 30.01.2021 r.
5. Oświadczenie uczestnika badania, wersja 1 z dnia 30.01.2021 r.
6. Zyciorys naukowy wnioskodawcy.
7. Lista piśmiennictwa.
8. Fiszka projektowa, wersja 1 z dnia 27.01.2021 r.
9. Formularz zgody na wykonywanie badań genetycznych, epigenetycznych i biobankowania, wersja 1 z dnia 30.01.2021 r.
10. Potwierdzenie złożenia dokumentacji
11. Oświadczenie o realizacji projektu w ramach prac badawczych UJ/UJCM, wersja 1 z dnia 30.01.2021 r.


Komisja wyraża pozytywną opinię w sprawie przeprowadzenia wnioskowanego badania - na warunkach określonych we wniosku oraz dodatkowo zastrzegając:  
1/ obowiązek uzyskania pisemnej zgody każdej osoby wyrażającej wolę (gotowość) udziału w badaniu, zgodnie z obowiązującymi przepisami,  
2/ obowiązek przedstawienia Komisji:  
- wszystkich zmian w protokole mających wpływ na przebieg oraz ocenę badania,  
- zawiadomienia o przyczynach przedwczesnego zakończenia badania,  
- sprawozdania w toku przeprowadzanych badań - co sześć miesięcy,  
- raportu końcowego.

Komisja Bioetyczna UJ przypomina, że każdy eksperyment medyczny wymaga zawarcia umowy ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej najpóźniej w dniu poprzedzającym dzień rozpoczęcia eksperymentu medycznego.

**Badanie może być prowadzone do dnia 16 lutego 2022 roku.**  
**Skład i działanie Komisji zgodne z GCP oraz wymogami lokalnymi. Lista członków Komisji biorących udział w podjęciu uchwały stanowi załącznik do niniejszego dokumentu.**

Kraków, dnia 17 lutego 2021 r.

ul. Skawińska 8  
31-066 Kraków  
tel. + 48 (12) 433 27 39  
+ 48 (12) 433 27 43  
kbet@cm-uj.krakow.pl  
www.kbet.cm-uj.krakow.pl

  
dr n. med. Dominik Łuski  
przewodniczący

**OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ  
DO WYŁĄCZNEGO WYKORZYSTANIA  
DLA CELÓW STATUTOWYCH  
UNIWERSYTETU JAGIELLOŃSKIEGO**

## 8.2 Opinia 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 Mielenska - 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

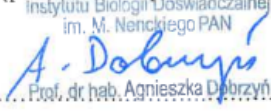
Projekt doświadczenia na zwierzętach objęty wnioskiem (lub jego część):

- 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, pieczęć 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.

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

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. Anniuszka Dobrzyń  
(data, pieczęć, 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 Mielęską-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 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>.

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.

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

### 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:	
<b>Dane osoby, która pozyska zwierzęta w przypadku zwierząt dzikich</b>		
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 chemioterapie (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 utlenowanie tkanek - trispyrofosforan mio-inozytoli (ITPP) wpływają na efektywność chemioterapii w kontekście starzenia.** Eksperymenty przeprowadzimy z użyciem komórek raka płuc i raka nerki. Proponowany eksperyment będzie polegał na podaniu komórek rakowych podskórnym, 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

---

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

## 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, szczep, 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 utlenowanie tkanek - ITTPP 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)

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

#### 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 ± 22°C, wilgotnością ± 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.

31.03.2021  
.....  
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></p> <p>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 łędźwiową 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.

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

<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>		

10

<b>Nazwa procedury:</b> Ocena wzrostu implantowanych komórek nowotworowych Renca 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/cmdb	<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 (Acrane, 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 cisplatiną (1 mg/kg) rozpuszczaną w PBS ( <b>wersja B</b> ). Winblastyna będzie podawana dootrzewnowo 1 raz na tydzień, a cisplatina 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 cisplatiną (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 cisplatiną (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 cisplatiną (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:</b> Eutanazja		
<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 ścisaniu 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 wybudzenia 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. PoLASA ,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. PoLASA, 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 **Reduction** (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 **Replacement** (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., *Fucoxanthin 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. 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.  
 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) (2)	Rak, chemioterapia, starzenie, autofagia, niedotlenienie	
<b>Cel projektu</b> (2) (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 te 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, niedotlenienie 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-inozytoli (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	



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).		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 wystąpięć na konferencjach naukowych, a także podczas działalności popularnonaukowej, dzięki której wyniki naszych prac mogą dotrzeć do szerokiej opinii publicznej.				
<b>Przewidywane szkody</b>						
W jakich procedurach będą zazwyczaj stosowane zwierzęta (na przykład wstrzykiwanie, zabiegi chirurgiczne)? Proszę wskazać liczbę i czas trwania tych procedur.		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.				
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?		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.				
Zgodnie z przewidywaniami jakie gatunki i jaka liczba zwierząt będą wykorzystywane? Jaka jest oczekiwana	<b>Gatunki</b> (4)	<b>Szacunkowa całkowita liczba</b>	<b>Szacunkowa liczba dla każdej kategorii dotkliwości</b>			
	Terminalne	Łagodne	Umiarkowane	Dotkliwe		
Mysz		99			99	

dotkliwość i liczba zwierząt w każdej kategorii dotkliwości (w podziale na gatunki)?						
Co stanie się ze zwierzętami utrzymanymi przy życiu po zakończeniu procedury? (5) (6)	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 z 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 szansę 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 uspieniu 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>Eksperymenty 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 utlenianie tkanek - ITPP w kontekście eliminacji komórek starych i/ lub zahamowania ucieczki od starzenia komórek rakowych</p>

5

		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>				