



UMCS

WYDZIAŁ BIOLOGII I BIOTECHNOLOGII

UNIwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Wydział Biologii i Biotechnologii

Kierunek: **Biotechnologia**

Mateusz Pięt

nr albumu: 983950

Kwas ursolowy i oleanolowy jako substancje ograniczające migrację komórek ludzkiego raka jelita grubego *in vitro*

(Ursolic and oleanolic acids as agents restraining
migration of human colorectal cancer cells *in vitro*)

ROZPRAWA DOKTORSKA

wykonana w Zakładzie Wirusologii i Immunologii

pod kierunkiem

dr hab. Romana Paducha, prof. UMCS

LUBLIN 2019

Spis treści

Wykaz skrótów i skrótowców	5
1. Wprowadzenie	10
1.1. Nowotwór	10
1.1.1. Informacje ogólne	10
1.1.1.1. Cechy nowotworu	12
1.1.1.2. Nowotworowe komórki macierzyste	15
1.1.1.3. Mikrośrodowisko nowotworu	16
1.1.1.4. Stan zapalny	21
1.1.2. Proces kancerogenezy	24
1.1.3. Mechanizm przerzutowania	28
1.1.3.1. Mikrośrodowisko a przerzut	29
1.1.3.2. Stan zapalny a przerzut	29
1.1.3.3. Przejście epitelialno-mezenchymalne (EMT)	30
1.1.3.4. Uwolnienie komórek z guza, inwazja	33
1.1.3.5. Transport naczyniami krwionośnymi	35
1.1.3.6. Lokalna inwazja, MET, utworzenie guza wtórnego	37
1.1.4. Regulacja procesu przerzutowania	39
1.1.4.1. Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs)	39
1.1.4.2. Układ uPA/uPAR	46
1.1.4.3. Białka podrodziny Rho	48
1.1.4.4. Cyklooksygenaza-2	52
1.1.5. Lekooporność nowotworów	56
1.1.5.1. Białka oporności wielolekowej (MDR)	57
1.1.6. Wzajemna regulacja czynników zaangażowanych w przerzutowanie	60
1.2. Rak jelita grubego	62
1.2.1. Epidemiologia	62
1.2.2. Patogeneza	63
1.2.3. Stadia nowotworu	63
1.2.4. Etiologia	64
1.2.5. Objawy, diagnoza, biomarkery i leczenie	67
1.3. Terapie przeciwnowotworowe	68
1.3.1. Rutynowe terapie	68
1.3.1.1. Kamptotecyna-11	69

1.3.2. Nowoczesne terapie przeciwnowotworowe.....	71
1.3.3. Substancje o potencjale terapeutycznym	73
1.3.4. Pentacykliczne triterpenoidy jako przykład substancji o potencjale przeciwnowotworowym.....	73
2. Hipotezy badawcze	76
3. Materiały i metody	77
3.1. Materiały.....	77
3.1.1. Linie komórkowe	77
3.1.1.1. Zakładanie hodowli w kokulturach.....	78
3.1.2. Badane związki	79
3.2. Metody.....	80
3.2.1. Barwienie May-Grünwalda-Giemsy	80
3.2.2. Barwienie fluorescencyjne cytoszkieletu.....	81
3.2.3. Efekt cytotoksyczny	81
3.2.3.1. Metoda NR.....	82
3.2.3.2. Metoda MTT	82
3.2.4. Właściwości antyproliferacyjne.....	83
3.2.4.1. Metoda MTT.....	83
3.2.4.2. Klonalność	83
3.2.4.3. Czas podwojenia generacji (DT)	84
3.2.5. Aktywność immunomodulacyjna	84
3.2.5.1. Ocena ilości wytworzonego tlenu azotu – metoda Griess’a	84
3.2.5.2. Ocena ilości produkowanych cytokin – metoda ELISA.....	85
3.2.6. Właściwości hamowania migracji komórek	86
3.2.6.1. Metoda rysy (wound assay)	86
3.2.6.2. Metoda migracji przez pory membran (chamber migration assay)	86
3.2.7. Hamowanie aktywności białek zaangażowane w migrację, inwazję i oporność lekową	87
3.2.7.1. ELISA	87
3.2.7.2. Zymografia żelatynowa	87
3.2.7.3. Aktywność fibrynolityczna.....	88
3.2.7.4. Immunofluorescencja.....	90
3.2.7.5. Western Blotting (WB, immunoblotting)	91
3.2.8. Ocena efektu synergistycznego.....	92
3.2.9. Analiza statystyczna.....	93
4. Wyniki	94

4.1. Screening	94
4.2. Podstawowe właściwości przeciwnowotworowe	97
4.2.1. Efekt cytotoksyczny	98
4.2.2. Zahamowanie proliferacji	99
4.2.3. Immunomodulacja i właściwości przeciwzapalne	102
4.3. Zahamowanie migracji	108
4.4. Wpływ substancji na białka i szlaki zaangażowane w progresję nowotworu	110
4.4.1. Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej	111
4.4.2. Białka podrodziny Rho	123
4.4.3. Cyklooksygenaza-2	129
4.4.4. E-kadheryna	130
4.4.5. Białko związane z opornością wielolekową	131
4.5. Podsumowanie wyników	133
5. Dyskusja	136
5.1. Podstawowe właściwości przeciwnowotworowe	136
5.2. Zahamowanie migracji	139
5.3. Wpływ substancji na białka i szlaki zaangażowane w progresję nowotworu	141
5.3.1. Szlak metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej oraz cyklooksygenazy-2	141
5.3.2. Białka podrodziny Rho	144
5.3.3. E-kadheryna (CDH1)	146
5.3.4. Białko związane z opornością wielolekową (MRP)	147
6. Podsumowanie	150
7. Bibliografia.....	151
Spis rysunków.....	164
Spis tabel	168
Streszczenie.....	170
Abstract.....	171
Tablice	172
Podziękowania	184

Wykaz skrótów i skrótowców

WHO – światowa organizacja zdrowia (ang. World Health Organization)

HPV – wirus ludzkiego brodawczaka (ang. human papilloma virus)

HSV – wirus opryszczki (ang. herpes simplex virus)

EBV – wirus Ebsteina-Barr (ang. Epstein-Barr virus)

HTLV-1 – ludzki wirus białaczki z komórek T typu 1 (human T-cell leukemia type 1 virus)

HBV – wirusy zapalenia wątroby B (ang. hepatitis B virus)

HCV – wirusy zapalenia wątroby C (ang. hepatitis C virus)

p53 – białko supresorowe, tzw. “strażnik genomu” (kodowane przez gen *TP53*)

pRb – białko retinoblastomy (ang. retinoblastoma protein), białko supresorowe (kodowane przez gen *pRB*)

APC – białko gruczolakowatej polipowatości okrężnicy (ang. adenomatous polyposis coli), białko supresorowe (kodowane przez gen *APC*)

Ras – białko onkogenne (nazwa pochodzi od *rat sarcoma*, czyli mięsak szczurzy)

Raf – kinaza białkowa, białko onkogenne

Myc – białko onkogenne

Wnt – białko onkogenne, regulujące szlaki kancerogenezy (nazwa pochodzi od genów *Wn* (*wingless*) i *Int* u *Drosophila melanogaster*)

MMR – naprawa nieprawidłowo sparowanych zasad (ang. mis-match repair), system naprawy DNA

NER – naprawa przez wycinanie nukleotydu (ang. nucleotide-excision repair), system naprawy DNA

BER – naprawa przez wycinanie zasady (ang. base-excision repair), system naprawy DNA

NK – komórka immunologiczna NK, naturalny zabójca (ang. natural killer)

VEGF – czynnik wzrostu śródbłónka naczyń (ang. vascular endothelial growth factor)

iNOS – indukowalna syntaza tlenu azotu (ang. inducible nitric oxide synthase); synonim: NOS2

NOS2 – syntaza tlenu azotu 2 (ang. nitric oxide synthase 2); synonim: iNOS

COX-2 – cyklooksygenaza-2 (ang. cyclooxygenase-2); synonim: PTGS-2

TME – mikrośrodowisko guza nowotworowego (ang. tumour microenvironment)

CAF – fibroblast związany z nowotworem (ang. cancer associated fibroblast)

TAM – makrofag związany z nowotworem (TAM, ang. tumour associated macrophage)

MSC – komórki mezenchymalne związane z mikrośrodowiskiem (ang. mesenchymal stromal cells)

MDSC – komórka supresorowa pochodząca z mezenchymalnych (MDSC, mesenchymal-derived suppressor cell)

IL – interleukina (ang. interleukin)

TNF- α – czynnik martwicy nowotworu α (ang. tumour necrosis factor α)

EGF – czynnik wzrostu naskórka (ang. epidermal growth factor)

HGF – czynnik wzrostu hepatocytów (ang. hepatocyte growth factor)

IGF-1 – insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (ang. insulin-like growth factor 1)

FGF – czynnik wzrostu fibroblastów (ang. fibroblast growth factor)

PDGF – płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. platelet-derived growth factor)

TGF- β – transformujący czynnik wzrostu β (ang. transforming growth factor)

α -SMA – α -aktyna mięśni gładkich (ang. α smooth muscle actin)

HIF-1 – czynnik indukowany hipoksją 1 (ang. hypoxia-inducible factor)

PHD – zależne od tlenu białko posiadające domeny hydroksylazy prolinowej (ang. prolyl hydroxylase domain-containing protein)

VHL – białko Von Hippel-Lindaua

FIH – czynnik hamujący HIF (ang. factor inhibiting HIF)

BNIP3 – białko antyapoptotyczne

EPO – erytropoetyna

uPA – urokinazowy aktywator plazminogenu (ang. urokinase plasminogen activator)

CTGF – czynnik wzrostu tkanki łącznej (ang. connective tissue growth factor)

ECM – macierz zewnątrzkomórkowa (ang. extracellular matrix)

ZEB1 – homeoboks 1 wiążący kasetę E palca cynkowego (ang. zinc finger E-box binding homeobox 1), szlak molekularny zaangażowany w indukcję EMT

CDH1 – kadheryna 1 (ang. cadherin 1); synonim: E-kadheryna

CDH2 – kadheryna 2 (ang. cadherin 2); synonim: N-kadheryna

ZO-1 – zonula occludens 1; białko tworzące połączenia międzykomórkowe typu zwierającego

PTEN – homolog fosfatazy i tensyny (ang. phosphatase and tensin homolog), inhibitor szlaku PI3K/Akt

Shh – szlak molekularny (ang. Sonic hedgehog)

Rho – rodzina białek będących homologiem Ras (ang. Ras homolog gene family)

miRNA – mikroRNA (ang. microRNA)

CAT – przejście kolektywno-ameboidalne (ang. collective to ameboid transition)

MAT – przejście mezenchymalno-ameboidalne (MAT, mesenchymal to ameboid transition)

CXCL – grupa chemokin (ang. C-X-C motif chemokine ligand)

GM-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (ang. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)

CXCR1 – receptor chemokin (ang. C-X-C motif chemokine receptor)

CCL – grupa chemokin (ang. C-C motif chemokine ligand)

ADAM – metaloproteinaza (ang. a disintegrin and metalloproteinase), inaczej adamlizyna

PI3K – kinaza-3 fosfatydyloinozytolu (ang. phosphatidylinositol 3-kinase)

Akt – kinaza białkowa, regulowana przez PI3K

MAPK – kinaza białkowa aktywowana mitogenem (ang. mitogen-activated protein kinase)

ERK – kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym (ang. extracellular signal-regulated kinase)

FAK – kinaza kontaktów ogniskowych (ang. focal adhesion kinase)

Bcl-XL – białko antyapoptotyczne

Bim – białko proapoptotyczne

BM – błona podstawna (ang. basement membrane)

CD44 – glikoproteina, receptor dla kwasu hialuronowego

MET – przejście mezenchymalno-epitelialne (ang. mesenchymal-epithelial transition)

KLKs – rodzina peptydaz związanych z kalikreiną (ang. kallikrein-related peptidases)

uPAR – receptor uPA (urokinazowego aktywatora plazminogenu) (ang. urokinase plasminogen activator receptor)

tPA – tkankowy aktywator plazminogenu (ang. tissue plasminogen activator)

ROS – reaktywne formy tlenu (ang. reactive oxygen species)

JNK – c-Jun N-terminalna kinaza (ang. c-Jun N-terminal kinase)

PLAU – gen kodujący urokinazowy aktywator plazminogenu (uPA)

GPI – glikozylofosfatydyloinozytol, cząsteczka kotwicząca

PAI – inhibitor aktywatora plazminogenu (ang. plasminogen activator inhibitor)

MMP – metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. matrix metalloproteinase)

MT-MMP – błonowa metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. membrane-type matrix metalloproteinase)

TIMP – tkankowy inhibitor metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. tissue inhibitor of matrix metalloproteinases)

RECK – białko bogate w cysteinę indukujące powrót do postaci pierwotnej (ang. reversion-inducing cysteine-rich protein), inhibitor metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej

GAP – białko stymulujące aktywność GTPazową małych białek G (ang. GTP-ase activating protein), inhibitor białek Rho

GEF – czynnik wymiany nukleotydów guaninowych (ang. guanine nucleotide exchange factor), aktywator białek Rho

GDI – białko hamujące spontaniczną dysocjację nukleotydów guaninowych (GDIs, ang. guanine nucleotide dissociation inhibitor), inhibitor białek Rho

PIP2 – fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan

PIP3 – fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforanu

RTK – receptorowa kinaza tyrozynowa (ang. receptor tyrosine kinase)

ROCK – kinaza białkowa związana z białkami Rho (ang. Rho-associated protein kinase)

mDia – ssaczy homolog genu *diaphanous* (ang. mammalian homolog of diaphanous), efektor białek Rho

LIMK – kinaza LIM

FA – kontakt ogniskowy (ang. focal adhesion)

FITC – izotiocyjanian fluoresceiny (ang. fluorescein isothiocyanate), fluorofor

CDK – kinaza zależna od cyklin (ang. cyclin-dependent kinase)

YAP – białko towarzyszące kinazie Yes (ang. Yes-associated protein)

TEAD – czynnik transkrypcyjny wiążący YAP (ang. TEA domain family members)

GLUT – transporter glukozy (ang. glucose transporter)

CSC – nowotworowa komórka macierzysta (ang. cancer stem cell)

5-LOX – 5-lipooksygenaza (ang. 5-lipoxygenase)

NF-κB – czynnik jądrowy κB (ang. nuclear factor κB)

STAT – czynnik transkrypcyjny

PGE2 – prostaglandyna E2 (ang. prostaglandin E2)

RNS – reaktywne formy azotu (ang. reactive nitrogen species)

RONs – reaktywne formy tlenu i azotu (ang. reactive oxygen and nitrogen species)

PTGS – syntaza prostaglandin (ang. prostaglandin-endoperoxidase synthase), synonim: COX

LPS – lipopolisacharyd (ang. lipopolysaccharide)

DCA, DOX – kwas deoksycholowy (ang. deoxycholic acid), wtórny kwas żółciowy

PLC – fosfolipaza C (ang. phospholipase C)

IP3 – trifosforan inozytolu (ang. inositol triphosphate)

EP – receptor PGE2

cAMP – cykliczny adenylozomonofosforan

PKA – kinaza białkowa A (ang. protein kinase A)

EGR – białko odpowiedzi wczesnego wzrostu (ang. early growth response protein)

Bcl-2 – białko antyapoptotyczne

EGFR – receptor dla czynnika wzrostu naskórka (ang. epidermal growth factor receptor)

NLPZ – niesteroidowe leki przeciwwzapalne

AC – cyklaza adenylowa (ang. adenylyl cyclase)

IAP – białko hamujące apoptozę (ang. inhibitor of apoptosis protein)

Tcf-4 – czynnik transkrypcyjny wiążący β -aktynę

MDR – oporność wielolekowa (ang. multidrug resistance)

EV – pęcherzyk pozakomórkowy (ang. extracellular vesicle)

ABC – transportery wiążące ATP (ang. ATP-binding cassetes)

mtDNA – DNA mitochondrialne

P-gp – glikoproteina P (ang. glycoprotein P); białko oporności wielolekowej (MDR)

BCRP – białko oporności raka piersi, ang. breast cancer resistance protein; białko oporności wielolekowej (MDR)

TMD – domena transmembranowa białka MRP (ang. transmembrane domain; inna nazwa: **MSD**, ang. membrane-spanning domain)

NBD – domena wiążąca nukleotydy (ang. nucleotide-binding domain); domena białka MRP

ABCC – podrodzina C białek ABC; inna nazwa: MRP

MRP – białko związane z opornością wielolekową (multidrug resistance-associated protein)

IARC – Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (ang. International Agency for Research on Cancer)

ESMO – Europejskie Towarzystwo Onkologii Medycznej (ang. European Society for Medical Oncology)

CRC – rak jelita grubego (ang. colorectal cancer)

CIMP – komórek o fenotypie metylacji w obrębie wysp CpG (ang. CpG island methylator phenotype)

TNM – klasyfikacja stadiów nowotworu

IBD – niespecyficzne zapalenie jelit (ang. inflammatory bowel disease)

CIN – niestabilności chromosomalnej (ang. chromosomal instability)

MGMT – metylotransferazy metyloguaninowa DNA (ang. methylguanine DNA methyltransferase)

LTA – kwas litocholowy (ang. lithocholic acid)

Neu5Gc – kwas N-glikoliloneuraminowy (ang. N-glycolylneuraminic acid), pochodna kwasu sjałowego

gFOBT – enzymatyczny test na krew utajoną w stolcu

FIT – immunochemiczny test na krew utajoną w stolcu

MSI – niestabilność mikrosatelitarna (ang. microsatellite instability)

UGT – UDP-glukuronylotransferaza (ang. UDP-glucunoryltransferase)

mAb – przeciwciało monoklonalne (ang. monoclonal antibody)

TKI – inhibitory kinaz tyrozynowych (ang. tyrosine kinase inhibitors)

PDT – terapia fotodynamiczna (ang. photodynamic therapy)

UA – kwas ursolowy (ang. ursolic acid)

OA – kwas oleanolowy (ang. oleanolic acid)

CPT-11 – kamptotecyna-11 (ang. camptothecin-11)

FBS – płodowa surowica bydlęca (ang. fetal bovine serum)

NR – barwnik czerwień obojętna (ang. neutral red); metoda NR – metoda z wykorzystaniem barwnika NR w celu oceny żywotności komórek (badanie efektu cytotoksycznego)

MTT – bromek 3-(4,5-dwumetylotiazylo-2-yl)-2,5-dwufenylotetrazolu, sól tetrazoliowa; metoda MTT – metoda z wykorzystaniem soli terazoliowej MTT w celu oznaczenia żywotności lub tempa proliferacji komórek

DMSO – dimetylosulfotlenek (ang. dimethyl sulfoxide)

PBS – roztwór soli fizjologicznej buforowany fosforanami (ang. phosphate buffered saline)

DT – czas podwojenia generacji, ang. doubling time

ELISA – metoda immunoenzymatyczna (ang. enzyme-linked immunosorbent assay)

PIC – koktajl inhibitorów proteaz (ang. protease inhibitor cocktail)

NBT – chlorek 2,2'-bis(4-nitrofenylo)-5,5'-difenylo-3,3'-(3,3'-dimethoksy-4,4'-difenyleno)ditetrazolu (Nitrotetrazolium Blue chloride)

BCIP – fosforan 5-bromo-4-chloro-3-indolilu (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)

HRP – peroksydaza chrzanowa (ang. horseradish peroxidase)

AP – fosfataza alkaliczna (ang. alkaline phosphatase)

CI – combination index

IF – immunofluorescencja, metoda immunofluorescencyjna (ang. immunofluorescence)

WB – metoda Western Blotting

NOX2 – oksydaza NADPH 2 (ang. NADPH oxidase 2)

TNBS – kwas trinitrobenzosulfonowym (ang. trinitrobenzenesulfonic acid)

TLR – receptor Toll-podobny (ang. Toll-like receptor)

GEM – gemcytabina, cytostatyk

mTOR – ssaczy cel rapamycyny (ang. mammalian target of rapamycin), kinaza uczestnicząca w wielu szlakach molekularnych

Bax – białko proapoptotyczne

p21 – inhibitor kinaz zależnych od cyklin

p38 – kinaza MAPK

Twist – szlak molekularny zaangażowany w indukcję EMT

Snail – szlak molekularny zaangażowany w indukcję EMT

Slug – szlak molekularny zaangażowany w indukcję EMT

MEK – kinaza aktywująca ERK (ang. MAPK/ERK kinase)

5-FU – 5 fluorouracyl, cytostatyk

CHX – cykloheksymid, cytostatyk

OXL – oksaliplatyna, cytostatyk

Top1 – topoizomeraza I

EMT – przejście epitelialno-mezenchymalne (epithelial-mesenchyma transduction)

TAN – neutrofil związany z nowotworem (ang. tumour associated neutrophil)

DC – komórka dendrytyczna (ang. dendritic cell)

PAR – receptor aktywowany proteazami (ang. protease activated receptor)

Serpina – inhibitor proteaz serynowych (ang. *serine* protease *inhibitor*)

HA – kwas hialuronowy (ang. hyaluronic acid)

FAP – rodzinna polipowatość gruczolakowata (ang. familial adenomatous polyposis)

CE – karboksylesteraza (ang. carboxylesterase)

1. Wprowadzenie

Nowotwory złośliwe są jedną z głównych, obok chorób krążenia, przyczyn zgonów pacjentów w Polsce i na świecie. Mimo szeroko zakrojonych badań dotyczących etiologii, diagnostyki i leczenia chorób nowotworowych, jak również prowadzonymi strategiami profilaktycznymi, każdego roku na świecie odnotowuje się coraz więcej zachorowań i zgonów wywołanych tą chorobą. Według danych WHO (Światowej Organizacji Zdrowia, ang. World Health Organization) w roku 2018 przewidziano około 18 milionów nowych przypadków i ponad 9 milionów zgonów [<http://www.who.int/cancer/en/>]. Nowoczesne terapie dają nadzieję na powodzenie w walce z nowotworami, często jednak nie są one wystarczająco skuteczne lub ich swoistość obejmuje niewielką grupę nowotworów lub pacjentów. Obiecującym podejściem leczniczym jest prowadzenie terapii skojarzonej, czyli takiej, w której wykorzystywana jest więcej, niż jedna substancja czynna. Wiele czynników pochodzenia naturalnego oraz ich naturalne, syntetyczne czy półsyntetyczne pochodne wykazują właściwości przeciwnowotworowe. Mogą one ingerować w określone szlaki molekularne związane z nowotworzeniem, powodując zahamowanie rozwoju lub wręcz remisję guza. Ponadto, substancje takie mogą zwiększać efektywność rutynowych terapii przeciwnowotworowych, a nawet wykazywać działanie ochronne na prawidłowe tkanki pacjenta.

1.1. Nowotwór

1.1.1. Informacje ogólne

Nowotwór jest chorobą znaną już od starożytności. Grecka nazwa, *neoplasma*, zaproponowana została przez Hipokratesa. Podstawą choroby jest zaistnienie zmian w materiale genetycznym. Mogą one być wywołane przez czynniki zwane kancerogenami. Podzielić je można na:

- a) czynniki fizyczne (promieniowanie elektromagnetyczne, γ , X, UV);
- b) czynniki chemiczne (azbest, arsen, N-nitrozozwiązki, składniki dymu tytoniowego);
- c) czynniki biologiczne (wewnętrzne, takie jak nieprawidłowe funkcjonowanie układu hormonalnego oraz zewnętrzne: leki hormonalne oraz patogeny: wirusy (wirus ludzkiego brodawczaka (HPV, ang. human papilloma virus), wirus opryszczki

(HSV, ang. herpes simplex virus), wirus Ebsteina-Barr (EBV, ang. Epstein-Barr virus), ludzki wirus białaczki z komórek T typu 1 (HTLV-1, ang. human T-cell leukemia type 1 virus) czy wirusy zapalenia wątroby B i C (HBV, HCV, ang. hepatitis B(C) virus)), bakterie (*Helicobacter pylori*) oraz pasożyty (przywry z rodzaju *Schistosoma*, *Opisthorchis*, *Clonorchis*, pierwotniaki takie jak zarodźce (*Malaria spp*) czy świdrowiec amerykański (*Trypanosoma cruzi*)) [Kordek i in., 2007; Gołąb i in., 2015; Collier i in., 2001; Strickertsson i in., 2017; Botelho i in., 2013; van Tong i in., 2017].

Nowotwory można podzielić na łagodne i złośliwe. Nowotwory łagodne zwykle nie zagrażają życiu, relatywnie łatwo można je usunąć chirurgicznie – często mają regularny kształt, otoczone są torebką łącznotkankową, nie ulegają one unaczynieniu, przez co osiągnąć mogą tylko określoną wielkość. Z kolei, nowotwory złośliwe są jedną z głównych przyczyn zgonów. Mogą one powstawać z łagodnych zmian lub *de novo*. Wykazują one nieregularną budowę, dzięki ich unaczynieniu mogą osiągać praktycznie nieograniczoną wielkość, gdyż wymiana tlenu, metabolitów i substancji odżywczych zachodzi już nie tylko na drodze dyfuzji prostej, lecz także z wykorzystaniem naczyń krwionośnych. Ponadto, nowotwory złośliwe mają zdolność naciekania pobliskich tkanek, a także przerzutowania, czyli przemieszczania się do często odległych organów. Do tego rodzaju nowotworów należą:

- a) rak (*carcinoma*), inaczej nabłoniak, pochodzący z tkanki nabłonkowej (stanowi ok. 80% nowotworów złośliwych);
- b) mięsak (*sarcoma*), w tym kostniakomięsak (*osteosarcoma*), pochodzący z tkanki pozanabłonkowej, łącznej, głównie tkanek miękkich czy kości;
- c) nowotwory złośliwe układu nerwowego, głównie glejak (*glioma*), pochodzący z tkanki nerwowej;
- d) chłoniak (*lymphoma*), wywodzący się z tkanki chłonnej;
- e) białaczka (*lymphoma*), której komórki powstają z układu krwiotwórczego;
- f) czerniak (*melanoma*), wywodzący się z tkanki barwnikotwórczej;
- g) potworniak (*teratoma*), powstały z komórek zarodkowych [Ye, Weinberg, 2015; Kordek i in., 2007].

1.1.1.1. Cechy nowotworu

Komórki nowotworów złośliwych wykazują zestaw charakterystycznych cech (Ryc. 1). Aby nowotwór mógł się rozwinąć, musi zajść szereg określonych zmian w materiale genetycznym podatnej komórki. Nowotwory złośliwe charakteryzują się wobec tego niestabilnością genetyczną. Zachodzą w nich kolejne mutacje, które mogą prowadzić do ich śmierci, jak również do nabycia nowych cech lub wzmocnienia tych już istniejących. Zmiany takie w konsekwencji przyspieszają rozwój (progresję) choroby. Ponadto, w komórkach nowotworowych inaktywacji ulegają systemy naprawy DNA [Hanahan, Weinberg, 2011].

W wyniku zaburzenia szlaków regulacji cyklu komórkowego, dochodzi do przyspieszenia podziałów komórkowych (prolifracji komórek) poprzez nadekspresję czynników promujących ten proces i zmniejszoną ekspresję lub wręcz inaktywację czynników ograniczających. Ponadto, komórki nowotworowe tracą cechę zahamowania kontaktowego. Proces ten występuje w komórkach prawidłowych i związany jest z istotnym ograniczeniem podziałów komórkowych w wyniku braku dostępnej powierzchni wzrostowej lub uformowania ostatecznej postaci tkanki. Dochodzi wtedy do wysyłania sygnałów hamujących proliferację. W przypadku komórek nowotworowych cecha ta zostaje utracona, a komórki niezależnie od uzyskiwanych sygnałów będą dalej proliferować. Prowadzić to może do zaburzenia architektury tkanki i narządu, a w konsekwencji do powstawania guzów nowotworowych, będących strukturami patologicznymi zaburzającymi funkcjonowanie całego organizmu. W nowotworze dochodzi do dwóch kluczowych zjawisk – hiperplazji, czyli zwiększonej proliferacji (niekiedy używa się wręcz stwierdzenia hiperprolifracja) oraz dysplazji, czyli nieregularnych podziałów komórkowych w wyniku zaburzenia mechanizmów kontroli cyklu komórkowego [Hanahan, Weinberg, 2011].

Jednym z kluczowych mechanizmów zachowania homeostazy w organizmie jest proces apoptozy, czyli programowanej śmierci. Komórki, w których doszło do poważnych uszkodzeń, uległy infekcji wirusowej lub po prostu „zestarzały się”, wchodzą na szlak apoptozy. Ich DNA ulega fragmentacji, elementy komórkowe zamykane są w pęcherzyki – ciała apoptotyczne – i trawione. Komórka umiera, nie czyniąc szkody pobliskim tkankom, a jej miejsce zajmowane jest przez „nową” komórkę. Szlak apoptozy może być indukowany przez samą komórkę w wyniku

aktywacji określonych szlaków molekularnych. Komórka może też być „zmuszana” do aktywacji apoptozy, np. poprzez aktywność limfocytów T. Limfocyt wytwarza czynniki, które indukują programowaną śmierć komórki docelowej: granzym i perforyny, dochodzi też do wiązania czynnika FasL obecnego na powierzchni błony limfocytu z jego receptorem na komórce docelowej [Gołąb i in., 2015]. Apoptoza jest regulowana między innymi przez białka pro- i anty-apoptotyczne. Przewaga tych pierwszych skutkuje śmiercią komórki, natomiast tych drugich – przeżyciem. W przypadku komórek nowotworowych, dochodzi do zmniejszenia ilości i ekspresji białek pro-, a zwiększenia – białek anty-apoptotycznych. Z tego względu, nawet otrzymanie sygnału do śmierci nie zapoczątkuje w komórce nowotworowej procesu apoptozy.

Każda komórka posiada określony czas życia. Na starzenie się samych komórek, jak i całego organizmu wpływ ma kilka mechanizmów. Jednym z nich jest skracanie telomerów. Telomery to element zbudowany z zasad nukleinowych, znajdujący się na końcu chromosomu i zabezpieczający przed jego uszkodzeniem. Z każdym podziałem komórkowym dochodzi do ich skracania. Komórki nowotworowe odtwarzają telomery w wyniku aktywności enzymu – telomerazy. Dzięki temu uzyskują one „nieśmiertelność” czyli teoretycznie, w sprzyjających warunkach, mogą one przechodzić podziały w nieskończoność [Hanahan, Weinberg, 2011].

Charakterystyczną cechą rozwijającego się guza nowotworowego jest wzrost zapotrzebowania na tlen i substancje odżywcze, jak również zintensyfikowane uwalnianie produktów przemiany materii zakwaszających mikrośrodowisko patologicznej masy. Jeżeli tlen i substancje odżywcze nie będą doprowadzane, a metabolity odprowadzane, spowoduje to częściowe obumarcie guza. Jest to jedna z istotniejszych przyczyn, dla której guz złośliwy ulega unaczynieniu. W wyniku produkcji określonych czynników, może on przejmować istniejące naczynia krwionośne lub indukować powstawanie nowych z już istniejących. Proces ten nosi nazwę neoangiogenezy, a czynniki go indukujące proangiogennymi. Unaczynienie guza nie tylko powoduje wzrost jego objętości wynikającej z przyspieszonej proliferacji komórek go tworzących, lecz także kreuje nowe drogi jego rozsiania [Hanahan, Weinberg, 2011].

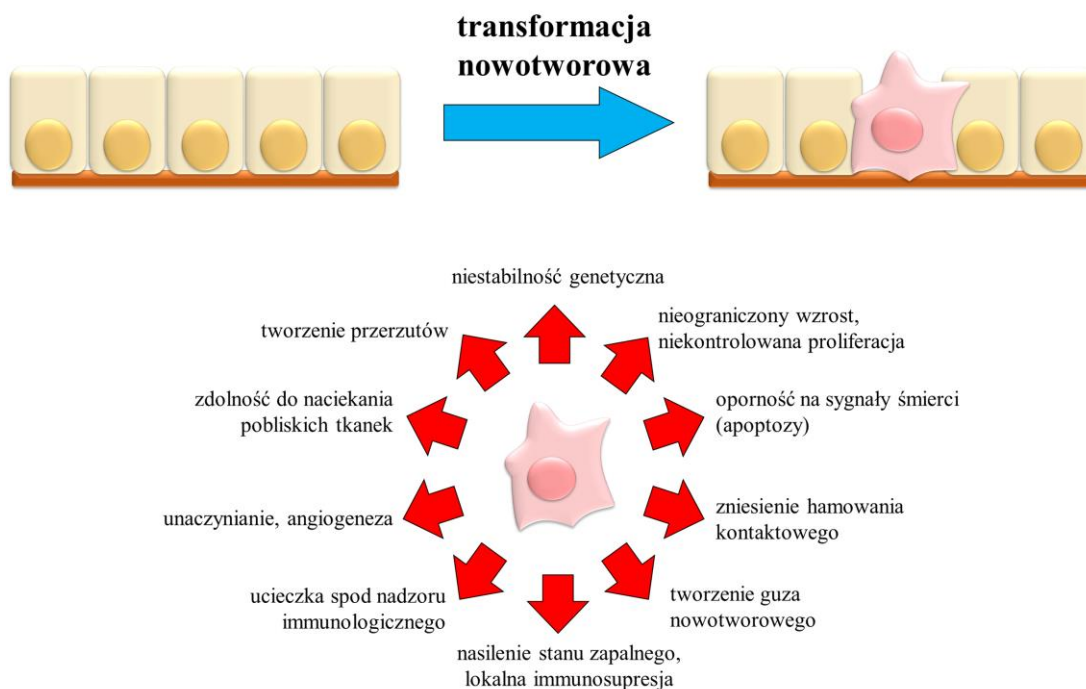
Nowotwór zmienia swoje środowisko, zakwaszając je, w wyniku nagromadzania się w nim ostatecznych jak i pośrednich metabolitów. Środowisko takie sprzyja

pojawianiu się mutacji, prowadzących do nabycia przez komórki nowotworowe nowych cech. Dzięki temu są one zdolne naciekać pobliskie tkanki, tworząc miejsce dla rozrastającego się guza, a także migrować. Po wnikięciu do naczyń krwionośnych czy limfatycznych, komórki nowotworowe osiągają nowe miejsca w organizmie i zasiedlając je, tworzą tzw. przerzuty. Przerzutowanie wiąże się zawsze z gorszym rokowaniem dla pacjenta, mniejszą skutecznością terapii oraz krótszym czasem przeżycia [Hanahan, Weinberg, 2011].

Transformacja nowotworowa, przy braku skuteczności systemów wewnątrzkomórkowego usuwania komórek zmienionych, nie oznacza jeszcze pewności rozwinięcia się nowotworu. Ważną linią obrony jest aktywność układu immunologicznego. Ma on za zadanie rozpoznawać i niszczyć komórki nieprawidłowe, w tym komórki nowotworowe, które jednak bronią się przed odpowiedzią gospodarza, głównie poprzez produkcję określonych czynników oraz rekrutację do swojego środowiska komórek produkujących te czynniki. Ma to na celu supresję układu immunologicznego. Ponadto, komórki nowotworowe produkują dużą ilość zróżnicowanych antygenów lub zmieniają swoje antygeny powierzchniowe. Proces ten, nazwany ucieczką spod nadzoru immunologicznego, umożliwia rozwój choroby do postaci wykrywalnej klinicznie [Kordek i in., 2007; Hanahan, Weinberg, 2011; Robey i in., 2015].

Komórki nowotworowe charakteryzuje także zmieniony metabolizm. Intensywny wzrost guza oraz hiperprolifracja komórek wymagają większych zasobów energii i makrocząsteczek budulcowych, takich jak białka, lipidy czy cukry. Nowotwory preferują metabolizm beztlenowy, glikolizę, która dostarcza około 15-18 razy mniej energii niż oddychanie tlenowe, ale zachodzi około 100-krotnie szybciej. Ponadto, w komórkach nowotworowych dochodzi do nadekspresji enzymów metabolicznych czy transporterów, m.in. glukozy (GLUTs, ang. glucose transporters), tak aby zapotrzebowanie metaboliczne komórek zostało spełnione. Zmiany metaboliczne w komórkach nowotworowych powiązane są ze wszystkimi opisanymi wcześniej cechami nowotworu [Hanahan, Weinberg, 2011; Robey i in., 2015].

Nadmierny rozrost guza może powodować upośledzenie działania organu. Ponadto, u pacjentów nowotworowych dochodzi do kacheksji: wyniszczenia organizmu, przewlekłego stan zapalny oraz upośledzenia działania układu odpornościowego, co w rezultacie prowadzi do śmierci [Kordek; Hanahan, 2011; Robey, 2015].



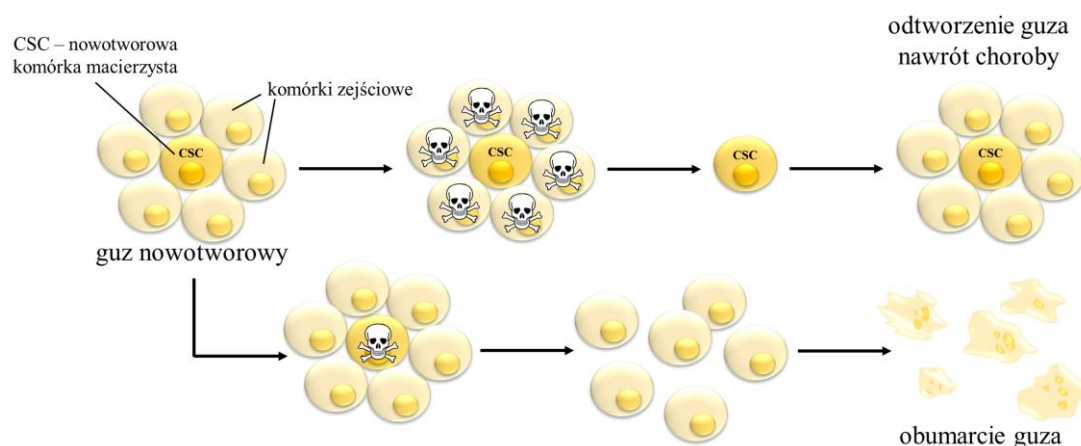
Ryc. 1. Cechy komórek nowotworowych [opracowanie własne]

1.1.1.2. Nowotworowe komórki macierzyste

Istnieją dwie hipotezy wyjaśniające mechanizm powstawania guza nowotworowego oraz jego niejednorodność, czyli występowanie różnych klonów komórek pod względem morfologicznym, antygenowym i funkcjonalnym. Są to: model stochastyczny (ewolucji klonalnej) i model hierarchiczny (nowotworowych komórek macierzystych). Pierwsza hipoteza zakłada, iż każda komórka może stać się komórką nowotworową, dającą początek guzowi pierwotnemu oraz wtórnemu. Innymi słowy, każda komórka nowotworowa ma taki sam potencjał do odtworzenia guza. Drugi model zakłada, iż występuje hierarchia wśród populacji klonów komórek w guzie, a najwyżej postawione są nowotworowe komórki macierzyste (CSCs, ang. cancer stem cells). One jako jedyne uczestniczą w progresji nowotworu i przyczyniają się do jego inwazji i przerzutowania. Prowadzone badania potwierdzają zbliżone prawdopodobieństwo rozwoju nowotworu na drodze obu modeli. Aktualnie uważa się zatem, iż najbliższą prawdy jest hipoteza łącząca oba modele [Wang i in., 2014; Lathia, Liu, 2017].

CSCs odkryte zostały na przełomie XX i XXI w. Przez ostatnie dwie dekady prowadzono intensywne badania nad pochodzeniem nowotworowych komórek macierzystych, ich charakterystycznych cech i antygenów, udziału w kancerogenezie,

a także możliwością skierowania terapii przeciwko nim. Udowodniono, iż CSC odgrywają kluczową rolę w rozwoju i progresji nowotworu, inwazji i przerzutowaniu, jak również lekooporności. Odpowiadają także za nawroty choroby. Prowadzone badania potwierdziły, iż zniszczenie komórek zejściowych nowotworu nie jest wystarczające i dopóki CSCs nie ulegną eliminacji, dochodzić może do wznów choroby (Ryc. 2) [Lathia, Liu, 2017; Schulenburg i in., 2010].



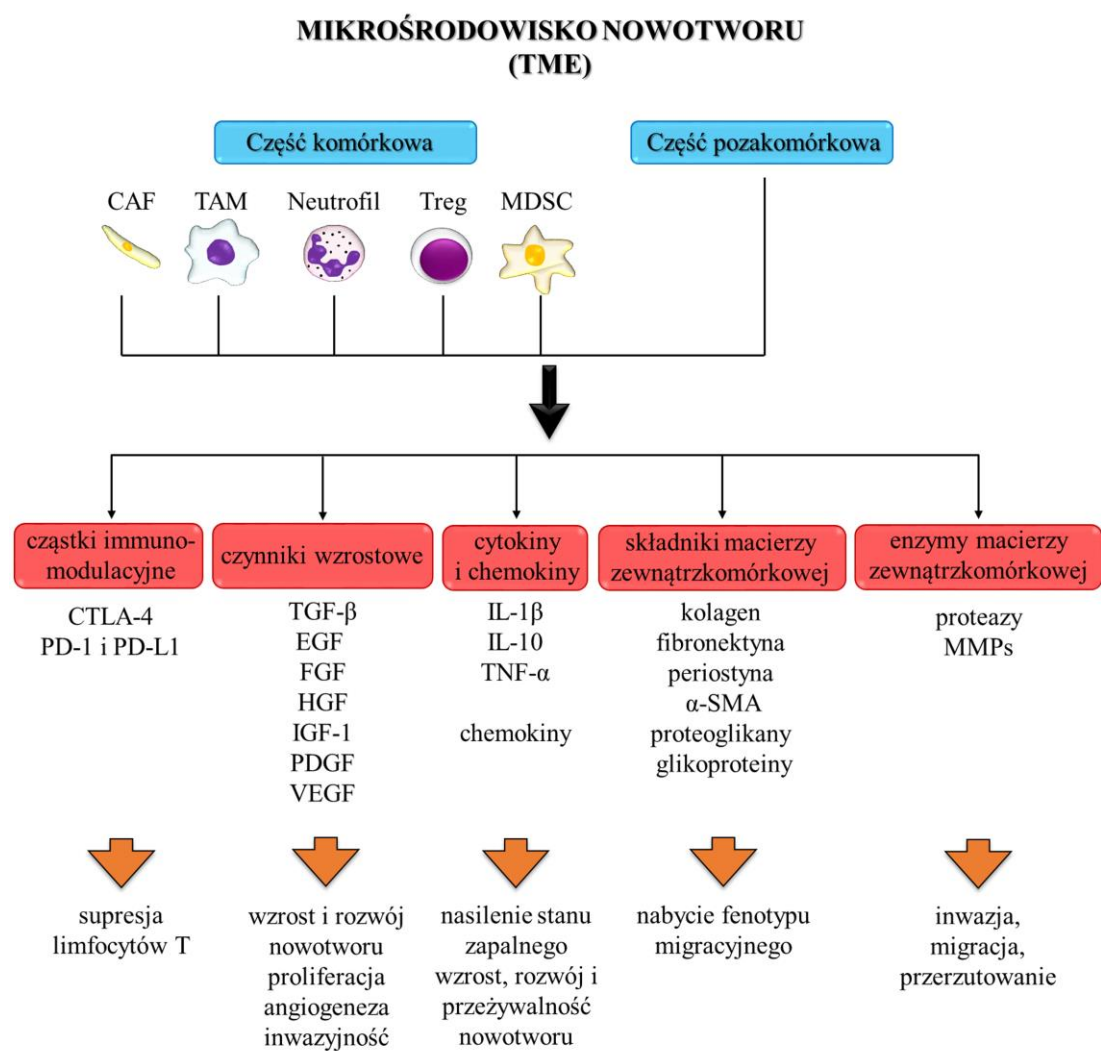
Ryc. 2. Porównanie terapii standardowej oraz celującej w CSCs [opracowanie własne]

Nowotworowe komórki macierzyste występują w stanie uśpienia, przez co odporne są na działanie cytostatyków. Posiadają także wysoko aktywne i skuteczne mechanizmy oporności lekowej. Po zniszczeniu guza na drodze chemio- czy radioterapii, CSCs przechodzą cykl komórkowy, dając początek nowej generacji komórek, co powoduje nawrót. Posiadają one charakterystyczne markery powierzchniowe, które potencjalnie mogłyby stać się celem terapeutycznym. Na drodze syntezy chemicznej opracowano kilka potencjalnych leków, które wykazują aktywność w eliminowaniu CSCs. Odkryto także substancje pochodzenia naturalnego, które również wykazują takie właściwości [Lathia, Liu, 2017; Schulenburg i in., 2010; Schulenburg i in., 2015; Taylor, Jabbarzadeh, 2017].

1.1.1.3. Mikrośrodowisko nowotworu

Ważnym elementem guza nowotworowego jest jego nisza, tzw. mikrośrodowisko (TME, ang. tumour microenvironment). Jest to środowisko otaczające guz, zasobne w czynniki sprzyjające rozwojowi nowotworu, jak również

ochraniające go przed aktywnością układu immunologicznego. TME składa się z elementów komórkowych i pozakomórkowych. Do tych pierwszych należą perycyty, komórki endotelialne (śródbłonkowe), fibroblasty, jak również komórki układu immunologicznego: neutrofile czy makrofagi [Gould, Courtneidge, 2014; Senthebane i in., 2017]. Komórki te są nierzadko odpowiednio zmodyfikowane w wyniku oddziaływania guza, mikrośrodowiska, czy wydzielanych przez nie czynników. I tak w środowisku guza obecne są fibroblasty związane z nowotworem (CAFs, ang. cancer associated fibroblasts), makrofagi związane z nowotworem (TAMs, ang. tumour associated macrophages), komórki mezenchymalne związane z mikrośrodowiskiem (MSC, ang. mesenchymal stromal cells) czy komórki supresorowe pochodzące z mezenchymalnych (MDSCs, mesenchymal-derived suppressor cells) [Scharping, Delgoffe, 2016; Singel, Segal, 2016; Poggi, Giuliani, 2016; Melzer i in., 2016]. Komórki mikrośrodowiska mogą wydzielać szereg czynników, tworzących pozakomórkowy element niszy nowotworowej, takich jak: cytokiny (IL-1 β (interleukina 1 β), IL-8, IL-10, czynnik martwicy nowotworu α (TNF- α , ang. tumour necrosis factor α), chemokiny, czynniki wzrostowe (czynnik wzrostu naskórka (EGF, ang. epidermal growth factor), czynnik wzrostu hepatocytów (HGF, ang. hepatocyte growth factor), insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (IGF-1, ang. insulin-like growth factor 1), czynnik wzrostu fibroblastów (FGF, ang. fibroblast growth factor), czynnik wzrostu śródbłonka naczyń (VEGF, ang. vascular endothelial growth factor), płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF, ang. platelet-derived growth factor), transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β , ang. transforming growth factor)), białka macierzy zewnątrzkomórkowej (fibronektyna, kolagen, proteoglikany, glikoproteiny, periostyna, α -aktyna mięśni gładkich (α -SMA, ang. α smooth muscle actin) czy proteazy, w tym metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs, ang. matrix metalloproteinases). Czynniki te ułatwiają i przyspieszają wzrost, proliferację, różnicowanie, przeżywalność, migrację komórek nowotworowych, wzmagają stan zapalny, aktywują szereg procesów prowadzących do inwazji i przerzutowania, hamowania apoptozy, indukcji angiogenezy, jak również wzmagają lekooporność i immunotolerancję (Ryc. 3) [Gould, Courtneidge, 2014; Senthebane i in., 2017; Scharping, Delgoffe, 2016; Singel, Segal, 2016; Poggi, Giuliani, 2016; Melzer i in., 2016].



Ryc. 3. Składniki mikrośrodowiska nowotworu i ich udział w kancerogenezie [opracowanie własne]

Charakterystycznym dla środowiska guza nowotworowego jest jego zakwaszenie oraz hipoksja, czyli niedotlenienie. Takie środowisko jest wynikiem wytwarzania kwaśnych metabolitów, takich jak kwas mlekowy, powstałych z pirogronianiu podczas glikolizy. Nowotwory „preferują” glikolizę nad oddychaniem tlenowym. Zjawisko to nosi nazwę efektu Warburga lub glikolizy tlenowej i charakteryzuje się prowadzeniem glikolizy nawet w warunkach zasobnych w tlen. Fosforylacja oksydacyjna jest procesem bardziej ekonomicznym dla komórki, jednakże glikoliza zachodzi szybciej, tym samym generując więcej energii w tym samym czasie. Ponadto, komórka nowotworowa prowadząc proces glikolizy, nie wykorzystuje potencjału mitochondriów, który przeznaczony może być do produkcji biomolekuł, budujących nowe komórki. Jest to niezmiernie ważne

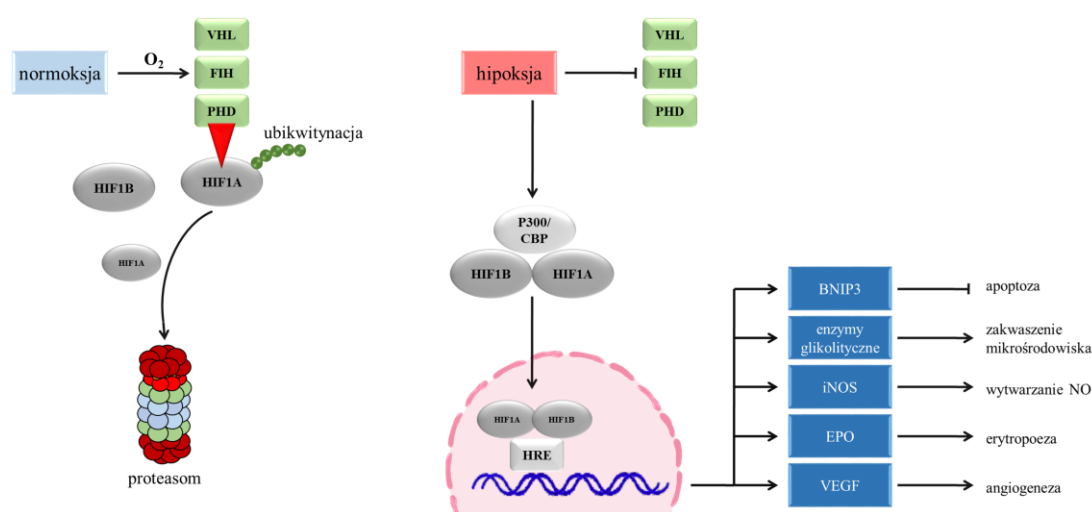
dla guza, biorąc pod uwagę tempo jego wzrostu [Kato i in., 2013; Gould, Courtneidge, 2014; Scharping, Delgoffe, 2016]. Zakwaszone środowisko sprzyja mutacjom, umożliwiającym komórkom nabywanie nowych cech, przyspieszających rozwój nowotworu. W takich warunkach indukowana jest inwazyjność, angiogeneza, oraz promowana migracja komórek guza. Często także kwaśne środowisko może zmniejszać efektywność chemioterapeutyków, jak również ograniczać aktywność limfocytów T [Kato i in., 2013; Senthilane i in., 2017; Scharping, Delgoffe, 2016].

Zakwaszenie środowiska wywołane jest nie tylko efektem Warburga, ale także hipoksją. W warunkach niedotlenienia aktywowane są między innymi geny kodujące enzymy glikolityczne, w wyniku czego produkowany jest kwas mlekowy. Z drugiej strony, zakwaszone środowisko sprzyja przełączeniu metabolizmu tlenowego na beztlenowy. Pojawia się zatem pętla wzajemnej aktywacji.

Hipoksja powstaje w wyniku aktywności enzymów glikolitycznych, jednak głównym jej induktorem jest niedostateczna ilość tlenu docierająca do guza. Może to być spowodowane chaotycznym wytwarzaniem naczyń krwionośnych, których powstawanie w warunkach fizjologicznych jest ściśle regulowane. W przypadku nowotworu, wytwarzana jest duża ilość czynników proangiogennych, w wyniku czego wiele nowopowstałych naczyń jest nieprawidłowo wykształcona czy ślepo zamknięta. Może także dochodzić do sytuacji, gdy guz rośnie zbyt szybko, aby umożliwić ukrwienie całej jego objętości [Scharping, Delgoffe, 2016; Otrrock i in., 2009; Geiger, Peeper, 2009].

W warunkach hipoksji aktywacji ulega wiele czynników. Jednym z najważniejszych jest czynnik indukowany hipoksją 1 (HIF-1, ang. hypoxia-inducible factor). Zbudowany jest on z dwóch podjednostek, α o krótkim czasie półtrwania oraz konstytutywnie aktywnej β . Aktywność HIF-1 α w warunkach normoksji jest hamowana przez zależne od tlenu białko posiadające domeny hydroksylazy prolinowej (PHD, ang. prolyl hydroxylase domain-containing protein), białko Von Hippel-Lindau (VHL) czy czynnik hamujący HIF (FIH, ang. factor inhibiting HIF). Następnie, HIF-1 α ulega ubikwitynacji i jest degradowany w proteasomie (Ryc. 4). W warunkach hipoksji aktywność PHD i VHL zostaje zahamowana, umożliwiając powstanie stabilnego dimeru HIF-1. Podjednostka α może być również stabilizowana przez czynniki wydzielane przez komórki mikrośrodowiska, takie jak czynniki wzrostowe, cytokiny oraz onkogeny, np. MYC [Otrrock i in., 2009; Dondajewska, Suchorska, 2011; Muz i in., 2015]. Stabilny dimer podjednostek α i β trafia do jądra

komórkowego, gdzie poprzez odpowiednie czynniki transkrypcyjne i kofaktory aktywuje geny pronowotworowe, kodujące białka lub regulujące czynniki takie jak: BNIP3, erytropoetynę, VEGF, iNOS czy enzymy glikolityczne. Wywołują one dalsze zakwaszenie środowiska, indukują angiogenezę oraz hamują apoptozę (Ryc. 4). Ponadto, HIF-1 reguluje szlaki molekularne związane z proliferacją, apoptozą, inwazją, migracją czy metabolizmem komórkowym, przyspieszając pogresję nowotworu. Czynniki te uczestniczą także w immunosupresji czy nabywaniu przez komórki nowotworowe chemio- i radiooporności [Otrock i in., 2009; Dondajewska, Suchorska, 2011; Muz i in., 2015; Masson, Ratcliffe, 2014; Noman i in., 2015].



Ryc. 4. Regulacja aktywności HIF-1 w warunkach normoksji i hipoksji [opracowanie własne]
W środowisku hipoksyjnym podjednostka α ulega ubikwitinacji i degradacji w proteasomie.
Podczas hipoksji aktywność czynników inhibujących HIF-1 (VHL, FIH i PHD) zostaje zahamowana, przez co powstać może stabilny dimer podjednostek α i β . Stabilny czynnik HIF-1 ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie poprzez określone czynniki transkrypcyjne indukuje ekspresję genów związanych z progresją nowotworu

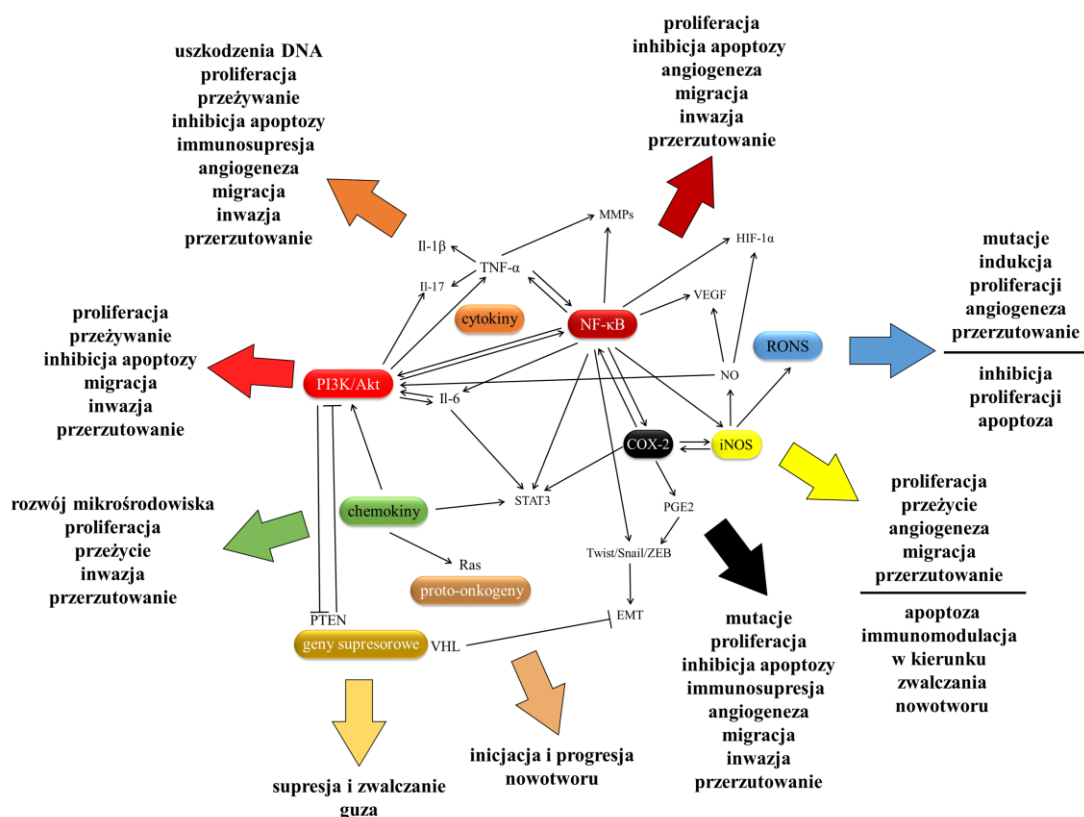
Hipoksja mikrośrodowiska nowotworu sprzyja jego progresji. Do środowiska takiego ściągane są makrofagi (w szczególności TAMs) oraz neutrofile związane z nowotworem (TANs, ang. tumour associated neutrophils). Wytwarzają one czynniki indukujące angiogenezę, wnikanie komórek nowotworowych do światła naczyń krwionośnych czy stan zapalny [Senthebane i in., 2017; Singel, Segal, 2016]. Niedotlenienie uniemożliwia także wytwarzanie poprzez komórki immunokompetentne reaktywnych form tlenu i wolnych rodników mogących niszczyć komórki nowotworowe. Ponadto, ograniczeniu ulega aktywność niektórych cytostatyków również bazujących na reaktywności wolnych rodników tlenowych

[Senthebane i in., 2017; Scharping, Delgoffe, 2016; Noman i in., 2015; Plaks i in., 2015].

1.1.1.4. Stan zapalny

Chorobie nowotworowej nierozłącznie towarzyszy stan zapalny. W takim środowisku dochodzi do uszkodzeń DNA, inaktywacji genów supresorowych, a także aktywacji lub zwiększenia ekspresji szeregu czynników i szlaków o charakterze pronowotworowym.

W warunkach fizjologicznych stan zapalny jest zjawiskiem pozytywnym i ma na celu pobudzenie i ukierunkowanie odpowiedzi immunologicznej. Powstaje na skutek infekcji, uszkodzeń tkanek, działania alergenów i toksyn czy reakcji autoimmunologicznej. Umożliwia on zwalczenie infekcji czy eliminację komórek transformowanych. Początkowo pojawia się lokalnie, obejmując obszar w którym został zainicjowany. W miejsce odczynu zapalnego przyciągane są neutrofile, a następnie makrofagi i komórki dendrytyczne (DCs, ang. dendritic cells). Wytwarzają one szereg czynników prozapalnych i chemotaktycznych powodując rozszerzenie stanu zapalnego na poziom układowy. Dochodzi do podwyższenia temperatury ciała, bólu, zaczerwienienia miejsca odczynu zapalnego. Stan ten nazywa się ostrym stanem zapalnym lub ostrą reakcją zapalną [Gołąb i in., 2015; Schetter i in., 2010; Fougère i in., 2016]. Aby w organizmie zachowana została równowaga, musi być on wygaszony. Gdy wskutek zmian patologicznych, zespołów chorobowych czy zaburzenia funkcjonowania określonych czynników nie dochodzi do jego wygaszenia, pojawia się chroniczny stan zapalny. Niesie ono za sobą szereg zmian w funkcjonowaniu określonych białek, komórek, a w rezultacie całego organizmu. Podczas chronicznego stanu zapalnego pojawia się konstytutywna produkcja szeregu mediatorów pronowotworowych. Dlatego też prowadzić on może do rozwoju i progresji nowotworu poprzez aktywację złożonej grupy czynników umożliwiających rozwój i przetrwanie zmiany patologicznej w organizmie [Schetter i in., 2010; Samadi i in., 2015].



Ryc. 5. Molekularny mechanizm kancerogenezy indukowany chronicznym stanem zapalnym [opracowanie własne]

NF-κB – czynnik jądrowy κB; COX-2 – cyklooksygenaza-2; PGE2 – prostaglandyna E2; iNOS – indukowalna syntaza tlenu azotu; RONS – reaktywne formy tlenu i azotu; NO – tlenek azotu; PI3K/Akt – szlak kinazy-3 fosfatydylinozytolu i kinazy Akt; PTEN – homolog tensyny i fosfatazy, inhibitor PI3K/Akt; VHL – białko Von Hippel-Lindau, inhibitor EMT; EMT – przejście epithelialno-mezenchymalne, proces nabycia przez komórki zdolności do migracji; Twist/Snail/ZEB – szlaki molekularne indukujące EMT; TNF-α – czynnik martwicy nowotworu α, cytokina pro-zapalna; MMPs – metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej; HIF-1α – podjednostka α czynnika indukowanego hipoksją; VEGF – czynnik wzrostu śródbłonka naczyń, czynnik proangiogeny

Podczas chronicznego stanu zapalnego dochodzi do przekształcenia protoonkogenów w onkogeny oraz inaktywacji genów supresorowych. Ponadto, dochodzi do konstytutywnej aktywacji czynników takich, jak: syntaza tlenu azotu 2, zwana też indukowalną (NOS2, iNOS, ang. inducible nitric oxide synthase), cyklooksygenaza-2 (COX-2, ang. cyclooxygenase-2) i prostaglandyny, 5-lipooksygenaza (5-LOX, ang. 5-lipoxygenase), HIF-1α, czynnik jądrowy κB (NF-κB, ang. nuclear factor κB), STAT, kinaza białkowa aktywowana mitogenem (MAPK, ang. mitogen-activated protein kinase), szlak kinazy-3 fosfatydylinozytolu (PI3K, ang. phosphatidylinositol 3-kinase) i kinazy Akt, czynniki wzrostowe (TGF-β, VEGF) czy cytokiny prozapalne (IL-1β, -6, -11, TNF-α) i chemokiny (CXCR4, CXCL8 (IL-8)). Powodują one z jednej strony pogłębienie stanu zapalnego, z drugiej

zaś pełnią funkcje pronowotworowe poprzez tworzenie lokalnej immunosupresji (Ryc. 5) [Schetter i in., 2010; Samadi i in., 2015; Hoesel, Schmid, 2013; Thompson i in., 2015; Zimmers i in., 2016].

Do indukcji onkogenów i inhibicji genów supresorowych dochodzi w wyniku zmian epigenetycznych oraz uszkodzenia systemów naprawy DNA. Wiąże się to głównie z wytwarzaniem podczas stanu zapalnego reaktywnych form tlenu (ROS, ang. reactive oxygen species) i wolnych rodników. Indukcja onkogenów (np. *ras*) z jednoczesną inaktywacją genów supresorowych (*p53*, *APC*, *pRb*, *PTEN*, *VHL*) prowadzi do inicjacji rozwoju nowotworu i jego progresji [Schetter i in., 2010; Samadi i in., 2015].

Jednym z najważniejszych czynników indukowanych podczas chronicznego stanu zapalnego jest cyklooksygenaza-2. Jest to enzym zlokalizowany na retikulum endoplazmatycznym, który katalizuje powstawanie prostaglandyn. Zarówno COX-2, jak i prostaglandyny, a w szczególności prostaglandyna E2 (PGE2, ang. prostaglandin E2), są kluczowymi czynnikami odgrywającymi rolę w stanie zapalnym i kancerogenezie. COX-2 ulega nadekspresji w nowotworze, tym silniejszej, im wyższe stadium klinicznego zaawansowania nowotworu. Cyklooksygenaza-2 i produkt jej aktywności, PGE2, indukują mutacje w DNA, proliferację komórek nowotworowych, angiogenezę, przerzutowanie, a także hamują apoptozę komórek transformowanych nowotworowo. Wykazano również, że regulują mikrośrodowisko guza oraz uczestniczą w powstawaniu lokalnej immunosupresji. Do czynników indukowanych przez COX-2 należą NF- κ B, STAT3 (uczestniczący w progresji nowotworu, indukcji czynników prozapalnych oraz kacheksji organizmu), Twist/Snail/ZEB, pośrednio także białka Rho [Schetter i in., 2010; Samadi i in., 2015; Thompson i in., 2015; Zimmers i in., 2016].

COX-2 ulega wzajemnej aktywacji z syntazą tlenu azotu 2, zwanej też indukowalną (NOS2, iNOS). Główną rolą tego enzymu jest produkcja tlenu azotu (NO), będącego reaktywną formą azotu (RNS, ang. reactive nitrogen species). Pełni on szereg funkcji w komórce i organizmie. Przede wszystkim jest cząsteczką sygnałową. W kontekście nowotworu, NO może pełnić funkcje sprzyjające jego rozwojowi (ułatwiając przerzutowanie, indukować czynniki zaangażowane w migrację i inwazję) lub ograniczające go (indukcja odpowiedzi immunologicznej, apoptozy czy uszkodzanie komórek nowotworowych) [Schetter i in., 2010; Vannini i in., 2015]. Zarówno NO, jak i inne reaktywne formy tlenu i azotu (RONS, ang. reactive oxygen and nitrogen

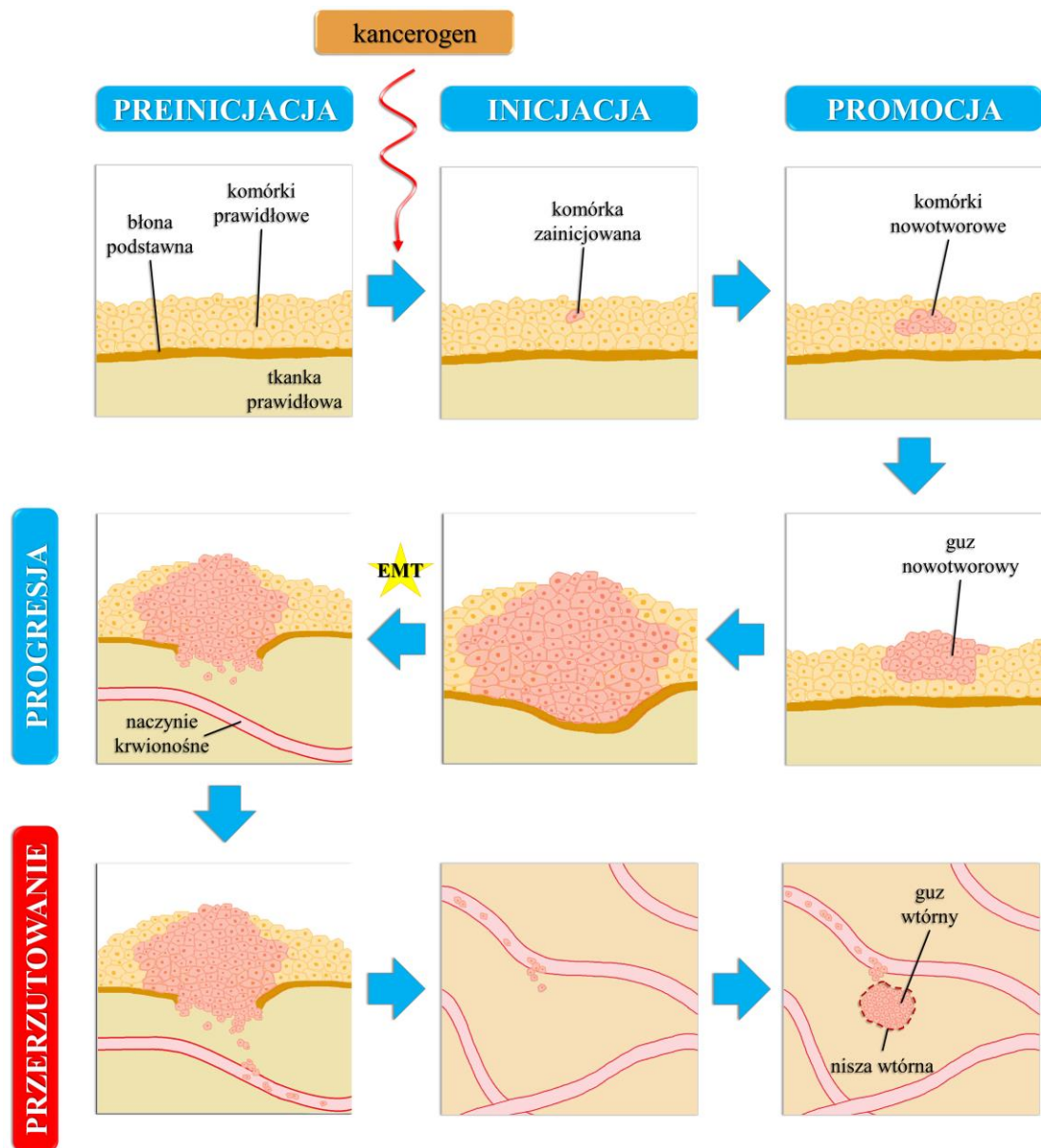
species), pełnią szereg funkcji w stanie zapalnym i rozwijającym się nowotworze. Przede wszystkim powodują peroksydację DNA, lipidów i białek, prowadząc do ograniczenia lub utraty ich funkcjonalności. Ponadto, peroksydacja DNA może prowadzić do niestabilności i szeregu mutacji, które z jednej strony mogą okazać się śmiertelne dla komórek nowotworowych, z drugiej zaś promować progresję i przerzutowanie. RONS wpływają także na procesy komórkowe: indukują lub hamują proliferację, aktywują szlak apoptozy oraz pobudzają angiogenezę [Schetter i in., 2010; Thompson i in., 2015; Brenner i in., 2014].

Podczas stanu zapalnego uwolniony zostaje szereg cytokin i chemokin. Cytokiny mogą działać prozapalnie lub przeciwzapalnie, a równowaga między nimi reguluje również odpowiedź immunologiczną. Podczas chronicznego stanu zapalnego dochodzi do nadekspresji cytokin prozapalnych, w szczególności TNF- α oraz IL-1 β i IL-6 [Samadi i in., 2015; Thompson i in., 2015]. Z kolei chemokiny, a szczególnie CXCL8 (inaczej IL-8), CXCL1 czy CXCL6, powodują ściąganie neutrofilów w miejsce odczynu zapalnego, które w mikrośrodku guza pełnią funkcje pronowotworowe poprzez wydzielanie szeregu czynników, m. in. MMP-9 [Thompson i in., 2015]. Ponadto, chemokiny mogą indukować proliferację, przeżycie i migrację komórek, a także regulować odpowiedź immunologiczną przeciwko nowotworowi [Samadi i in., 2015].

Czynnikiem pełniącym szereg funkcji pronowotworowych, a indukowanym podczas chronicznego stanu zapalnego jest także kinaza Akt. Aktywowana jest ona przez PI3K, która z kolei indukowana jest przez receptorowe kinazy tyrozynowe (RTKs, ang. receptor tyrosine kinase). Szlak PI3K/Akt uczestniczy w inhibicji apoptozy, indukcją proliferacji czy migracji i czynników je regulujących [Samadi i in., 2015; Brown, Banerji, 2017]. W środowisku zapalnym Akt indukuje NF- κ B, iNOS, TNF- α , IL-6 i -17 [Samadi i in., 2015].

1.1.2. Proces kancerogenezy

Kancerogeneza jest to proces opisujący rozwój nowotworu. Podzielony został na 3 etapy: inicjację, promocję i progresję. Niekiedy wyróżniany jest także etap preinicjacji, czyli narażenia komórek lub organizmu na działanie kancerogenów (Ryc. 6) [Kordek i in., 2007; Gołąb i in., 2015].



Ryc. 6. Mechanizm kancerogenezy i przerzutowania [opracowanie własne]

Podczas inicjacji procesu nowotworowego, w wyniku działania czynnika rakotwórczego, dochodzi do zmian w materiale genetycznym komórki. Prowadzi to do powstania tzw. komórki zainicjowanej. Wskutek mutacji następuje inaktywacja genów supresorowych, których produkty białkowe, takie jak p53, pRb czy APC, przeciwdziałają pojawieniu się komórek zainicjowanych. Z drugiej strony, nadmiernie aktywowane są protoonkogeny, stając się onkogenami. Białka przez nie kodowane (np. białka Ras, Raf, Wnt, Myc, czynniki wzrostowe) biorą udział w szeregu procesów, takich jak proliferacja, apoptoza, angiogeneza oraz migracja [Kordek i in., 2007; Gołąb i in., 2015; Barrett, 1993; Croce, 2008; Markowitz, Bertagnolli, 2009; Siddiqui

i in., 2015]. Zmiany w materiale genetycznym komórki mogą przybierać postać zarówno mutacji punktowych, jak również aberracji chromosomalnych. Do transformacji nowotworowej prowadzić mogą także zmiany epigenetyczne DNA [Kordek i in., 2007; Croce, 2008; Markowitz, Bertagnolli, 2009].

Na tym etapie dochodzi także do zaburzenia równowagi między białkami pro- i antyapoptotycznymi. Skutkiem tego zjawiska może być zmniejszenie ilości lub aktywności białek promujących apoptozę, jak również może dojść do zwiększenia potencjału białek hamujących ten proces [Kordek i in., 2007; Croce, 2008]. Ponadto, w komórkach nowotworowych dochodzi do inaktywacji genów stabilizujących DNA, tzw. systemów naprawczych DNA. Do najważniejszych z nich należą: MMR (naprawa nieprawidłowo sparowanych zasad, ang. mis-match repair), NER (naprawa przez wycinanie nukleotydu, ang. nucleotide-excision repair) i BER (naprawa przez wycinanie zasady, ang. base-excision repair). W prawidłowej komórce systemy te odwracają punktowe mutacje w materiale genetycznym, natomiast ich wyłączenie w komórkach nowotworowych umożliwia pojawienie się aberracji prowadzących do kancerogenezy [Kheirleiseid i in., 2013].

Pierwszą linią obrony organizmu przed nowotworem jest aktywność genów supresorowych, głównie białka p53 (Ryc. 7). Hamuje ono cykl komórkowy, indukuje systemy naprawy DNA, a w skrajnym przypadku promuje apoptozę [Kheirleiseid i in., 2013; Simabuco i in., 2018]. O tym, jak ważne jest białko p53 w ochronie przed kancerogenezą świadczy fakt, iż w większości nowotworów jest ono nieaktywne. Oznacza to, że dopiero gdy zostanie inaktywowane, może dojść do rozwoju nowotworu. Inaktywacja białka p53 może zachodzić poprzez mutację w genie *TP53*, jak również poprzez zwiększenie aktywności białka MDM2, degradującego p53 [Kheirleiseid i in., 2013; Simabuco i in., 2018; Labuschagne i in., 2018].

Ostatnią linią obrony organizmu przed kancerogenezą jest aktywność układu odpornościowego. Wzajemne relacje środowiska guza oraz układu immunologicznego określono jako immunoredagowanie. Proces ten składa się z trzech etapów. W pierwszym, nazwanym etapem eliminacji, komórki immunokompetentne, głównie limfocyty T i komórki NK (tzw. naturalni zabójcy, ang. natural killers), zwalczają nowotwór. W kolejnym etapie, dochodzi do powstania stanu równowagi między nowotworem i układem odpornościowym. W ostatnim, trzecim, etapie, przewagę nabywa proces nowotworowy, prowadząc do ucieczki spod nadzoru immunologicznego [Gołąb i in., 2015; Swann, Smyth, 2007].

Wraz z postępem kancerogenezy, promowana jest nadmierna proliferacja komórek, zaś coraz silniejszej presji podlega apoptoza. Ponadto, komórki produkują wysokie stężenia czynników związanych ze stanem zapalnym (np. COX-2), w wyniku czego nasila się on. Większego niż dotychczas znaczenia nabywa immunosupresja mikrośrodowiska guza, co zwiększa jego oporność na działanie układu odpornościowego [Kordek i in., 2007; Schetter i in., 2010].

W ostatnim etapie kancerogenezy dochodzi do metastazy, czyli uwolnienia komórek z guza pierwotnego, wędrówka w płynach ustrojowych, a następnie utworzenie guza wtórnego w odległym narządzie. Przerzutowanie jest procesem wieloetapowym i skomplikowanym, który podlega wieloczynnikowej regulacji. Do powstania przerzutu odległego przyczyniają się takie czynniki, jak stan zapalny czy hipoksyjne, zakwaszone mikrośrodowisko [van Zijl i in., 2011].

1.1.3. Mechanizm przerzutowania

Istnieją różne hipotezy wyjaśniające powstanie przerzutu nowotworowego. Jedne z nich zakładają, iż komórki gotowe do przerzutowania wytwarzają czynniki sygnałne, mające na celu uformowanie środowiska do powstania guza wtórnego. Według innych to powstałe wcześniej środowisko wysyła cząstki sygnałne, indukujące zmiany w komórkach, prowadzące do nabycia fenotypu migracyjnego. Niemniej jednak, istotnym jest wytworzenie odpowiedniej niszy wtórnej by komórki nowotworowe mogły zasiedlić odległy organ. Ponadto, każdy typ nowotworu przerzutuje do określonych organów. W przypadku raka jelita grubego są to wątroba, płuca, rzadziej mózg. Mechanizm odpowiadający za taką selektywność nie jest jeszcze do końca poznany. Podejrzewa się, iż nowotwory przerzutują do miejsc, w których powstała nisza wtórna będzie odpowiadać wymaganiom komórek pochodzących z guza pierwotnego pod kątem odpowiedniej anatomii, czynników adhezyjnych (np. integryn), chemokin, cytokin czy czynników wzrostu [Geiger, Peeper, 2009; Brooks i in., 2010; Jiang i in., 2015; van Zijl i in., 2011].

Przerzut nowotworowy jest procesem wieloetapowym. Kluczową rolę odgrywa mikrośrodowisko nowotworu poprzez wytworzenie czynników indukujących określone zmiany w komórkach. W wyniku tego, dochodzi do przejścia epitelialno-mezenchymalnego (EMT, ang. epithelial-mesenchymal transition), procesu, podczas którego komórki nowotworowe nabywają fenotyp migracyjny.

Komórki takie zdolne są opuścić guz pierwotny oraz dokonać inwazji pobliskiej tkanki. Wnikają one do naczyń krwionośnych (intrawasacja), którymi docierają do innych organów, a następnie opuszczają krwioobiegi (ekstrawasacja). Dochodzi do lokalnej inwazji, kolonizacji tkanki, a następnie zagnieżdżenia komórek w powstałej wcześniej niszy wtórnej [Geiger, Peeper, 2009; van Zijl i in., 2011].

1.1.3.1. Mikrośrodowisko a przerzut

Wpływ niszy nowotworowej na komórki jest jednym z kluczowych etapów kancerogenezy. Z jej udziałem dochodzi bowiem do inicjacji określonych szlaków prowadzących do nabycia przez komórki odpowiednich cech. Mikrośrodowisko oddziałuje na każdy z etapów przerzutowania, od modulacji adhezji komórek, ich uwolnienia z guza, poprzez migrację i inwazję, aż do osiągnięcia niszy wtórnej. Czynny udział w tych procesach biorą komórki mikrośrodowiska, CAFs, TAMs oraz TANs, Tregs czy MDSCs, które poprzez wytwarzane czynniki prometastatyczne: HIF-1, COX-2, czynniki wzrostowe (EGF, FGF, HGF, PDGF, VEGF, TGF- β , czynnik wzrostu tkanki łącznej (CTGF, ang. connective tissue growth factor)), proteazy (MMPs, proteazy cysteinowe (katepsyny) i serynowe (w tym czynnik biorący udział w aktywacji MMPs, urokinazowy aktywator plazminogenu (uPA, ang. urokinase plasminogen activator)) czy cytokiny (IL-1 α , IL-8, IL-10) oraz chemokiny (CXCL12) regulują mobilność komórek transformowanych [Geiger, Peeper, 2009; van Zijl i in., 2011; Guan, 2015; Jiang i in., 2015; Butera i in., 2018; Zhang D. i in., 2018].

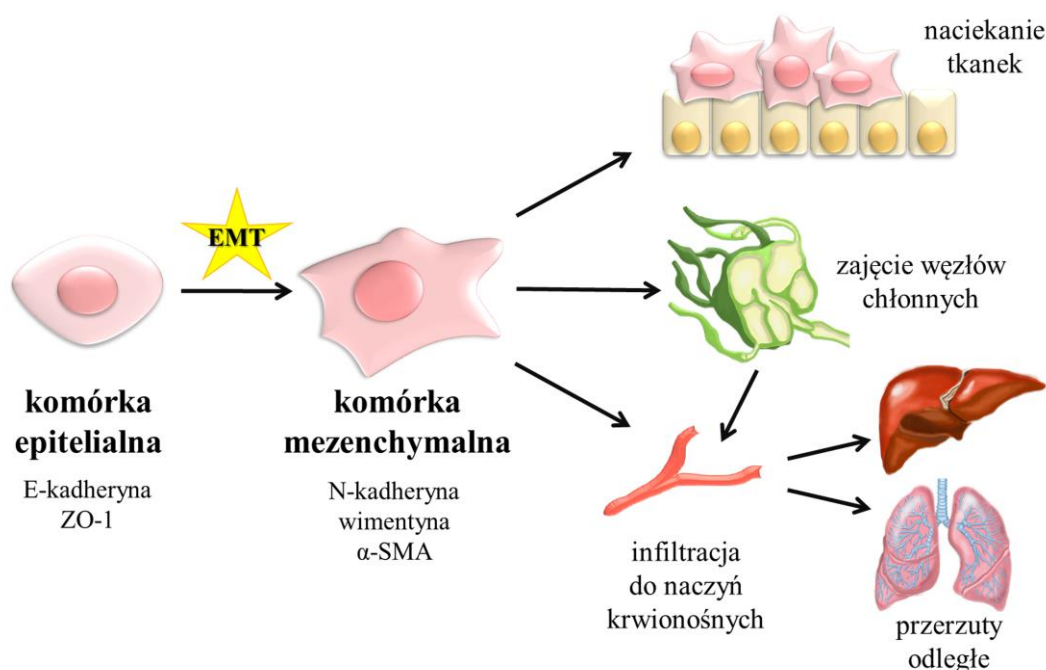
1.1.3.2. Stan zapalny a przerzut

Stan zapalny nie zawsze jest wyznacznikiem pojawienia się zmiany patologicznej, lecz w praktycznie wszystkich guzach nowotworowych odnotowuje się podwyższony odczyn zapalny. Ostry stan zapalny sprzyja zwalczaniu choroby, gdy jednak nie zostaje on wygaszony, rozwija się w formę chroniczną. Do środowiska zapalnego napływają komórki immunokompetentne (TAMs, TANs czy MDSCs), które ulegają modyfikacji w mikrośrodowisku guza. Wraz z komórkami zrębu guza wytwarzają one szereg czynników sprzyjających progresji nowotworu: cytokiny i chemokiny (TNF- α , IL-6 oraz IL-8 (CXCL8)), VEGF, uPA oraz MMPs, COX-2/PGE2, Wnt czy PI3K/Akt. Czynniki te sprzyjają nabywaniu przez komórki

nowotworowe zdolności migracyjnych w procesie przejścia epithelialno-mezenchymalnego. Ponadto, podczas chronicznego stanu zapalnego dochodzi do upośledzenia odpowiedzi immunologicznej, co dodatkowo sprzyja tworzeniu przerzutów [Brooks i in., 2010; Dominguez i in., 2017; Qian, 2017].

1.1.3.3. Przejście epithelialno-mezenchymalne (EMT)

W pierwszym etapie przerzutowania, dochodzi do nabycia przez komórki zdolności do migracji. Proces ten nosi nazwę przejścia epithelialno-mezenchymalnego. Nieruchliwe, epithelialne komórki raka, poprzez zmianę ekspresji określonych białek, osłabionej adhezji czy polarności komórki, nabywają cech komórek mezenchymalnych (Ryc. 8).



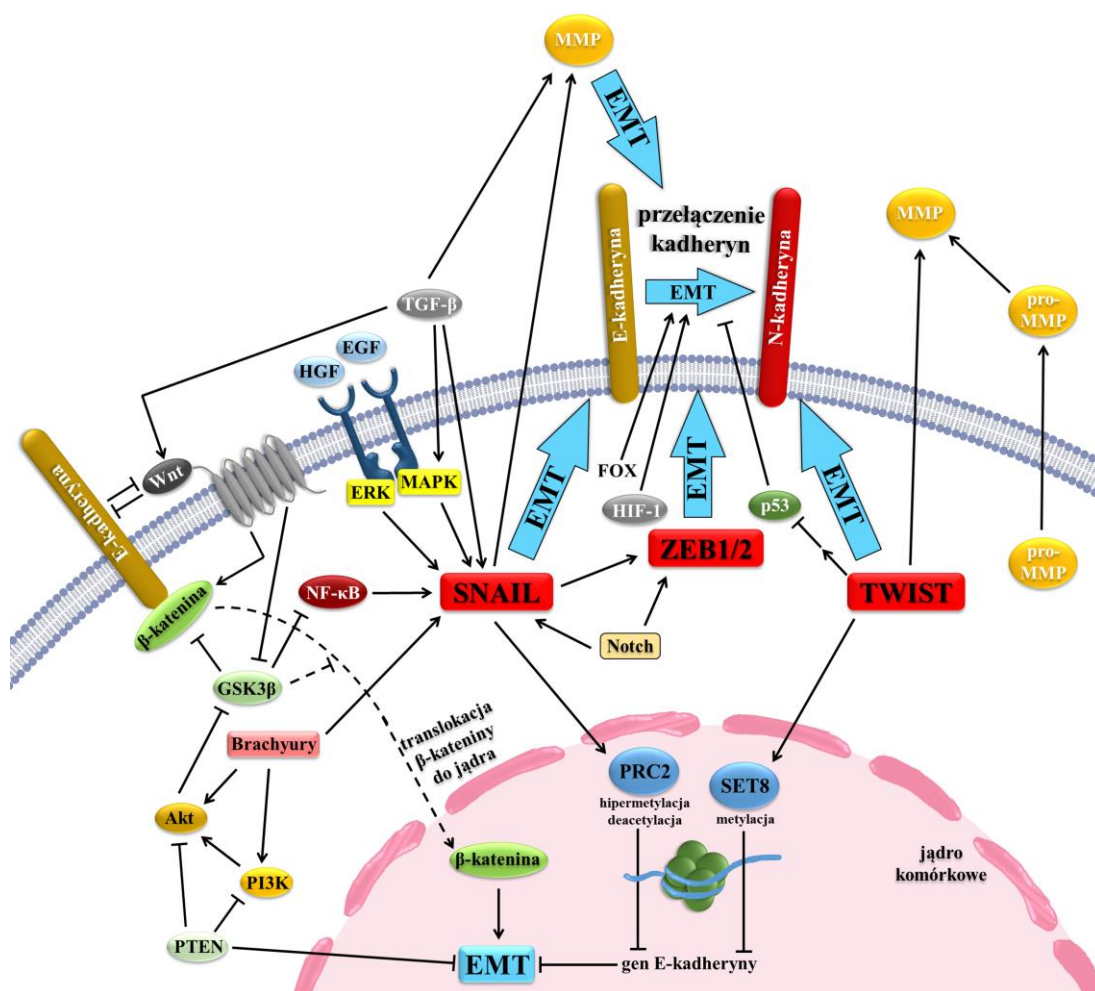
Ryc. 8. Przejście epithelialno-mezenchymalne [opracowanie własne]

EMT indukowane jest przez szereg molekuł, pochodzących głównie z TME, do których należą: czynniki wzrostowe (EGF, HGF, FGF, PDGF, VEGF, TGF-β), MMPs, HIF-1, NF-κB, cytokiny (IL-6, IL-8, czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF, ang. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), TNF-α), chemokiny (CXCR1, CCL2, CCL5, CCL17, CCL18) czy miRNA. Przejście epithelialno-mezenchymalne może być także aktywowane

zakwaszeniem mikrośrodowiska i hipoksji, a także rozwijającym się stanem zapalnym. Do głównych szlaków molekularnych regulujących EMT należą Twist, Snail, Slug oraz ZEB1 (homeoboks 1 wiążący kasetę E palca cynkowego), które z kolei mogą podlegać pozytywnej regulacji przez szlaki: brachyury, PI3K/Akt/mTOR, Ras, Myc, Wnt, Notch, Shh (ang. Sonic hedgehog), NF- κ B czy COX-2 [Ye, Weinberg, 2015; Zhang D. i in., 2018; Tam, Weinberg, 2013; Kessenbrock i in., 2010; Fuxe, Karlsson, 2012; Dominguez i in., 2017; Suarez-Carmona i in., 2017; Dalla Pozza i in., 2018; Singh i in., 2018]. Z kolei do czynników hamujących EMT należą: białko P53, E-kadheryna czy inhibitor szlaku PI3K/Akt – PTEN (Ryc. 9) [Li, Li, 2015].

Komórki nowotworowe na wczesnych etapach rozwoju raka zachowują cechy komórek epitelialnych: są nieruchliwe, charakterystyczna jest dla nich ekspresja E-kadheryny (CDH1, ang. cadherin 1), cytokeratyn oraz ZO-1 (zonula occludens 1). CDH1 zakotwiczona jest w błonie komórkowej; zewnątrzkomórkową domeną łączy się z kadheryną sąsiedniej komórki, uczestnicząc w tworzeniu połączeń międzykomórkowych typu zwierającego. Domena wewnątrzkomórkowa pełni zaś funkcje regulacyjne, posiada bowiem miejsca wiązania głównie z kateninami, w tym β -kateniną. W ten sposób hamuje aktywność szlaku Wnt/ β -katenuina, zaangażowanego w progresję nowotworu i przerzutowanie. W wyniku EMT, epitelialne komórki nowotworowe nabywają cech komórek mezenchymalnych, dla których charakterystyczna jest wysoka aktywność i ilość N-kadheryny (CDH2), wimentyny czy α -SMA. Zmniejszenie ekspresji CDH1 na rzecz CDH2 nosi nazwę przełączenia kadherynowego. Prowadzi to do zmniejszenia adhezji między komórkami oraz komórkami a macierzą zewnątrzkomórkową (ECM, ang. extracellular matrix). Ponadto, następuje zmiana polarności komórki, dzięki czemu nabywa ona zdolności do ruchu [Zeisberg, Neilson, 2009; Ye, Weinberg, 2015; Li, Li, 2015]. Obniżona ekspresja CDH1 powoduje odłączenie β -katenuiny i jej translokację do jądra komórkowego, gdzie indukuje ekspresję genów zaangażowanych w progresję nowotworu. Z kolei, indukcja CDH2 prowadzi do przearanżowania cytoszkieletu oraz tworzenia protruzji czyli lamellipodiów, umożliwiających ruch komórki, jak również invadopodiów, odpowiedzialnych za naciekanie podbliskich tkanek. W procesie tym, uczestniczą białka z rodziny Rho, których zwiększenie ekspresji jest wynikiem EMT. Zatem komórki, które przeszły EMT, zdolne są do ruchu, jak również do uwolnienia z guza nowotworowego i migracji w głąb tkanki [van Zijl i in., 2011].

EMT w kancerogenezie jest oznaką progresji nowotworu. Przejście epithelialno-mezenchymalne może być również przyczyną oporności komórek nowotworowych na leczenie chemiczne i radiacyjne oraz skutkować nawrotami choroby [Ye, Weinberg, 2015]. EMT, poprzez szlak molekularny Snail, przyczynia się do immunosupresji limfocytów T cytotoksycznych oraz, poprzez indukcję zmiany ekspresji antygenów zgodności tkankowej (MHC), ucieczki nowotworu spod nadzoru układu immunologicznego [Kudo-Saito i in., 2009; Akalay i in., 2015; Terry i in., 2017; Dominguez i in., 2017].



Ryc. 9. Molekularny mechanizm regulacji EMT [opracowanie własne]
PRC2, SET8 – metyltransferazy histonowe

Przejście epithelialno-mezenchymalne zachodzi w warunkach fizjologicznych w życiu zarodkowym oraz w regeneracji tkanek, uczestnicząc w procesach organo- i morfogenezy. W nowotworach wykorzystywane jest jednak w celu zmiany fenotypu

komórek, co umożliwia progresję i tworzenie przerzutów [Zeisberg, Neilson, 2009; Ye, Weinberg, 2015].

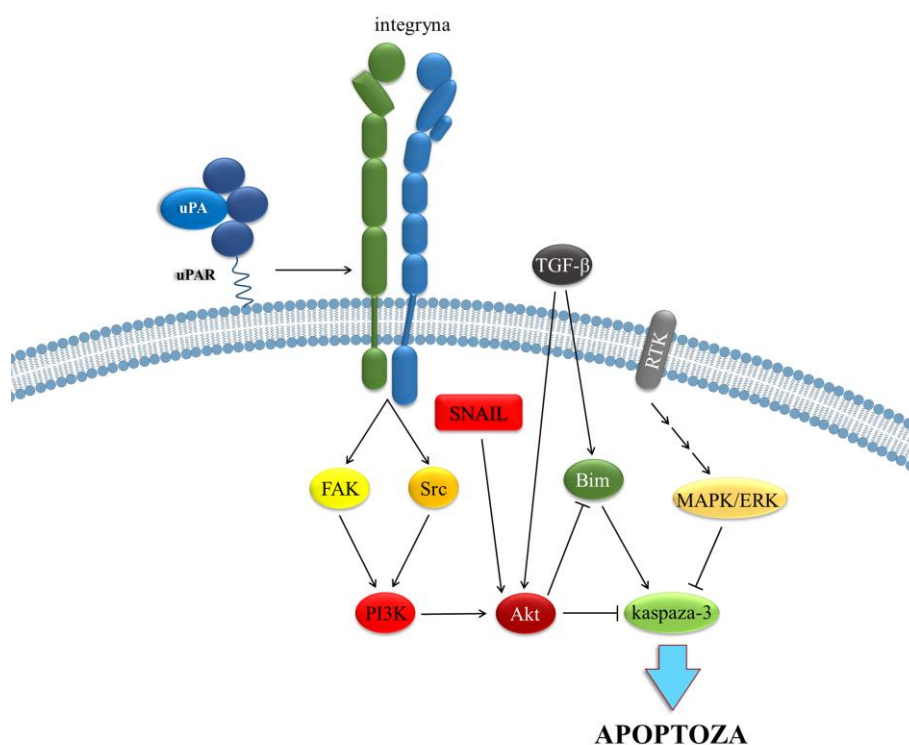
Oprócz EMT, zaobserwowano także przejście kolektywno-ameboidalne (CAT, ang. collective to ameboid transition) w przypadku mięsaka, czerniaka, chłoniaka, a także raka piersi, płuca czy prostaty oraz przejście mezenchymalno-ameboidalnego (MAT, mesenchymal to ameboid transition), występujące w raku piersi, czerniaku czy włókniakomięsaku. Oba mechanizmy prowadzą do nabycia przez komórkę zdolności do ruchu ameboidalnego. Charakteryzuje się on utrzymaniem stabilnego kształtu komórek, których mobilność opiera się na przeciskaniu się przez włókna ECM bez proteolitycznego trawienia. Ruch ameboidalny jest bardziej pierwotny niż mezenchymalny, zachodzi jednak szybciej, a także jest niezależny od MMPs. Kluczowy udział w migracji, czy to w przypadku ruchu mezenchymalnego, zależnego od EMT, czy ameboidalnego, odgrywają białka Rho [van Zijl i in., 2011; Guan, 2015; Simiczyjew i in., 2018]. Oprócz mezenchymalnego i ameboidalnego, trzecim typem ruchu komórek jest mechanizm kolektywny. Komórki migrują w postaci zgrupowań, a połączone są ze sobą poprzez integryny [Geiger, Peeper, 2009; Friedl, Alexander, 2011; Guan, 2015].

1.1.3.4. Uwolnienie komórek z guza, inwazja

W wyniku spadku ekspresji E-kadheryny i wzrostu N-kadheryny, jak również innych markerów komórek mezenchymalnych, takich jak α -SMA, wimentyna czy fibronektyna, dochodzi do zmiany polaryzacji komórki i osłabieniu jej połączeń z komórkami sąsiednimi oraz macierzą zewnątrzkomórkową. Ponadto, proteazy obecne w mikrośrodowisku guza, głównie metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej i adamlizyny mogą wytrawiać białka powierzchniowe, dodatkowo osłabiając adhezję komórek [Friedl, Alexander, 2011]. W konsekwencji, komórki nowotworowe mogą uwolnić się z guza pierwotnego i migrować w głąb tkanki wykorzystując lub nie system proteazowy. Sam ruch możliwy jest dzięki aktywności białek Rho, szczególnie Rac i RhoA, które dokonują przekształcenia cytoszkieletu aktynowego [Friedl, Alexander, 2011].

W prawidłowych warunkach, gdy dochodzi do odłączenia się komórki od macierzy zewnątrzkomórkowej, aktywowane są czynniki pro-apoptotyczne, głównie białko Bcl-XL oraz układ Fas/FasL. Konsekwencją tego zjawiska jest śmierć

komórki na drodze apoptozy uwarunkowanej brakiem adhezji czyli anoikis. Komórki nowotworowe unikają tego mechanizmu, a kluczową rolę odgrywają tutaj integryny, aktywujące kinazę kontaktów ogniskowych (FAK, ang. focal adhesion kinase), kinazę Src oraz MAPK/ERK1/2 (kinaza 1/2 regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym, ang. extracellular signal-regulated kinase 1 and 2). Dochodzi do fosforylacji kinazy PI3K, aktywującej Akt i inhibicji kaspazy-3, tzw. wykonawczej (efektorowej), zapoczątkowującej proces apoptozy [Geiger, Peeper, 2009; Guan, 2015; Ramesh i in., 2009; Sakamoto, Kyprianou, 2010].

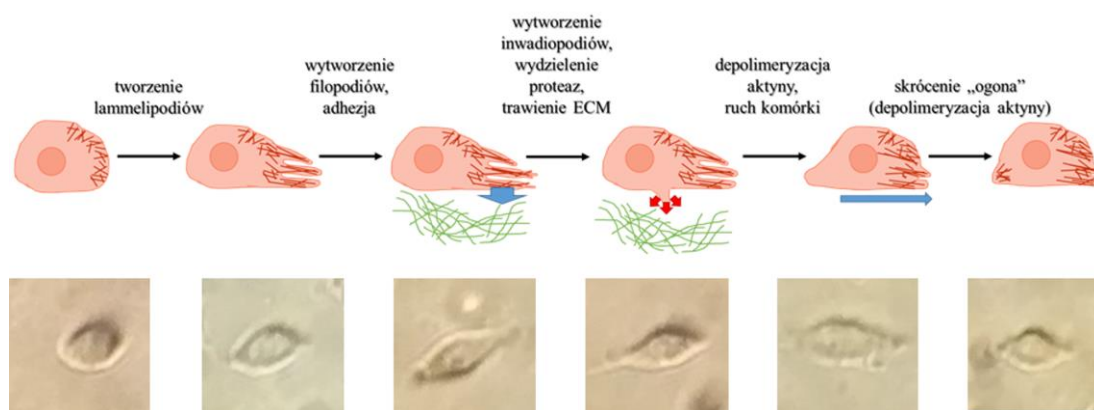


Ryc. 10. Regulacja unikania przez komórki nowotworowe anoikis [opracowanie własne]
 FAK – kinaza adhezji fokalnej; Src – kinaza; Bim – białko pro-apoptotyczne; RTK – receptorowa kinaza tyrozynowa

Komórki, które uwolniły się z guza pierwotnego i uniknęły anoikis mogą migrować w głębsze warstwy tkanki. W poruszaniu się komórki kluczową rolę odgrywają białka Rho, umożliwiające przekształcanie cytoszkieletu na drodze regulacji włókien aktynomiozyny.

W procesie przerzutowania najczęściej wykorzystywany jest przez komórki mezenchymalny mechanizm ruchu [Simiczyjew i in., 2018; Friedl, Alexander, 2011; Guan, 2015].

W pierwszym etapie ruchu mezenchymalnego dochodzi do polaryzacji aktyny i jej polimeryzacji. Tworzą się lamellipodia na krawędzi wiodącej komórki. Następnie, w rejonie lamellipodiów wykształcają się filopodia, rekrutujące czynniki adhezyjne oraz odbierające bodźce podczas migracji. W wyniku ich interakcji z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej dochodzi do lokalnej adhezji. W części bazalnej komórki, wytworzone zostają struktury przejściowe, invadiopodia, związane z aktywnością proteaz. Białka macierzy ulegają degradacji, a komórka przemieszcza się. W wyniku skracania włókien aktyny, z udziałem białek Rho, dochodzi do wytworzenia wewnątrz komórki sił, które pozwolą na jej mobilność. Z kolei, zmniejszenie sił adhezji na krawędzi dystalnej komórki powoduje retrakcję „ogona”. Komórka zostaje przygotowana do kolejnego cyklu ruchu (Ryc. 11) [Guan, 2015; Friedl, Alexander, 2011; Singh i in., 2018; Simiczyjew i in., 2018].



Ryc. 11. Mechanizm mezenchymalnego ruchu komórki [opracowanie własne; zdjęcia własne]

1.1.3.5. Transport naczyniami krwionośnymi

Pierwszą barierą dla migrujących komórek nowotworowych jest błona podstawna (BM, ang. basement membrane). Jest to struktura oddzielająca nabłonek od leżącej pod nim tkanki łącznej. Oddziela ona tkankę nabłonkową pod kątem anatomicznym, fizjologicznym czy molekularnym, a także zapewnia odporność mechaniczną. BM jest wyspecjalizowaną odmianą ECM, zbudowaną głównie z kolagenu, fibronektyny, witronektyny czy lamininy. Może ona być przekroczona przez komórki tylko w szczególnych przypadkach. Jednym z nich jest proces metastazy przebiegający z udziałem enzymów proteolitycznych, głównie MMPs [Brooks i in., 2010; Singh i in., 2018].

Migrujące komórki nowotworowe, osiągając naczynie krwionośne, ulegają adhezji do jego ściany wykorzystując w tym celu cząstki adhezyjne, głównie z grupy integrzyn. Następnie, wydzielają enzymy proteolityczne, głównie MMPs. Lokalnie wytrawiają błonę podstawną ściany naczynia i przenikają do jego światła [Brooks i in., 2010; Singh i in., 2018]. Proces ten nosi nazwę intrawasacji. Komórki mogą wnikać do krwiobiegu także z wcześniej zajętego układu chłonnego wykorzystując zespolenia naczyniowo-limfatyczne kątów żylnych utworzonych z połączenia żył szyjnych i żył podobojczykowych. Infiltrowane mogą być także naczynia okalające sam guz nowotworowy, a wytworzone podczas procesu angiogenezy [Geiger, Peeper, 2009; Brooks i in., 2010; Singh i in., 2018]. Komórki nowotworowe mogą infiltrować do naczyń także w wyniku mechanizmu niezależnego od proteaz. Odbywa się to na drodze aktywności białek Rho, które przekształcając cytoszkielec, umożliwiają komórkom nowotworowym przenikanie przez przestwory międzykomórkowe [Singh i in., 2018].

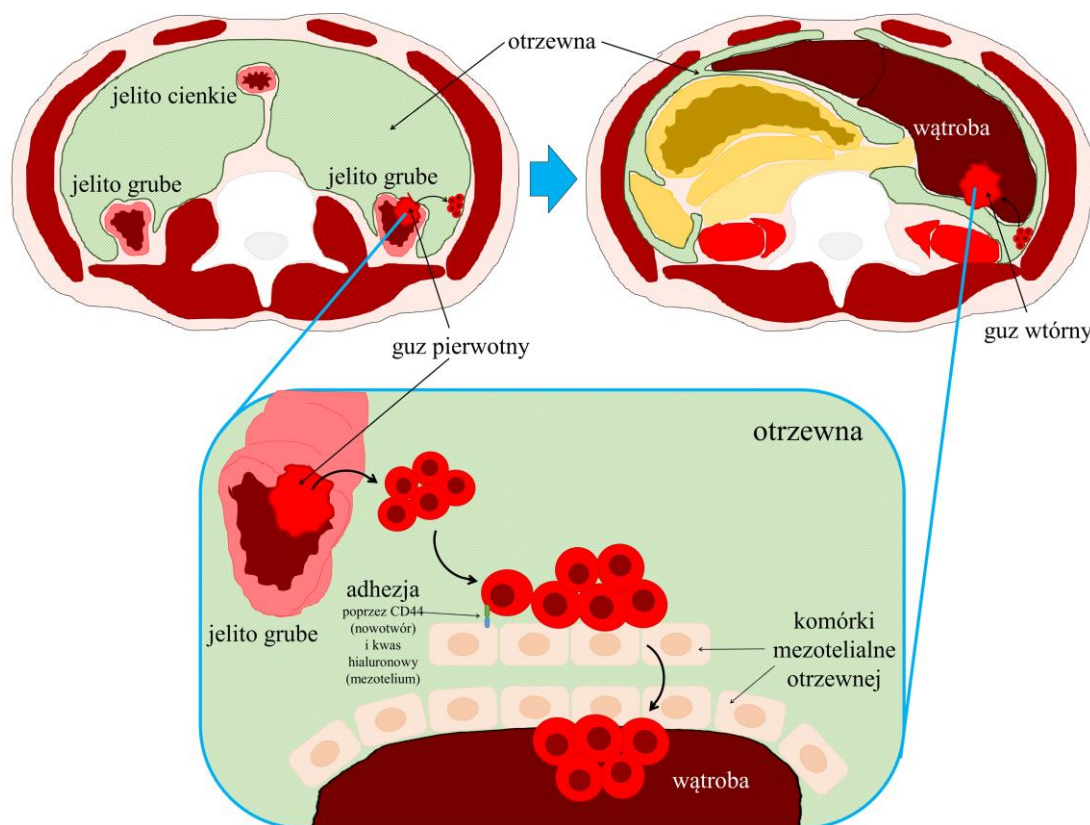
W krwiobiegu, komórki nowotworowe są bardziej niż w tkankach narażone na aktywność układu immunologicznego oraz siły mechaniczne. Około 1 komórka na 1000 jest w stanie przeżyć w krwiobiegu. Jednakże około milion komórek transformowanych nowotworowo może wnikać do naczyń w ciągu doby. Stąd też, mimo iż relatywnie niewielka liczba tych komórek przetrwa w krążeniu to jest w stanie zainicjować powstanie guza wtórnego. Do mechanizmów obrony komórek nowotworowych przed układem odpornościowym gospodarza należy agregacja ze sobą i z płytkami krwi [Geiger, Peeper, 2009; Brooks i in., 2010; van Zijl i in., 2011; Singh i in., 2018; Blazejczyk i in., 2015; Vanharanta, Massagué, 2013].

Po osiągnięciu miejsca docelowego, komórki nowotworowe ulegają adhezji do ściany naczynia krwionośnego, wytrawiają ją, a następnie opuszczają krwiobieg. Jest to proces ekstrawasacji. Od tego momentu następuje lokalna inwazja prawidłowej tkanki, odległej od pierwotnego miejsca rozwoju guza [Geiger, Peeper, 2009; Brooks i in., 2010; Singh i in., 2018].

Do czynników regulujących intra- i ekstrawasację oraz przeżycie komórek w krwiobiegu należą między innymi: czynniki wzrostowe (EGF, VEGF, PDGF, FGF, TGF- β), HIF-1, proteazy (uPA, MMPs), N-kadheryna czy integryny [Geiger, Peeper, 2009; Brooks i in., 2010; Singh i in., 2018].

Najczęstszą drogą osiągania niszy wtórnej przez komórki nowotworowe są naczynia krwionośne. Jednakże, wyróżnić należy także szlak limfatyczny oraz

transcelomiczny poprzez jamy ciała. Szlakiem transcelomicznym komórki raka jelita grubego naciekają, żołądek, nerki, prostatę, jajniki czy szyjkę macicy (Ryc. 12) [Geiger, Peeper, 2009; Jiang i in., 2015].



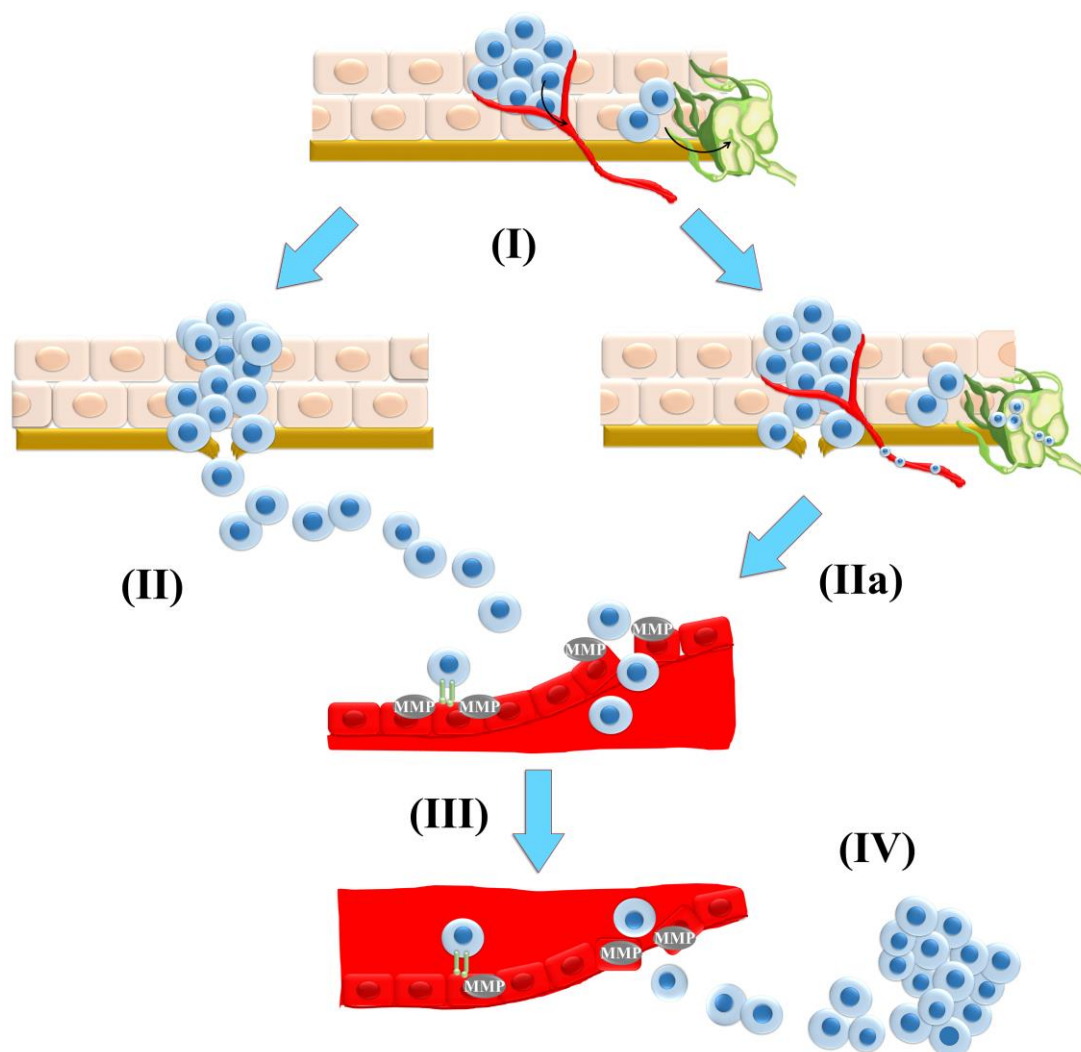
Ryc. 12. Transcelomiczny mechanizm przerzutowania (poprzez jamy ciała) [opracowanie własne]

Komórki uwolnione z guza pierwotnego ulegają adhezji do mezotelium otrzewnej (tkanka nabłonkowa wyściełająca otrzewną) za sprawą czynników adhezyjnych: CD44 ze strony nowotworu i kwasu hialuronowego ze strony mezotelium. Tak utworzony guz może naciekać pobliskie tkanki i organy oraz przerzutować do nich

1.1.3.6. Lokalna inwazja, MET, utworzenie guza wtórnego

Po osiągnięciu miejsca wtórnego, komórki nowotworowe rozpoczynają migrację w głębsze warstwy tkanki. Osiągając niszę wtórną, osiedlają się tam i przechodzą process odwrotny do EMT, czyli przejście mezenchymalno-epitelialne (MET, ang. mesenchymal-epithelial transition). Tracą wtedy zdolność do migracji na rzecz adhezji i proliferacji. Indukcja MET zachodzi poprzez zatrzymanie aktywności szlaków indukujących EMT, takich jak Snail czy Twist. Wynika to z ograniczonej ilości czynników regulujących lub aktywujących te szlaki, które w wysokich stężeniach występowały w niszy pierwotnej. Ponadto, dochodzić może

nawet do całkowitego zahamowania tych szlaków poprzez czynniki obecne w niszy wtórnej. W wyniku tego dochodzi do przywrócenia komórkom fenotypu epitelialnego, z kluczową rolą integrzyn [Guan, 2015; Friedl, Alexander, 2011; Brooks i in., 2010; Singh i in., 2018].



Ryc. 13. Schemat klasycznego szlaku tworzenia przerzutu [opracowanie własne]
(I) Proteoliza ECM i BM. (II) Intrawasacja. (IIa) Infiltracja naczyń krwionośnych okalających guz lub limfatycznych poprzez węzły chłonne. (III) Ekstrawasacja. (IV) Lokalna inwazja, utworzenie guza wtórnego

Aktywność czynników takich jak HIF-1, HER2, FAK, czynników wzrostowych (EGF, VEGF, TGF- β) ich receptorów, chemokin (CXCR4, CCL2, CCL5) czy MMPs, prowadzi do finalnego ukształtowania niszy wtórnej [Brooks i in., 2010; Blaziejczyk i in., 2015]. Początkowo, komórki tworzą tzw. mikrop przerzut (ang. micrometastasis), wchodzą w fazę G₀ cyklu komórkowego i utrzymywane są

w stanie uśpienia, latencji, nawet przez wiele lat. W ten sposób unikają odpowiedzi gospodarza i mogą proliferować w odpowiednim dla wzrostu momencie, np. osłabionej odporności organizmu. Utworzony zostaje tzw. makroprzerzut (ang. macrometastasis) i kształtuje się guz wtórny [Geiger, Peeper, 2009; Brooks i in., 2010; Vanharanta, Massagué, 2013]. Istnieją także doniesienia o utworzeniu guza wtórnego w obrębie naczynia krwionośnego, bez ekstrawasacji komórek. [Brooks i in., 2010].

1.1.4. Regulacja procesu przerzutowania

Przerzutowanie jest procesem wieloetapowym i skomplikowanym. Na każdym etapie regulowane jest przez szereg czynników. Do najważniejszych z nich, będących przedmiotem poniższych badań, należą: metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej, białka Rho, jak również cyklooksygenaza-2, będąca kluczowym onkogenem, odgrywającym rolę na każdym etapie kancerogenezy. Czynniki te ulegają wzajemnej regulacji.

1.1.4.1. Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs)

Proteazy odgrywają ogromną rolę w progresji nowotworu, a szczególnie proteazy serynowe (kalikreiny, plazmina), cysteinowe (katepsyny) oraz metaloproteinazy (MMPs, ADAMs). Enzymy te pełnią różne funkcje w kancerogenezie. Przede wszystkim odpowiedzialne są za degradację macierzy zewnątrzkomórkowej. Pozwala to na „utorowanie” miejsca dla powiększającego się guza, utworzenie przestrzeni dla migrujących komórek czy przełamywanie barier, takich jak ściany naczyń czy błona podstawna. Ponadto, określone proteazy mogą aktywować inne proteazy, a także biorą udział w aktywacji wielu czynników – w tym czynników wzrostowych – i szlaków związanych z kancerogenezą. Enzymy te odpowiedzialne są także za trawienie białek i receptorów powierzchniowych, dzięki czemu mogą zmniejszać adhezję między komórkami oraz komórkami a macierzą [Brooks i in., 2010; Friedl, Alexander, 2011; Mason, Joyce, 2011; Herszényi i in., 2012].

Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej należą do grupy hydrolaz, podgrupy peptydaz (EC 3.4.24). Są to zależne od jonów cynku Zn^{2+} oraz wapnia Ca^{2+}

endopeptydazy, których główną rolą jest proteolityczna obróbka białek macierzy zewnątrzkomórkowej w celu przekształcania ECM. W warunkach fizjologicznych jest to potrzebne podczas owulacji, implantacji zarodka, organogenezy i morfogenezy, gojenia ran czy angiogenezy, a także podczas stanu zapalnego. Komórki nowotworowe wykorzystują aktywność proteolityczną MMPs, a białka te ulegają w nich nadekspresji [Ulisse i in., 2009; Kessenbrock i in., 2010; Herszényi i in., 2012]. Obecnie znanych jest 28 MMPs (w tym 22 występują u człowieka), które podzielono na grupy w zależności od specyfiki aktywności proteolitycznej: kolagenazy, żelatynazy, matrylizyny, stromielizyny, enamielizyny, elastazy, metaloproteinazy błonowe oraz metaloproteinazy niesklasyfikowane (Tab. 1). Największy udział w kancerogenezie i progresji nowotworu odgrywają MMP-2 i -9 (żelatynaza A i B) oraz pośrednio MMP-14 (MT1-MMP), głównie poprzez interakcję z MMP-2 [Krstic, Santibanez, 2014; Cathcart i in., 2015; Cui i in., 2017].

Tabela 1. Podział oraz specyfika aktywności metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej [opracowanie własne; na podstawie: Krstic, Santibanez, 2014; Cathcart i in., 2015; Cui i in., 2017]

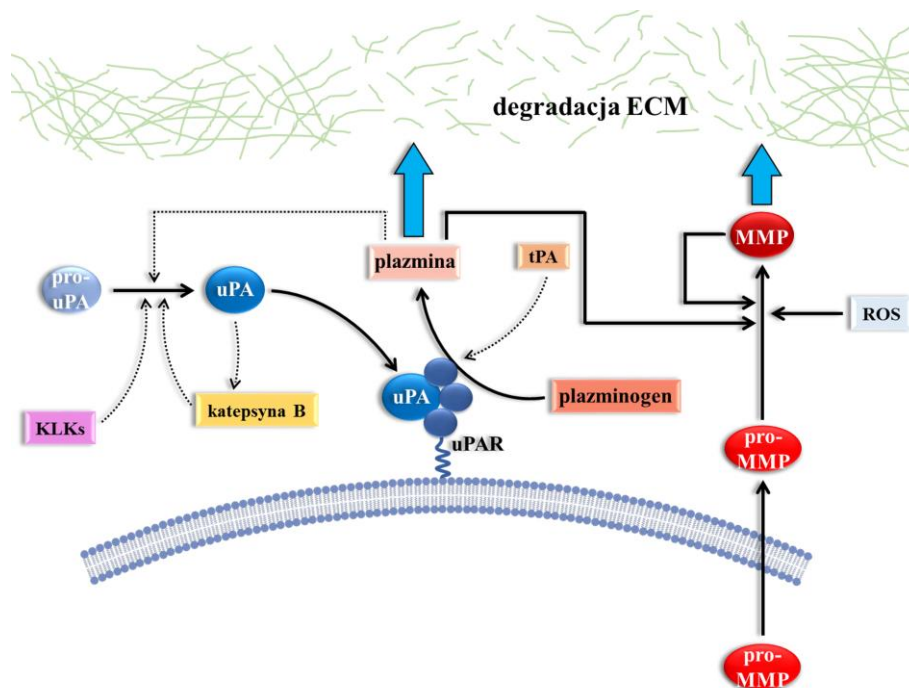
Klasa	MMP	Specyfika aktywności (substrat ECM)
Kolagenazy	MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18	Kolagen typu I, II, III, IV, V, VII, VIII, X, żelatyna, agrekan, perlekan, laminina, fibronektyna, elastyna, nidogen, serpiny
Żelatynazy	MMP-2, MMP-9	Kolagen typu I, II, III, IV, V, VII, X, XIV, żelatyna, agrekan, laminina, fibronektyna, nidogen
Matrylizyny	MMP-7, MMP-26	Kolagen typu IV, X, żelatyna, agrekan, laminina, fibronektyna, fibrynogen, witronektyna, elastyna, enaktyna
Stromielizyny	MMP-3, MMP-10, MMP-11	Kolagen typu II, III, IV, V, IX, X, XI, żelatyna, agrekan, perlekan, laminina, fibronektyna, elastyna, nidogen
Enamielizyny	MMP-20	Kolagen typu V, agrekan, amelogenina
Elastazy	MMP-12	Kolagen typu IV, żelatyna, laminina, fibronektyna, elastyna
Metaloproteinazy błonowe (MT-MMPs)	MMP-14 (MT1-MMP), MMP-15 (MT2-MMP), MMP-16 (MT3-MMP), MMP-17 (MT4-MMP), MMP-24 (MT5-MMP), MMP-25 (MT6-MMP)	Kolagen typu I, IV, żelatyna, agrekan, perlekan, laminina, fibronektyna, fibryna, witronektyna, elastyna, nidogen, N-kadheryna, siarczan chondroityny, siarczan dermatanu
Metaloproteinazy niesklasyfikowane	MMP-19, MMP-21, MMP-22, MMP-23, MMP-27, MMP-28	Kolagen typu I, IV, żelatyna, agrekan, laminina, fibronektyna, nidogen

Metaloproteinazy wszystkich klas wykazują podobną budowę. Wspólna dla wszystkich MMPs struktura zawiera: sekwencję sygnałową na końcu

N-terminalnym, która decyduje o lokalizacji proteazy, pro-domenę oraz domenę katalityczną na C-końcu. Ponadto, wszystkie MMPs z wyjątkiem matrylizyn (MMP-7 i -26) posiadają białkowy łącznik oraz dołączoną za jego sprawą domenę hemopeksyny, która odpowiada za interakcje między białkami, dzięki czemu „nakierowuje” MMPs na specyficzny substrat. Metaloproteinazy macierzy produkowane są w formie zymogenu, a brak ich aktywności jest wynikiem interakcji reszty cysteinowej obecnej w pro-domenie z jonem cynku domeny katalitycznej, przez co dostęp do tej drugiej jest zablokowany. W wyniku proteolizy dochodzi do usunięcia pro-domeny, dzięki czemu cząsteczka zmienia swoją konformację i uzyskuje aktywność enzymatyczną (tzw. przełączenie cysteinowe). Niektóre metaloproteinazy macierzy mogą posiadać dodatkowe elementy strukturalne, takie jak domena fibrynopodobna (MMP-2 i -9), domena witronektynopodobna czy domena immunoglobulinopodobna bogata w cysteinę i prolinę (MMP-23), które mogą zmieniać aktywność MMPs. Metaloproteinazy membranowe, z kolei, posiadają domeny kotwiczące je w błonie – domenę transmembranową (MMP-14, -15, i -16) lub GPI – glikozylofosfatydyloinozytol (MMP-17 i -25) [Kessenbrock i in., 2010; Cathcart i in., 2015; Kessenbrock i in., 2015; Cui i in., 2017].

MMPs są produkowane i wydzielane przez komórki w postaci zymogenu, pro-MMP. Do ich aktywacji dochodzi pod wpływem proteaz (uPA, Katepsyna B i G, rodziny peptydaz związanych z kalikreiną (KLKs, ang. kallikrein-related peptidases), samych MMPs (aktywna MMP może aktywować MMP innego typu)), w wyniku autoaktywacji oraz oksydacji przez reaktywne formy tlenu [Kessenbrock i in., 2010; Mason, Joyce, 2011; Sotiropoulou i in., 2009].

Klasycznym mechanizmem aktywacji MMPs jest odcięcie podjednostki pro-, co katalizowane jest przez przekształcenie plazminogenu do plazminy. To z kolei regulowane jest przez szereg czynników, takich jak tkankowy aktywator plazminogenu (tPA, ang. tissue plasminogen activator), Katepsyna B czy KLKs. Najczęściej jednak proces ten regulowany jest poprzez uPA, łączący się do swojego błonowego receptora, uPAR (Ryc. 14) [Mason, Joyce, 2011; Ulisse i in., 2009; Tang, Han, 2013; Jaiswal i in., 2018].



Ryc. 14. Aktywacja MMPs [opracowanie własne]

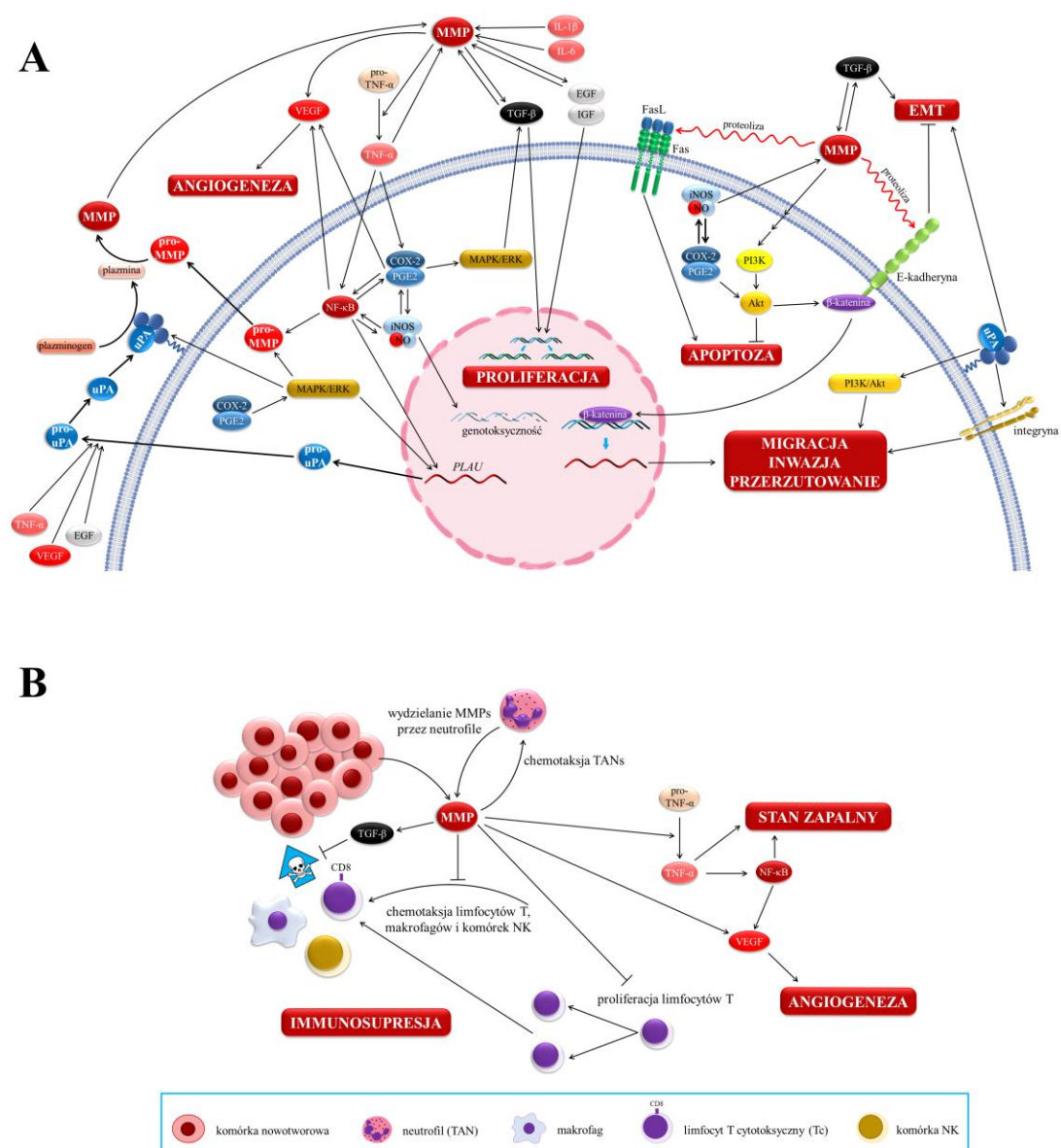
Aktywne metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej dokonują przede wszystkim proteolizy białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Mogą być wytwarzane i wydzielane zarówno przez komórki nowotworowe, jak również komórki mikrośrodowiska, przede wszystkim makrofagi (TAMs) i neutrofile (TANs) [Krstic, Santibanez, 2014; Herszényi i in., 2012; Cathcart i in., 2015]. Okazuje się jednak, iż MMPs pełnią także funkcje regulacyjne, poza-proteolityczne. Metaloproteinazy wydzielane przez komórki guza, jak i komórki mikrośrodowiska działają chemoatrakcyjnie na neutrofile. Te, ściągnięte w miejsce guza, pełnią funkcje ochronne dla nowotworu, jak również wydzielają pronowotworowe czynniki, takie jak VEGF czy MMPs. Metaloproteinazy macierzy indukują także czynniki zaangażowane w progresję nowotworu, takie jak TGF- β czy, pośrednio, szlaki NF- κ B, MAPK oraz PI3K/Akt. Pełnią także rolę ligandu dla receptorów aktywowanych proteazami (PARs, ang. protease activated receptors), zaangażowanych w indukcję angiogenezy, inwazji oraz migracji komórek [Krstic, Santibanez, 2014; Kessenbrock i in., 2010; Kessenbrock i in., 2015; Cui i in., 2017; Shuman Moss i in., 2012].

MMPs w ujęciu nowotworu kojarzone są przede wszystkim z progresją i przerzutowaniem. Okazuje się jednak, iż odgrywają one kluczową rolę na każdym etapie kancerogenezy. Podwyższona ilość i ekspresja MMPs w tkance nowotworowej sprzyja procesom takim, jak: (i) różnicowanie komórek poprzez modyfikację ich

mikrośrodowiska czy indukcję określonych szlaków molekularnych, np. Notch, które regulują różnicowanie komórek do takich, które sprzyjać będą rozwojowi nowotworu [Kessenbrock i in., 2015]; (ii) proliferacja komórek i wzrost wielkości guza, poprzez modulację dostępności czynników wzrostowych (EGF, IGF) oraz zaburzenie równowagi między nimi i ich inhibitorami, a także w wyniku wzajemnej regulacji z TGF- β [Cathcart i in., 2015; Kessenbrock i in., 2015; Gialeli i in., 2011]; (iii) stan zapalny, w wyniku modulacji cytokin i chemokin [Krstic, Santibanez, 2014; Herszényi i in., 2012]; (iv) inhibicja apoptozy, na skutek pośredniej aktywacji szlaku PI3K/Akt, jak również proteolitycznej degradacji ligandu Fas (FasL), który gdy połączy się ze swoim receptorem Fas (FasR), tzw. „receptorem śmierci”, aktywuje kaspazy, co prowadzi do programowanej śmierci komórki [Gołab i in., 2015; Krstic, Santibanez, 2014; Kessenbrock i in., 2010; Herszényi i in., 2012; Guicciardi, Gores, 2009; Gialeli i in., 2011]; (v) angiogeneza, która indukowana jest przez MMPs w wyniku zwiększenia ilości VEGF, wskutek uwolnienia go z błony poprzez proteolizę i zwiększenia jego dostępności dla receptora (VEGFR) (Ryc. 15A) [Singh i in., 2018; Krstic, Santibanez, 2014; Kessenbrock i in., 2010; Herszényi i in., 2012].

Udział MMPs w unikaniu odpowiedzi immunologicznej następuje poprzez degradację FasL obecnego na limfocytach T, co uniemożliwia niszczenie przez nie komórek nowotworowych. Ponadto, proteazy ADAMs oraz MMPs chronią nowotwór przed aktywnością komórek NK [Kessenbrock i in., 2010; Gialeli i in., 2011]. MMPs inaktywują także, w wyniku proteolizy, czynniki chemotaktyczne, które powodowałyby ściąganie w miejsce guza komórek immunokompetentnych o aktywności przeciwnowotworowej (makrofagów czy limfocytów T), jak również wchodzi w interakcje ze składnikami dopełniacza, inaktywując go. Degradacja ECM przez MMPs powoduje uwolnienie czynników działających chemoatrakcyjnie dla neutrofilów. Te z kolei indukują progresję nowotworu, wydzielają czynniki pronowotworowe, w tym MMP-9. Występuje zatem sprzężenie zwrotne dodatnie: MMPs przyciągają neutrofile, które wydzielają MMPs; ich obecność w mikrośrodowisku guza wiąże się ze złym rokowaniem [Kessenbrock i in., 2010; Herszényi i in., 2012; Shuman Moss i in., 2012].

Ochrona nowotworu przed odpowiedzią gospodarza jest także osiągana na drodze degradacji przez MMPs receptora obecnego na limfocytach T, co hamuje ich proliferację, jak również indukcji TGF- β , co skutkuje ograniczeniem odpowiedzi limfocytów T przeciwko komórkom nowotworowym (Ryc. 15B) [Shuman Moss i in., 2012; Gialeli i in., 2011].



Ryc. 15. Udział MMPs w kancerogenezie [opracowanie własne]

Jak już zostało wspomniane, MMPs uczestniczą przede wszystkim w progresji nowotworu. Regulują i aktywują procesy zaangażowane w przerzutowanie na każdym jego etapie: EMT, inwazję, migrację, intra- i ekstrawasację, adhezję w miejscu wtórnym oraz przygotowanie niszy wtórnej.

Indukcja przejścia epitelialno-mezenchymalnego z udziałem MMPs przebiega dwójako: (i) aktywują one TGF- β w wyniku proteolitycznego cięcia, który następnie indukuje EMT; (ii) metaloproteinazy macierzy dokonują proteolizy E-kadheryny, będącej inhibitorem EMT oraz odgrywającej kluczową rolę w adhezji komórek [Fuxe, Karlsson, 2012; Krstic, Santibanez, 2014; Shuman Moss i in., 2012; Gialeli i in.,

2011]. Ponadto, degradacja E-kadheryny powoduje uwolnienie β -kateniny, w wyniku czego dochodzi do aktywacji szeregu czynników i szlaków (np. Wnt) zapoczątkowujących EMT oraz proces progresji nowotworu [Singh i in., 2018; Friedl, Alexander, 2011].

MMPs uczestniczą w przełamywaniu barier przez komórki podczas przerzutu. Są także produkowane przez inwadiopodia podczas migracji komórek [Singh i in., 2018; Kessenbrock i in., 2010; Kessenbrock i in., 2015; Shuman Moss i in., 2012; Gialeli i in., 2011; Isaacson i in., 2017]. W wyniku zależnej od MMPs proteolizy lamininy, dochodzi do powstania czynników indukujących ruch komórek. Ponadto, uczestniczą w powstawaniu niszy wtórnej. Do czynników tworzących mikrośrodowisko przerzutowe należą VEGF, TGF- β oraz TNF- α , które wraz z fibronektyną powodują ściągnięcie do niszy i zakotwiczenie w niej komórek macierzystych progenitorowych, pochodzących ze szpiku kostnego. Wszystkie te czynniki aktywowane są przez metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej [Kessenbrock i in., 2010; Shuman Moss i in., 2012; Gialeli i in., 2011].

MMPs mogą wykazywać także aktywność przeciwnowotworową – promować programowaną śmierć komórki oraz hamować angiogenezę, na skutek uwolnienia czynników antyangiogennych (np. angiostatyna, endostatyna, tumstatyna) podczas proteolizy składników ECM (np. kolagenu typu IV, XVIII). Niemniej jednak, MMPs pełnią funkcje przede wszystkim pronowotworowe, a ich podwyższona ekspresja koreluje z progresją nowotworu, nawrotem choroby oraz zwykle złym rokowaniem dla pacjenta. Zależność ta uwarunkowana jest jednak od typu nowotworu, jego stadium, jak również miejsca produkcji MMPs [Krstic, Santibanez, 2014; Kessenbrock i in., 2010; Herszényi i in., 2012; Kessenbrock i in., 2015; Gialeli i in., 2011; Isaacson i in., 2017; Hadler-Olsen i in., 2013].

Regulacja aktywności metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej przeprowadzana jest na poziomie transkrypcji, aktywacji (przekształcenie zymogenu do aktywnej formy), a także poprzez modulację aktywności enzymu. Do pozytywnych regulatorów MMPs należą czynniki takie, jak: czynniki wzrostowe (TGF- β , EGF, VEGF, PDGF), cytokiny (TNF- α , IL-1 β , IL-6), NF- κ B, MAPK/ERK, białka Rho, ROS, prostaglandyna E2 (PGE2), inne metaloproteinazy macierzy, a także produkty degradacji ECM. MMPs indukowane są także w wyniku EMT, jak również przez hipoksję [Krstic, Santibanez, 2014; Cui i in., 2017; Gaffney i in., 2015].

MMPs podlegają także negatywnej regulacji, a ich głównymi inhibitorami są tkankowe inhibitory metaloproteinaz macierzy (TIMPs, ang. tissue inhibitor of matrix metalloproteinases), które wiążą metaloproteinazy i blokują ich miejsce aktywne. Do inhibitorów MMPs należą także α 2-makroglobulina oraz białko bogate w cysteinę indukujące powrót do postaci pierwotnej (RECK, ang. reversion-inducing cysteine-rich protein) [Herszényi i in., 2012; Gaffney i in., 2015; Affara i in., 2009].

1.1.4.2. Układ uPA/uPAR

Głównym mechanizmem aktywacji i zarazem regulacji MMPs jest szlak uPA/uPAR. W wyniku połączenia się urokinazowego aktywatora plazminogenu (uPA) z jego receptorem, dochodzi do katalizacji przekształcenia plazminogenu do plazminy, która z kolei aktywuje pro-MMP do MMP. Ponadto, sama plazmina także może degradować ECM [Brooks i in., 2010; Mason, Joyce, 2011; Ulisse i in., 2009; Tang, Han, 2013; Jaiswal i in., 2018].

Urokinazowy aktywator plazminogenu wydzielany jest zarówno przez komórki nowotworowe, jak i komórki mikrośrodowiska. Uwalniany jest w formie jednołańcuchowego zymogenu, który aktywowany jest w wyniku proteolitycznego cięcia prowadzonego przez proteazy takie jak plazmina, katepsyny (B, G czy L) czy kalikreina. W wyniku tych procesów utworzona zostaje dwułańcuchowa cząsteczka. Posiada ona trzy domeny: domenę katalityczną o aktywności proteazy serynowej na końcu C-terminalnym, domenę kringle oraz domenę dla czynników wzrostu na końcu N, którą wiąże się do uPAR [Ulisse i in., 2009; Tang, Han, 2013; Jaiswal i in., 2018]. Głównym substratem dla uPA jest plazmina. Pomędzy uPA i plazminą występuje pętla wzajemnej aktywacji, tj. plazmina może katalizować aktywację pro-uPA do aktywnej cząsteczki, z kolei uPA katalizuje przekształcanie plazminogenu do plazminy. Urokinazowy aktywator plazminogenu może samodzielnie aktywować plazminę, jednakże w formie związanej z receptorem aktywność ta wzrasta kilkudziesięciokrotnie [Mason, Joyce, 2011; Tang, Han, 2013; Jaiswal i in., 2018]

Regulacja uPA ma miejsce (Ryc. 15A): (i) na poziomie genetycznym – gen *PLAU*, kodujący uPA, regulowany może być przez MAPK/ERK, c-Jun N-terminalną kinazę (JNK, ang. c-Jun N-terminal kinase), czynniki wzrostowe, kinazy FAK i Src, jak również NF- κ B; (ii) na poziomie epigenetycznym, w wyniku metylacji i demetylacji

DNA, acetylacji i deacetylacji histonów, a także posttranslacyjnej obróbki białek histonowych; (iii) poprzez regulację wydzielania – czynniki wzrostowe, takie jak EGF czy VEGF, jak również TNF- α indukują wydzielanie uPA; (iv) poprzez proteolizę sekwencji pro- zymogenu (trypsyna, termolizyna, katepsyny, kalikreina, plazmina); (v) zahamowanie aktywności przez inhibitory aktywatora plazminogenu (PAIs, ang. plasminogen activator inhibitors) [Ulisse i in., 2009; Tang, Han, 2013; Jaiswal i in., 2018].

Większość cząsteczek uPA występuje w organizmie w formie zymogenu lub związanych jest z PAI-1. W środowisku nowotworu, poziom uPA jest znacznie podwyższony, gdyż produkowany jest również przez komórki mikrośrodowiska. Białko to uczestniczy w nabywaniu fenotypu migracyjnego przez komórki, ułatwia także i umożliwia ich inwazję, migrację oraz przebieg procesu angiogenezy [Ulisse i in., 2009; Tang, Han, 2013; Jaiswal i in., 2018].

Receptor uPA (uPAR) jest białkiem zakotwiczonym w błonie komórkowej. Nie posiada on domeny transmembranowej, zakotwiczony jest poprzez GPI, dołączony do łańcucha C-terminalnego. uPAR posiada trzy domeny: D1, D2 i D3 uczestniczące w wiązaniu uPA, przy czym najważniejszą rolę pełni domena D1. Oprócz uPA, uPAR może wiązać się także z witronektyną oraz integrzynami, a także oddziaływać z innymi powierzchniowymi receptorami, uczestnicząc w wielu procesach związanych z kancerogenezą i przerzutowaniem [Ulisse i in., 2009; Tang, Han, 2013; Jaiswal i in., 2018].

Układ uPA/uPAR podlega negatywnej regulacji przez swoiste inhibitory, należące do rodziny serpin (inhibitorów proteaz serynowych, ang. *serine protease inhibitor*), PAI-1 i PAI-2, przy czym ten pierwszy odgrywa ważniejszą rolę. Białka te nazywane są „inhibitorami samobójczymi”, jako że zahamowanie aktywności proteazy przebiega z degradacją inhibitora. PAI-1 i PAI-2 mogą także hamować aktywność tPA, z kolei inny inhibitor z rodziny serpin, α 2-antyplazmina (A2AP), uczestniczy w inaktywacji plazminy [Brooks i in., 2010; Ulisse i in., 2009; Tang, Han, 2013; Jaiswal i in., 2018; Li i in., 2018].

Główną rolą układu uPA-uPAR jest indukcja aktywności proteaz, w szczególności plazminy i metaloproteinaz, które dokonując degradacji składników macierzy zewnątrzkomórkowej tkanek sąsiadujących z guzem, naczyń krwionośnych czy błony podstawnej, umożliwiają inwazję, migrację i przerzutowanie. Ponadto, jako że uPAR nie posiada domeny transmembranowej, jest w stanie poruszać się

wzdłuż błony komórkowej i docierać do miejsc, w których obecne są białka tworzące połączenia międzykomórkowe oraz między komórkami i ECM. Następnie przeprowadzają proteolizę białek zaangażowanych w adhezję. Układ uPA/uPAR, poprzez indukcję wytwarzania czynników wzrostowych (TGF- β , EGF, VEGF, HGF, FGF, IGF), aktywację określonych szlaków molekularnych (FAK, Src, Ras/Raf, NF- κ B, PI3K/Akt), jak również interakcję z integrzynami może stymulować proliferację, angiogenezę, inwazję, migrację i przerzutowanie komórek raka. Obecne są także interakcje uPA/uPAR ze szlakami zaangażowanymi w indukcję EMT, jak również białkami Rho. Dochodzi wtedy do indukcji nabywania przez komórki fenotypu migracyjnego i stymulację ich poruszania się (Ryc. 15A) [Brooks i in., 2010; Ulisse i in., 2009; Tang, Han, 2013; Jaiswal i in., 2018].

1.1.4.3. Białka podrodziny Rho

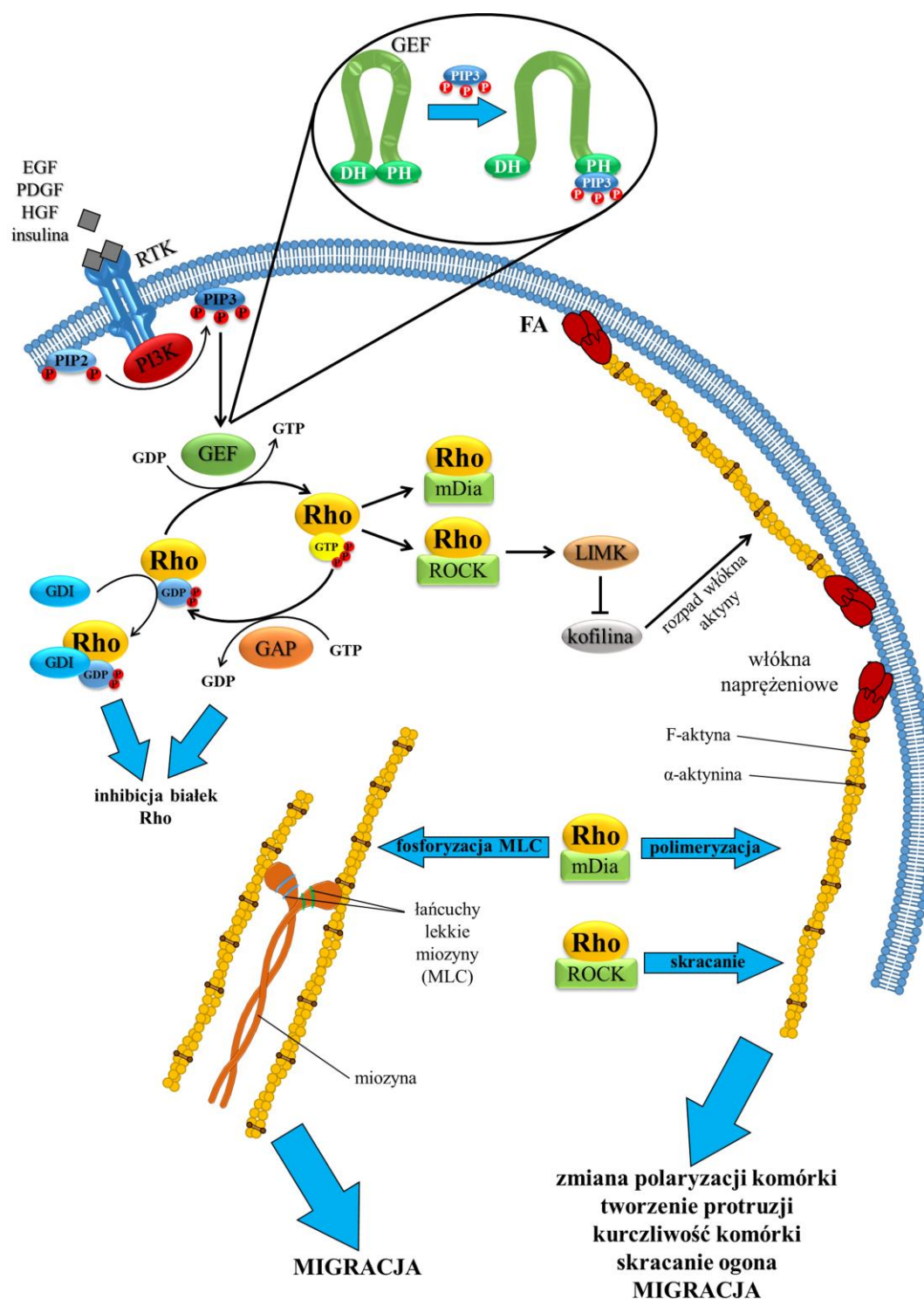
Rho to nadrodzina kilkudziesięciu białek o aktywności GTP-az, zwanych także ze względu na swoją niewielką masę, wahającą się między 20 a 40 kDa, małymi białkami G lub małymi GTP-azami. Do najważniejszych podrodzin należą: Rac (Rac1, Rac2, Rac3, RhoG), Rho (RhoA, RhoC, RhoB) oraz Cdc42 (Cdc42, RhoJ, RhoQ). Główną funkcją białek Rho jest interakcja z cytoszkieletem aktynowym poprzez jego polimeryzację i depolimeryzację. Umożliwia to zmianę polaryzacji komórki, tworzenie wypustek, migrację, a także znoszenie sił działających na i wewnątrz komórki. Białka Rho odgrywają także rolę w modyfikacji cytoszkieletu podczas mitozy i cytokinezy, jak również w hamowaniu kontaktowym, gdzie na skutek ich aktywności komórka, która natrafiła na inną komórkę, zmienia swój kierunek ruchu. Białka Rho wchodzi w ścisłe interakcje z kateninami, a poprzez nie z kadherynami, uczestnicząc zarówno w regulacji adhezji komórkowej, jak również procesów związanych z migracją i przerzutowaniem komórek nowotworowych [Klimaszewska i in., 2011; Batson i in., 2013; Jansen i in., 2018; Malinova, Huveneers, 2018]. Szczególną rolę w raku jelita grubego odgrywają białka RhoA i RhoC, które ulegają nadekspresji w tym nowotworze. Z kolei, poziom RhoB wykazującego aktywność przeciwnowotworową, ulega zmniejszeniu [Jansen i in., 2018].

Białka Rho wykazują różnice w budowie. Wspólna dla wszystkich przedstawicieli rodziny jest obecność domen wiążących nukleotydy guanylowe na końcu N oraz domena efektorowa o powinowactwie do lipidów, zlokalizowana

w części C-terminalnej. Domena ta powstaje w wyniku obróbki posttranslacyjnej poprzez dobudowanie do jej struktury reszt lipidowych farnezyłu, geranylogeranylu, palmitylu czy mirystylu. Białka podrodziny Rho (RhoA, RhoC, RhoB) modyfikowane są geranylogeranylem, przy czym RhoB w swojej domenie posiada także resztę farnezyłu. Dzięki lipidowemu „ogonowi” białka Rho mogą być kotwiczone w błonie, odpowiednio lokalizowane w komórce (w konkretnym kompartmentcie), jak również oddziaływać z określonymi czynnikami, regulując ich aktywność [Jansen i in., 2018; Wertheimer i in., 2012; Hanna, El-Sibai, 2013; Warner i in., 2019; Ridley, 2015].

Białka Rho mogą występować w formie aktywnej lub nieaktywnej. Przełączenie między nimi regulowane jest przez proteiny stymulujące aktywność GTPazową małych białek G (GAPs, ang. GTP-ase activating proteins) oraz czynniki wymiany nukleotydów guanylowych (GEFs, ang. guanine nucleotide exchange factors). GAPs indukują hydrolizę GTP przez białka Rho, co prowadzi do ich inhibicji. Z kolei GEFs katalizują przekształcenie GDP do GTP, co skutkuje aktywacją Rho. Tym samym, forma aktywna związana jest z GTP, natomiast nieaktywna – z GDP. Ponadto, w regulację małych GTP-az zaangażowane są białka hamujące spontaniczną dysocjację nukleotydów guaninowych (GDIs, ang. guanine nucleotide dissociation inhibitors), które wiążą domenę GTP-azową białek Rho, zapobiegając ich aktywacji i utrzymując je w stanie nieaktywnym (Ryc. 16) [Klimaszewska i in., 2011; Jansen i in., 2018; Wertheimer i in., 2012].

Białka Rho aktywują określone efektory, co prowadzi do przekształcenia cytoszkieletu. Przedstawiciele podrodziny Rho aktywują kinazę zależną od białek Rho (ROCK, ang. Rho-associated protein kinase) oraz ssaczy homolog genu *diaphanous* (mDia, ang. mammalian homolog of diaphanous) [Hanna, El-Sibai, 2013]. Ich indukcja skutkuje stabilizacją włókien aktyny, kurczeniem aktynomiozyny i polimeryzacją aktyny [Jansen i in., 2018; Wertheimer i in., 2012; Hanna, El-Sibai, 2013; Warner i in., 2019].



Ryc. 16. Regulacja aktywności białek podrodziny Rho i ich efektorów w procesie przekształcania aktyny [opracowanie własne]

RTK – receptorowa kinaza tyrozynowa; PIP2 – fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan; PIP3 – fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforan; DH, PH – domeny GEF; GEF – aktywator białek Rho; GAP – inhibitor białek Rho; mDia, ROCK – efekторы białek Rho; LIMK – kinaza LIM; MLC – łańcuch lekki miozyny

Dzięki aktywności efektorów indukowanych przez białka Rho, komórka jest zdolna do tworzenia protruzji – lamellipodiów, filopodiów czy invadopodiów. Są one następstwem polimeryzacji F-aktyny i jej kurczenia wskutek depolimeryzacji aktyny. Ponadto, w wyniku przesuwania się miozyny względem aktyny, komórka zdolna jest do ruchu. Na skutek polimeryzacji i depolimeryzacji włókien F-aktyny dochodzi także do skracania „ogona” podczas ruchu, a aktywność RhoA umożliwia lokalną adhezję komórki do ECM. RhoA i RhoC uczestniczą również w tworzeniu włókien naprężeniowych i kontaktów ogniskowych (FAs, ang. focal adhesions), które zapewniają odpowiednie naprężenia i siły mechaniczne potrzebne do przemieszczenia się, wydłużania oraz skracania komórki [Jansen i in., 2018; Wertheimer i in., 2012; Hanna, El-Sibai, 2013; Warner i in., 2019; Pellegrin, Mellor, 2007; Burridge, Guilluy, 2016]. Ponadto, GTP-azy Rho, szczególnie z rodziny Cdc42, uczestniczą w wyznaczaniu kierunku migrującej komórki oraz odgrywają kluczową rolę w tworzeniu wypustek sensorycznych – filopodiów [Warner i in., 2019; Ridley, 2015; Karlsson i in., 2009].

Białka Rho uczestniczą nie tylko w klasycznym mechanizmie ruchu komórek raka (ruchu mezenchymalnym), ale też podczas ruchu ameboidalnego oraz kolektywnego. Szczególną rolę odgrywają tutaj RhoA i RhoC [Jansen i in., 2018].

Odgrywają one kluczową rolę w migracji i przerzutowaniu komórek raka dzięki modyfikacji cytoszkieletu. Okazuje się jednak, iż pełnią one także funkcje pronowotworowe niezależne od przekształcania cytoszkieletu, będąc regulatorami licznych szlaków molekularnych. Ich zwiększona aktywność w nowotworze zwykle jest wynikiem nadekspresji GEFs i czynników je indukujących. Białka Rho pozytywnie regulują procesy takie, jak: (i) proliferacja komórek nowotworowych i wzrost guza – poprzez indukcję cyklin (np. D1) i kinaz zależnych od cyklin (CDKs, ang. cyclin-dependent kinases) oraz hamowanie inhibitorów proliferacji (np. produkt genu supresorowego, białko p21); (ii) przeżycie komórek i inhibicja apoptozy – poprzez szlaki MAPK/ERK, ROCK/LIMK2 oraz zmniejszenie ekspresji białka proapoptycznego Bax oraz białka RhoB; (iii) angiogenezę – w wyniku indukcji HIF-1 i VEGF; (iv) progresję i przerzutowanie – poprzez szlak PI3K/Akt, stabilizację HIF-1 α z jednoczesną inhibicją VHL, indukcję EMT poprzez szlak Snail oraz białko towarzyszące kinazie Yes (YAP, ang. Yes-associated protein), które zwiększa ekspresję β -kateniny [Jansen i in., 2018; Wertheimer i in., 2012; Hanna, El-Sibai, 2013; Karlsson i in., 2009; Croft, Olson, 2011].

Białko RhoB wykazuje aktywność przeciwnowotworową, głównie poprzez zależną od JNK indukcję białka proapoptotycznego Bim. Z tego względu bardzo często dochodzi do supresji RhoB w nowotworach [Jansen i in., 2018; Croft, Olson, 2011]. Istnieją doniesienia o pronowotworowym charakterze białka RhoB. Nie jest to jednak potwierdzone, a większość źródeł wskazuje jednak na indukcję apoptozy i funkcje przeciwnowotworowe.

Regulacja białek Rho podlega przede wszystkim za sprawą GEFs i GAPs. Mogą one ulegać indukcji pod wpływem kinaz tyrozynowych, MAPK czy PI3K, indukowanych przez RTKs. Okazuje się, iż szlak MAPK może bezpośrednio aktywować Rho. Ponadto, ulegają one regulacji pod wpływem GPCRs oraz integrzyn. Te drugie mogą być indukowane do aktywacji białek Rho przez receptor uPA [Jansen i in., 2018; Wertheimer i in., 2012; Hanna, El-Sibai, 2013; Warner i in., 2019]. Ponadto, aktywność białek Rho, w szczególności RhoA, może być regulowana przez kinazę FAK; może to być regulacja pozytywna, jak i negatywna. Prawdopodobnym jest, iż proces aktywacji i inaktywacji RhoA przez FAK zachodzi cyklicznie. Na początku cyklu ruchu komórki zachodzi inhibicja, natomiast w późniejszym etapie indukcja RhoA [Tomar, Schlaepfer, 2009]. Istnieją także doniesienia o indukcji aktywności białek Rho przez same MMPs lub na skutek ich aktywności (poprzez proteolizę E-kadheryny) [Lynch i in., 2010; Orgaz i in., 2014]. Podejrzewa się, iż za integrację MMPs i białek Rho odpowiada glikoproteina CD44, będąca receptorem dla kwasu hialuronowego (HA, ang. hyaluronic acid). Białko to po związaniu ligandu, HA, przekazuje sygnał do wnętrza komórki, co skutkuje zwiększeniem proliferacji, inwazyjności i migracji komórek nowotworowych. Proponowanym mechanizmem odpowiedzialnym za taką aktywność jest indukcja szlaków Twist, białek RhoA i RhoC oraz szlaku PI3K/Akt w wyniku związania HA z CD44. Okazuje się również, iż receptor ten może wiązać aktywne metaloproteinazy macierzy (głównie MMP-9) [Bourguignon i in., 2010; Torre i in., 2010; Chen i in., 2018].

1.1.4.4. Cyklooksygenaza-2

Cyklooksygenazy (COXs), czyli syntazy prostaglandyn (PTGS, ang. prostaglandin-endoperoxidase synthase), to rodzina enzymów należących do grupy oksydoreduktaz (1.14.99.1) o aktywności mieloperoksydaz. Zlokalizowane są

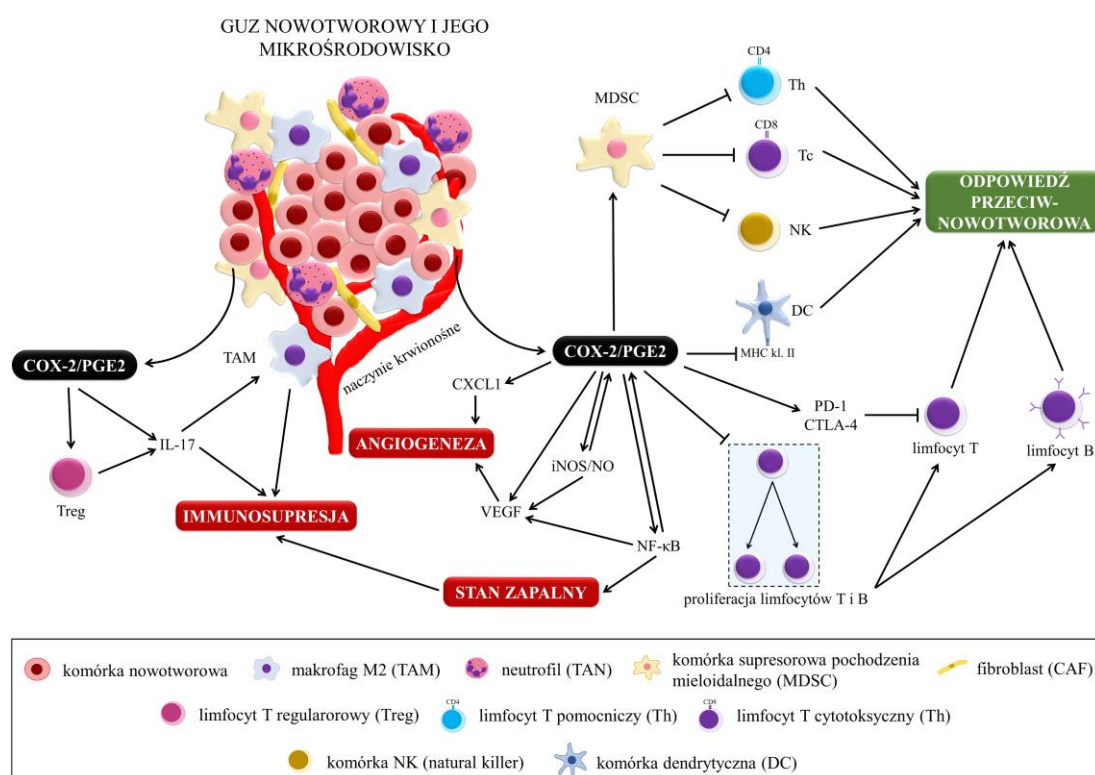
na retikulum endoplazmatycznym i błonie jądrowej. Cyklooksygenazy katalizują przekształcenie kwasu arachidonowego, uwolnionego z błony komórkowej, do prostaglandyn (D₂, E₂, F₂ α , I₂) oraz tromboksanu A₂. Poznano 3 izoformy tego enzymu, przy czym cyklooksygenaza-2, zwana indukowalną, odgrywa kluczową rolę w stanie zapalnym i kancerogenezie. COX-2 może być produkowana zarówno przez komórki guza, jak i mikrośrodowiska [Sobolewski i in., 2010; Liu i in., 2015; Benelli i in., 2018; Su i in., 2016].

COX-2 ulega indukcji wskutek przzerwania ciągłości tkanki lub rozwijającego się stanu zapalnego. Zatem w komórkach prawidłowych nabłonka jelita grubego czy wczesnych polipach jej ekspresja jest niższa, w nowotworze zaś dochodzi do jej nadekspresji. Do czynników indukujących aktywność PTGS-2 należą cytokiny (TNF- α , IL-1 β , IL-6), czynniki wzrostowe, lipopolisacharyd (LPS) oraz wtórny kwas żółciowy – deoksycholowy (DCA, ang. deoxycholic acid). Ponadto, ulega ona wzajemnej regulacji z NF- κ B oraz iNOS [Samadi i in., 2015; Vannini i in., 2015; Sobolewski i in., 2010; Liu i in., 2015; Benelli i in., 2018]. Wykazano także, iż COX-2 może ulegać zależnej od NF- κ B aktywacji przez białka RhoA, RhoC oraz kinazę ROCK [Benitah i in., 2003; Lang i in., 2017].

Głównym produktem aktywności COX-2 związanym z nowotworzeniem jest prostaglandyna E₂. Powstała PGE₂ szybko oddysocjowuje i wiąże się ze swoim receptorem (EP1, EP2, EP3 lub EP4), aktywując określone szlaki sygnałowe w komórce, w zależności od tego, który receptor został pobudzony. W przypadku pobudzenia EP1 dochodzi do nagromadzenia jonów wapnia w komórce wskutek pobudzenia fosfolipazy C (PLC, ang. phospholipase C) oraz trifosforanu inozytolu (IP₃, ang. inositol triphosphate). Związanie się PGE₂ z EP2 lub EP4 prowadzi do kaskady aktywacji białka G oraz cyklazy adenyłowej (AC, ang. adenylyl cyclase), co skutkuje zwiększeniem ilości cAMP (cyklicznego adenozyntrifosforanu) w komórce. Prowadzi to do indukcji określonych szlaków molekularnych, takich jak kinaza białkowa A (PKA, ang. protein kinase A) oraz PI3K/Akt, co w następstwie prowadzi do aktywacji β -kateniny. Dochodzi wtedy do zwiększenia ekspresji genów zaangażowanych w unikanie apoptozy czy zwiększenie potencjału inwazyjnego i migracyjnego komórek. Ponadto, indukcji może ulegać szlak ERK, co skutkuje pobudzeniem cykliny i wzmożeniem proliferacji, a także jeden z GEFs, co prowadzi do aktywacji białek Rho (Rac1). Receptor EP3 wykazuje działanie antagonistyczne do EP2 i EP4, a jego aktywacja skutkuje inhibicją cyklazy adenyłowej i zmniejszeniem

ilości cAMP [Samadi i in., 2015; Jansen i in., 2018; Sobolewski i in., 2010; Liu i in., 2015].

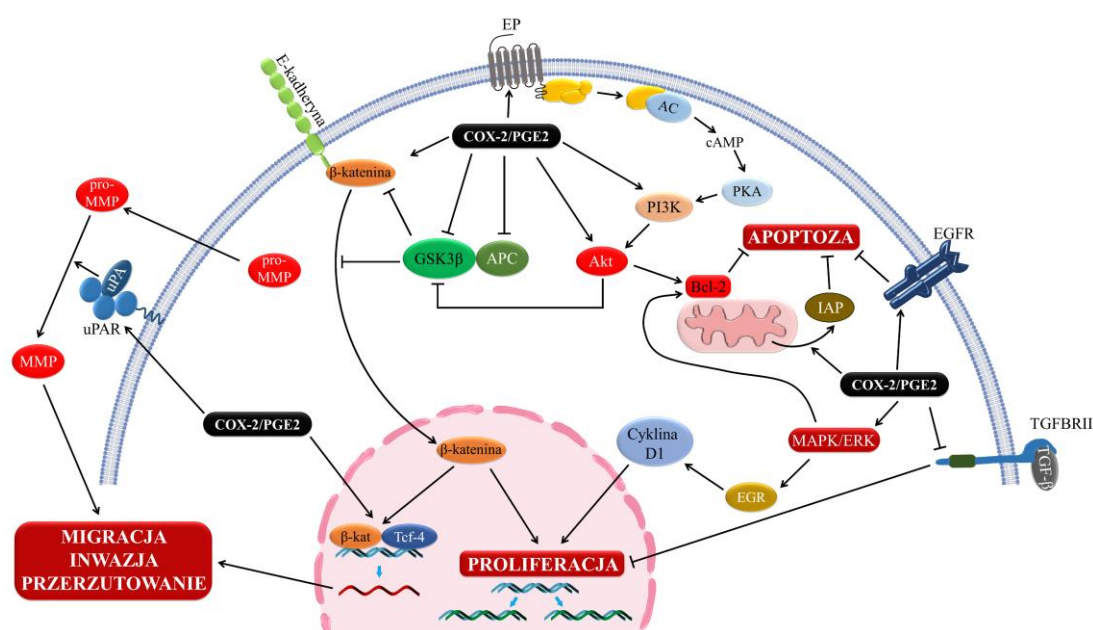
Cyklooksygenaza-2 odgrywa kluczową rolę w indukcji i utrzymaniu stanu zapalnego oraz w kancerogenezie. Zarówno COX-2, jak i PGE2 są w ścisłej relacji z mikrośrodowiskiem nowotworu. Ich aktywność wzmagana jest przez pozakomórkowe składniki TME, głównie cytokiny, indukujące ściąganie i dojrzewanie składników komórkowych (MDSCs, Tregs czy TAMs) oraz wydzielanie pozakomórkowych (IL-17, PD-1, CTLA4). Te z kolei nasilają immunosupresję oraz ucieczkę spod nadzoru immunologicznego. Ponadto, COX-2 ulega wzajemnej regulacji z NF- κ B oraz iNOS/NO, co wzmacnia stan zapalny w środowisku guza, jak i całym organizmie (Ryc. 17) [Schetter i in., 2010; Samadi i in., 2015; Liu i in., 2015; Zelenay i in., 2015].



Ryc. 17. Udział COX-2/PGE2 wydzielanych przez komórki nowotworowe oraz mikrośrodowiska w immunomodulacji i stanie zapalnym [opracowanie własne]

Cyklooksygenaza-2 wraz z PGE2 oraz w mniejszym stopniu innymi prostaglandynami, odgrywa kluczową rolę w inicjacji nowotworu. Odbывается głównie poprzez inaktywację białka supresorowego APC (Ryc. 18). COX-2/PGE2 uczestniczy także w indukcji proliferacji i migracji komórek, promocji angiogenezy

Wykazano, iż zwiększona ekspresja cyklooksygenazy-2 jest związana z gorszą prognozą dla pacjentów i większą śmiertelnością z powodu raka jelita grubego [Ogino i in., 2008].



EP – receptor PGE2; AC – cyklaza adenylowa; PKA – kinaza białkowa A; Bcl-2 – białko anty-apoptotyczne; IAP – białko hamujące apoptozę; EGR – białko odpowiedzi wczesnego wzrostu; Tcf-4 – czynnik transkrypcyjny;

55

1.1.5. Lekooporność nowotworów

Im wyższe jest stadium nowotworu, tym wyższa jego śmiertelność i oporność na leczenie. Nowotwory stadium IV, przerzutowego, wykazują te cechy w najwyższym stopniu. Odpowiedzialne za to są duża masa guza pierwotnego, obecność wtórnych ognisk choroby, upośledzenie układu immunologicznego ze względu na długą, często wieloletnią, walkę organizmu z nowotworem, ale także podwyższona ekspresja systemów oporności lekowej. Do systemów tych należą między innymi białka, które w sposób czynny usuwają z komórki ksenobiotyki, w tym leki chemioterapeutyczne.

Oporność lekowa polega na zmniejszeniu efektywności leku względem komórek docelowych. W przypadku nowotworów występuje zjawisko oporności wielolekowej (MDR, ang. multi-drug resistance), związane z opornością nie na jeden określony lek, a na całą grupę. Oporność wielolekowa może być pierwotna (wrodzona), kiedy to komórki nowotworowe wykazują aktywność systemów oporności zanim zastosowane zostanie leczenie oraz nabyta w przypadku której komórki początkowo są wrażliwe na działanie leków, uzyskując oporność wraz z prowadzoną terapią [Hu i in., 2016; Namee, O'Driscoll, 2018].

Komórki nowotworowe wykształciły wiele mechanizmów oporności na leczenie ujawniających się na poziomie:

- a) molekularnym – zmiany epigenetyczne, mechanizmy naprawy DNA, białka czynnie usuwające ksenobiotyki, inhibicja apoptozy;
- b) komórkowym – mechanizmy mitochondrialne, zmiany w cyklu komórkowym,;
- c) pozakomórkowym – udział mikrośrodowiska, czynniki wydzielane autokrynnie, pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, enzymy metabolizujące leki [Hu i in., 2016; Namee, O'Driscoll, 2018; Pathania i in., 2018; Li i in., 2016; Sakthivel, Hariharan, 2017; Butera i in., 2018; Naci i in., 2015; Guerra i in., 2017; Velaei i in., 2016; Houthuijzen i in., 2014].

Jedną z cech nowotworu jest inaktywacja systemów naprawy DNA. Okazuje się jednak, iż komórki nowotworowe wykształciły inne mechanizmy jego naprawy, takie jak białko WRN, system HOTAIR czy kinaza Aurora A, których regulacja zachodzi w wyniku aktywności onkogenów. Dzięki temu mogą być odporne na działanie leków powodujących powstawanie błędów w materiale genetycznym [Sakthivel, Hariharan, 2017]. Ponadto, charakterystyczną cechą nowotworów jest unikanie apoptozy.

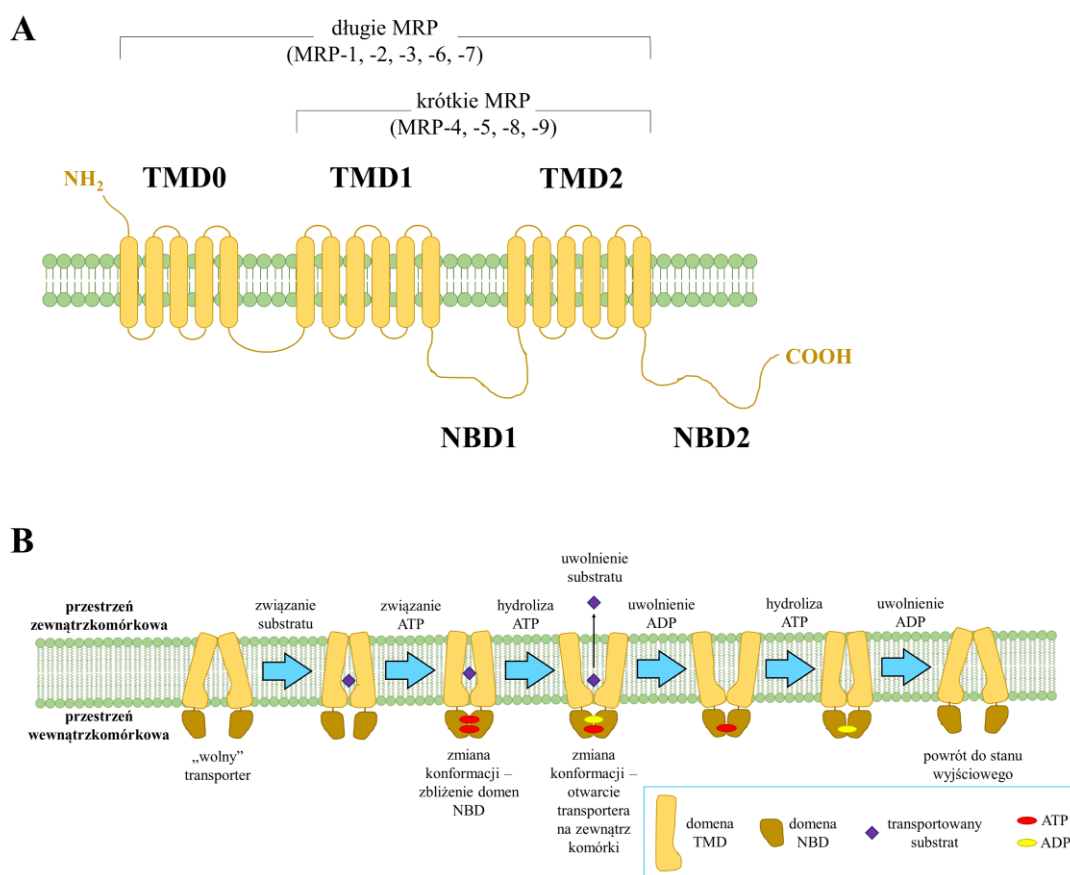
W wyniku tego skuteczność substancji i leków opartych na mechanizmie indukcji programowanej śmierci jest ograniczona [Hu i in., 2016; Sakthivel, Hariharan, 2017; Butera i in., 2018; Naci i in., 2015]. Zmiany mitochondrialne, w tym mutacje w mitochondrialnym DNA (mtDNA), prowadzą do wzmocnienia oporności na apoptozę, a także indukcja szlaków zaangażowanych w progresję nowotworu. Ponadto, prowadzi to do promocji białek związanych z opornością lekową [Guerra i in., 2017]. W komórkach nowotworowych często dochodzi także do nadekspresji enzymów uczestniczących w biotransformacji ksenobiotyków [Pathania i in., 2018]. Komórki nowotworowe zdolne są wytwarzać pęcherzyki pozakomórkowe (EVs, ang. extracellular vesicles), za pośrednictwem których transportowane są między komórkami różne czynniki, takie jak miRNA, mRNA, fragmenty DNA czy białka i enzymy. Wśród tych czynników znajdować się mogą białka oporności wielolekowej czy miRNA indukujące taką aktywność. Ponadto, EVs mogą być wykorzystywane do oplaszczania i usuwania leków z wnętrza komórki [Namee, O'Driscoll, 2018; Butera i in., 2018]. Kluczową rolę w lekooporności odgrywają także komórkowe i pozakomórkowe składniki TME, w tym MMPs, jak również może ona być promowana przez EMT oraz nowotworowe komórki macierzyste [Sakthivel, Hariharan, 2017; Butera i in., 2018; Velaei i in., 2016; Houthuijzen i in., 2014; Ween i in., 2015].

1.1.5.1. Białka oporności wielolekowej (MDR)

Do najważniejszych czynników zaangażowanych w chemiooporność należą białka oporności wielolekowej, będące przedstawicielami rodziny transporterów wiążących ATP (ABCs, ang. ATP-binding cassetes). Są to transmembranowe białka o charakterze transporterów, które umożliwiają transport różnych substancji przez błonę, zarówno z komórki, jak i do niej. Do transportowanych cząstek należą między innymi cząstki sygnałowe, metabolity czy ksenobiotyki. Do tej pory u ludzi poznano 48 przedstawicieli tej rodziny uszeregowanych w 7 podrodzin, ABCA-ABCG. Trzy najważniejsze białka zaangażowane w chemiooporność to glikoproteina P (P-gp, ang. P-glicoprotein), MRP oraz białko oporności raka piersi (BCRP, ang. breast cancer resistance protein) [Hu i in., 2016; Ween i in., 2015; Fletcher i in., 2016].

Białka MRP należą do podrodziny ABCC, do tej pory poznano 9 przedstawicieli. Białka te zlokalizowane są w błonie komórkowej; zbudowane są

z α -helis przenikających membranę, zgrupowanych w 2 lub 3 domeny transmembranowe TMD (ang. transmembrane domain, zwane także MSDs, ang. membrane-spanning domain), które z kolei połączone są domenami wiążącymi nukleotydy (NBDs, ang. nucleotide-binding domains), odpowiedzialnymi za wiązanie ATP (Ryc. 19A). W pełni strukturalne MRP składa się z 4 domen, TMD1-NDB1 i TMD2-NBD2, przy czym niektóre MRP posiadają dodatkową domenę, TMD0. Transporter w stanie wolnym otwarty jest do wnętrza komórki. W wyniku wiązania i hydrolizy ATP dochodzi do zmian konformacyjnych, które prowadzą do otwarcia transportera na zewnątrz komórki i uwolnienie transportowanego substratu, a następnie powrót białka do struktury pierwotnej (Ryc. 19B) [Zhang Y-K i in., 2015; Kryczka, Boncela, 2018; Robey i in., 2018].



Ryc. 19. Struktura białek MDR podrodziny ABCC (MRPs) (A) oraz mechanizm transportu za ich pośrednictwem (B) [opracowanie własne]

W wyniku związania substratu dochodzi do zmian konformacji białka MRP, wskutek których domeny NBD1 i NBD2 ulegają zbliżeniu do siebie. Umożliwia to związanie dwóch cząsteczek ATP, które kolejno najpierw ulegają hydrolizie, a następnie uwolnieniu. Hydroliza pierwszej z nich powoduje zajście zmian w konformacji białka, co skutkuje otwarciem transportera na zewnątrz komórki i uwolnieniem transportowanego substratu. Hydroliza i uwolnienie drugiej cząsteczki ATP powoduje kolejne zmiany konformacji i powrót białka do struktury pierwotnej – otwarcia transportera do wewnątrz komórki

Białka MRP odpowiadają za transport między innymi glutationu, który odgrywa rolę w regulacji transportu, jak również siarczanów, kwasu glukuronowego, fosfolipidów, kwasów żółciowych, prostaglandyn i leukotrienów, cyklicznych nukleotydów oraz cytostatyków, takich jak: irynotekan (kamptotecyna-11), doksorubicyna, etopozyd czy winkrystyna [Hu i in., 2016; Fletcher i in., 2016; Domenichini i in., 2019]. W różnych nowotworach, w tym w raku jelita grubego, MRPs ulegają nadekspresji, co związane jest ze słabą odpowiedzią pacjenta na chemioterapię i złym rokowaniem [Ween i in., 2015; Fletcher i in., 2016]. Białka te, oprócz usuwania z komórki leków, mogą także odgrywać rolę w rozwoju i progresji nowotworu. Za sprawą ABCC transportowane są lipidy, które z jednej strony mogą indukować szereg szlaków molekularnych w komórce, z drugiej zaś odgrywają rolę w procesach anabolicznych, dzięki czemu przyczyniają się do wzrostu proliferacji komórek. MRPs uczestniczą także w transporcie prostaglandyn i leukotrienów, co skutkuje nasileniem stanu zapalnego, immunomodulacją, inhibicją apoptozy oraz indukcją angiogenezy, migracji i inwazji. Ponadto, leukotrien C4 ulega zależnej do ABCC translokacji na zewnątrz komórki, gdzie indukuje szlaki związane z proliferacją i przeżyciem komórek [Li i in., 2016; Kryczka, Boncela, 2018; Domenichini i in., 2019].

MRPs mogą ulegać nadekspresji nie tylko w komórkach guza, ale także mikrośrodowiska. Taką cechę wykazują między innymi TAMs, co przyczynia się do progresji nowotworu i chemiooporności. Ponadto, MRPs oraz inne białka MDR mogą być przekazywane między komórkami guza i mikrośrodowiska, na przykład za sprawą EVs [Li i in., 2016; Domenichini i in., 2019].

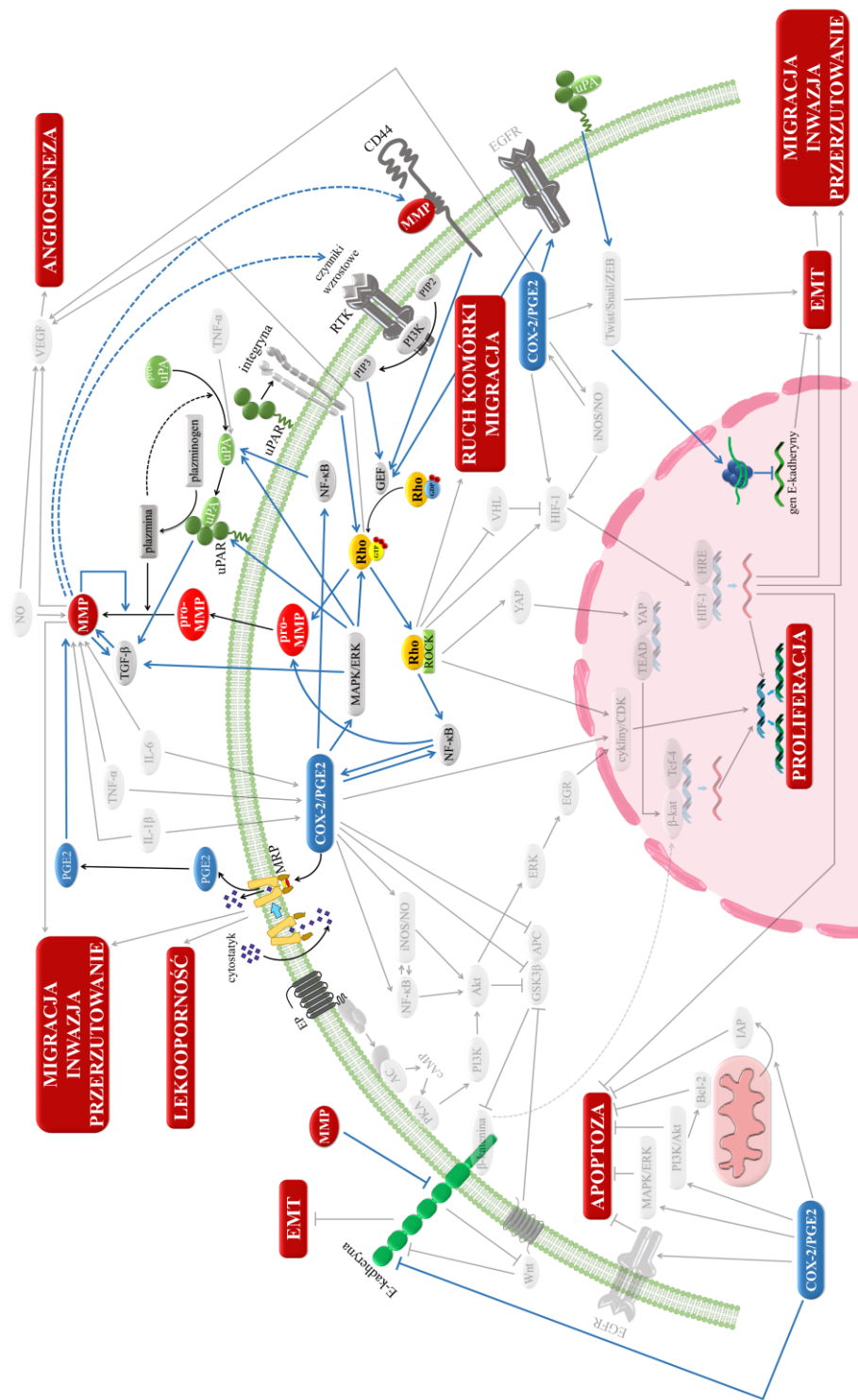
MRPs oraz pozostałe białka MDR ulegają w nowotworze nadekspresji, promując progresję oraz będąc kluczowym czynnikiem zaangażowanym w chemiooporność. Do czynników promujących ekspresję MRPs należą HIF-1 czy cytokiny, jak na przykład IL-1 β [Hu i in., 2016]. Wykazano także, iż białka MDR (głównie P-gp, ale także MRP-1 i -4) ulegać mogą indukcji pod wpływem aktywności COX-2/PGE2 [Sobolewski i in., 2010; Saikawa i in., 2004; Surowiak i in., 2008; Maeng i in., 2014].

1.1.6. Wzajemna regulacja czynników zaangażowanych w przerzutowanie

Do głównych czynników regulujących migrację, inwazję oraz przerzutowanie komórek nowotworowych, ze szczególnym uwzględnieniem raka jelita grubego, należą metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej, białka rodziny Rho oraz cyklooksygenaza-2. Szczególną rolę w nowotworach przerzutujących odgrywa także oporność komórek na leczenie, za którą odpowiedzialne są między innymi białka oporności wielolekowej. Wymienione czynniki są przedmiotem badań niniejszej pracy.

Pomiędzy COX-2, MMPs i białkami Rho występuje wzajemna sieć regulacji. Metaloproteinazy macierzy, poprzez zależną od czynników wzrostowych aktywację RTKs, indukują szlak aktywacji białek Rho. Ponadto, uPAR może indukować GTP-azy Rho poprzez integriny. Wykazano także, iż MMP-9 może wiązać się z receptorem dla kwasu hialuronowego, CD44, co skutkuje aktywacją GEFs. Białka podrodziny Rho mogą również ulegać aktywacji wskutek aktywności COX-2/PGE2 poprzez szlak MAPK/ERK. MMPs mogą być z kolei indukowane przez PGE2, a także w wyniku zależnej od COX-2/PGE2 aktywacji szlaku MAPK/ERK oraz TGF- β i NF- κ B. Ekspresja metaloproteinaz macierzy oraz białek Rho ulega także zwiększeniu w wyniku zajścia EMT. COX-2 stymulowana może być poprzez kinazę ROCK, natomiast szlak COX-2/PGE2 może indukować białka oporności wielolekowej, głównie P-gp. Wykazano także, iż cyklooksygenaza-2 może wzmacniać ekspresję białek MRP-1 oraz MRP-4.

Wzajemną regulację opisanych czynników przedstawiono na Ryc. 20.



Ryc. 20. Udział MMPs, białek Rho, COX-2 oraz MRP w kancerogenezie oraz ich wzajemna regulacja (oznaczona niebieskimi strzałkami)
[opracowanie własne]

1.2. Rak jelita grubego

Rak jelita grubego (CRC, ang. colorectal cancer) jest jednym z najczęściej występujących i najbardziej śmiertelnych nowotworów. Mimo dostępnej diagnostyki, bardzo często wykrywany jest w późnym stadium, co zmniejsza szanse chorego na wyzdrowienie czy przeżycie. Powodem tego mogą być niespecyficzne objawy choroby oraz duże spektrum czynników etiologicznych.

Większość nowotworów jelita grubego to gruczolakoraki (*adenocarcinoma*). Mogą one powstawać ze zmian łagodnych, gruczolaków (*adenoma*), jak również z polipów.

1.2.1. Epidemiologia

Zachorowalność i umieralność na raka jelita grubego wykazuje tendencję wzrostową. Według danych przedstawionych w raporcie GLOBOCAN 2018 (wykonywanym każdego roku przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem (IARC, ang. International Agency for Research on Cancer), będącą oddziałem WHO) w roku 2018 liczba nowych przypadków CRC na świecie wyniosła ponad 1,8 miliona, z kolei liczba zgonów – około 880 tysięcy. Ten typ nowotworu zajmuje więc trzecie miejsce pod względem zachorowań i drugie w kontekście śmiertelności [Bray i in., 2018]. W Europie, liczba szacowanych zachorowań w roku 2018 wyniosła około 500 tysięcy, zgonów zaś około 200 tysięcy (według raportów Europejskiego Towarzystwa Onkologii Medycznej (ESMO, ang. European Society for Medical Oncology) oraz IARC). Największy odsetek zachorowań i zgonów z powodu raka jelita grubego w Europie przypada na Norwegię i Węgry [Bray i in., 2018; Malvezzi i in., 2017]. W Polsce, CRC w 2018 roku był na drugim miejscu pod względem zachorowań (ok. 61 tys. przypadków) i trzecim pod względem śmiertelności (około 35 tys.) w przypadku mężczyzn oraz trzecim miejscem pod względem nowych przypadków (około 33 tys.) i zgonów (około 18 tys.) w przypadku kobiet (Tab. 2) [Ferlay i in., 2018].

Tabela 2. Szacowana zachorowalność i umieralność na raka jelita grubego (w tysiącach) w Polsce, Europie i na świecie [opracowanie własne; na podstawie: Bray i in., 2018; Malvezzi i in., 2017; Ferlay i in., 2018]

M – mężczyźni; K – kobiety; R – razem obie płcie

	Zachorowalność (tysięcy)			Śmiertelność (tysięcy)		
	M	K	R	M	K	R
Świat	1000	800	1800	480	400	880
Europa	270	230	500	130	110	240
Polska	61	33	94	35	18	53

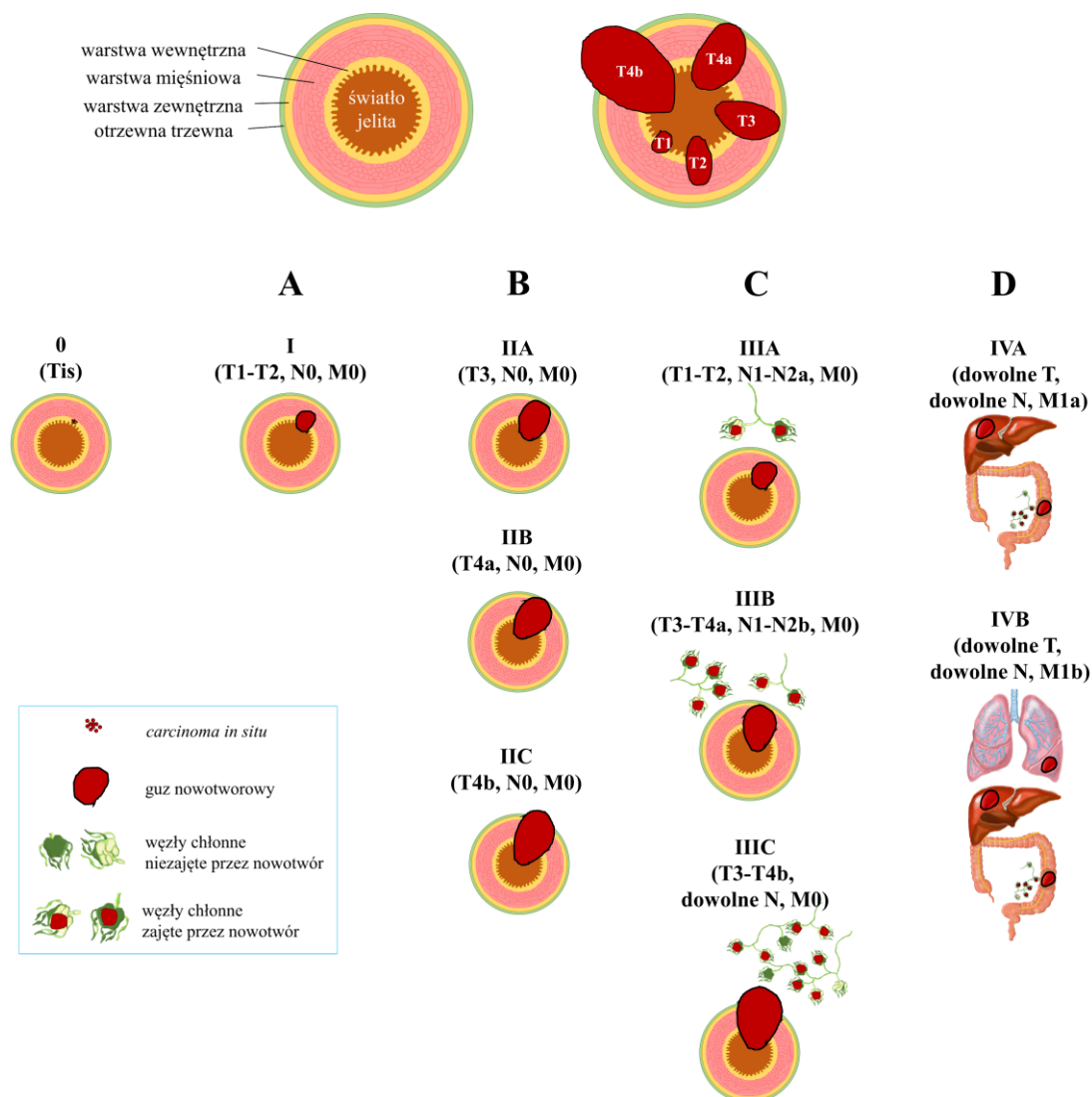
1.2.2. Patogeneza

Rak jelita grubego rozwija się z tkanki nabłonkowej wyściełającej okrężnicę lub odbytnicę. Guz rozwija się z komórek znajdujących się w tzw. kryptach jelita. Krypty to swoiste wgłębienia ściany jelita, otwarte do światła narządu. W każdej kryptce, u jej podstawy, znajduje się kilka komórek macierzystych. Gdy dojdzie do zaburzenia regulacji proliferacji i migracji tych komórek, głównie na skutek mutacji w genie *APC*, wówczas rozwinąć się może nowotwór [Wright, 2000; Barker i in., 2009; Tan i in., 2015; Testa i in., 2018]. Mutacje mogą zachodzić także w innych genach, takich jak gen supresorowy *TP53*, gen kodujący β -kateninę (w wyniku czego staje się ona oporna na fosforylację, prowadzącą do ubikwitynacji i degradacji) czy proto-onkogen *KRAS*. Dochodzi także do niestabilności chromosomalnej. Jest to mechanizm klasyczny, tzw. *adenoma to carcinoma*, czyli przekształcenie gruczolaka (nowotworu łagodnego) do gruczolakoraka (zmiany złośliwej). Zwykle proces ten trwa kilkanaście lat. Drugim, charakterystycznym mechanizmem patogenezy CRC, jest przekształcenie polipa do raka poprzez tzw. zmiany ząbkowane (ang. serrated pathway). W pierwszym etapie dochodzi do mutacji w protoonkogenach *KRAS* i *BRAF* i powstania komórek o fenotypie CIMP (ang. CpG island methylator phenotype), czyli takich, u których doszło do metylacji w obrębie wysp CpG. W innym, rzadziej występującym mechanizmie, dochodzi do uszkodzenia systemu MMR, co prowadzi do niestabilności mikrosatelitarnej. Mechanizm ten związany jest z syndromem Lyncha [Testa i in., 2018; Mustafa i in., 2016; Kuipers i in., 2015].

1.2.3. Stadia nowotworu

Guz nowotworowy powstaje w najbardziej wewnętrznej warstwie ściany jelita. Wraz ze wzrostem, zajmuje kolejne warstwy, jednocześnie coraz bardziej ograniczając światło jelita. Aby móc charakteryzować postęp choroby, wprowadzono

klasyfikacje określające tzw. stadium nowotworu. Jedną z pierwszych klasyfikacji był system TNM. Obecnie częściej się stosuje jednak system liczbowy lub, w przypadku raka jelita grubego, klasyfikację literową Dukes'a. Stadia rozwoju nowotworu zostały przedstawione na ryc. 21.



Ryc. 21. Stadia rozwoju raka jelita grubego; Tis – carcinoma in situ – nowotwór nie tworzy jeszcze guza; T – wielkość guza; N – ilość zajętych węzłów chłonnych (N0 – brak); M – obecność i ilość przerzutów lub ich brak (M0) [opracowanie własne; na podstawie: Kordek i in., 2007; AJCC, 2017]

1.2.4. Etiologia

Uważa się, iż niewielka tylko część (około 20%) nowotworów jelita grubego ma podłoże genetyczne. Rak powstający w tym organie wykazuje dużą zależność

od czynników takich, jak dieta, dziedziczne zespoły chorobowe, skład mikrobiomu czy historia rodzinna chorób, w tym nowotworów.

Jednym z głównych czynników ryzyka CRC są dziedziczne i niedziedziczne choroby jelita. Wśród chorób dziedzicznych największą rolę odgrywają zespół rodzinnej polipowatości gruczolakowatej (FAP, ang. familial adenomatous polyposis), zespół Lyncha i inne, np. zespół Peutza-Jeghersa, polipowatość młodzieńcza czy polipowatość związana z genem *MUTYH*. Choroby niedziedziczne, a związane z ryzykiem zachorowania na raka jelita grubego to przede wszystkim niespecyficzne zapalenia jelit (IBDs, ang. inflammatory bowel diseases), w tym choroba Leśniowskiego-Crohna czy wrzodziejące zapalenie jelit [Testa i in., 2018; Mustafa i in., 2016; Haggar, Boushey, 2009].

Do genetycznych i epigenetycznych czynników etiologicznych należą przede wszystkim mutacje w genach supresorowych *TP53* i *APC* oraz protoonkogenach *KRAS*, *BRAF*, *SMAD4*, *HER2* czy *PI3KCA*. Ponadto, dochodzi do aberracji chromosomalnych i niestabilności chromosomalnej (CIN, ang. chromosomal instability), uszkodzenia lub inaktywacji systemów naprawy DNA (w tym metylacji metylotransferazy metyloguaninowej (MGMT, ang. methylguanine DNA methyltransferase), niestabilności mikrosatelitarnych, metylacji wysp CpG czy zmiany ekspresji określonych miRNA [Testa i in., 2018; Mustafa i in., 2016].

Kluczową rolę w etiologii raka jelita grubego odgrywa także skład diety. Spożywanie dużych ilości czerwonego mięsa oraz mięsa przetworzonego może się przyczynić do rozwoju choroby, ze względu na powstawanie kancerogennych N-nitrozozwiązków, reaktywnych form tlenu oraz indukcji procesów pronowotworowych [Haggar, Boushey, 2009; Corpet, 2011; Oostindjer i in., 2014; Helmus i in., 2013]. Obok spożywania czerwonego mięsa, czynnikiem ryzyka CRC jest dieta zasobna w tłuszcz. Przyjmowanie tłustych pokarmów skutkuje przekształceniem przez bakterie jelitowe pierwotnych kwasów żółciowych (kwasy cholowy czy chenodeoksycholowy) do wtórnych (kwasy deoksycholowy (DOC, DCA) czy lithocholowy (LCA), które powodują indukcję szlaków i czynników pronowotworowych [Liu i in., 2017; Ajouz i in., 2014]. Ponadto, tłusta dieta prowadzi do zwiększenia ilości brzusznej tkanki tłuszczowej oraz otyłości. Dochodzi w wyniku tego do rozwinięcia się konstytutywnego stanu zapalnego, jak również spadku ilości czynników przeciwnowotworowych i wzrostu – pronowotworowych [O'Neill i in., 2016; Tarasiuk i in., 2018]. Okazuje się jednak, iż długołańcuchowe,

wielonienasycone kwasy tłuszczowe (np. omega-3), znane ze swojej aktywności prozdrowotnej, wykazują działanie przeciwnowotworowe [Tarasiuk i in., 2018].

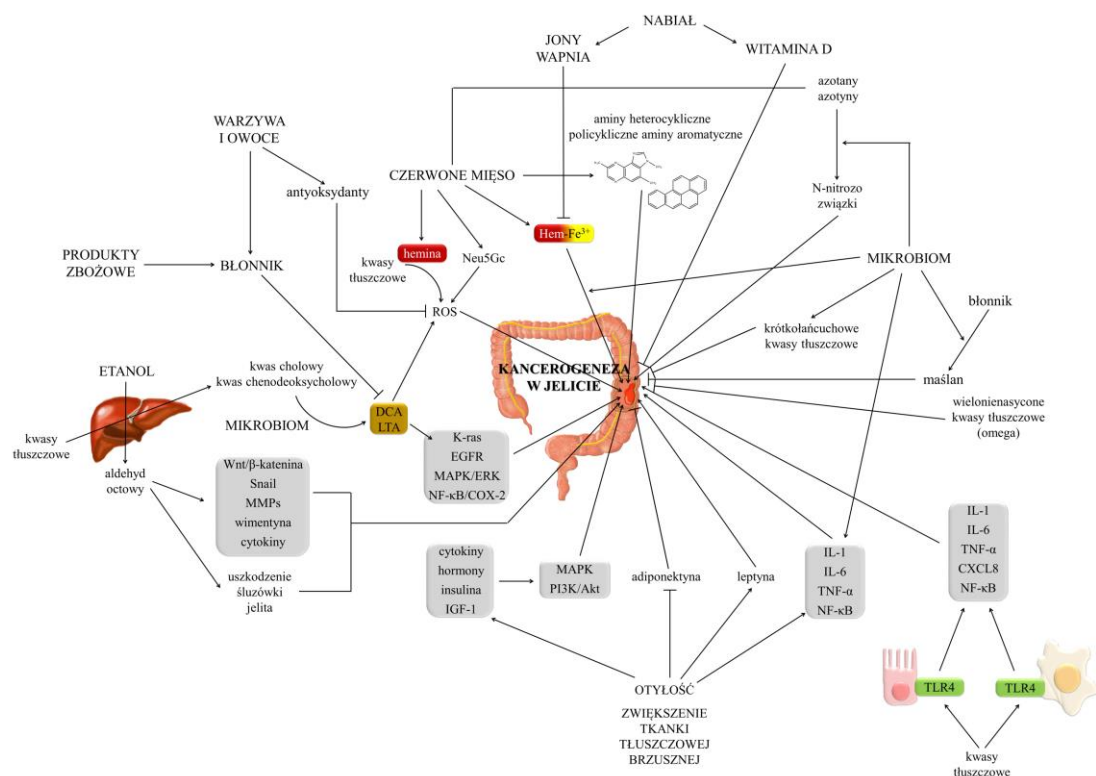
Do składników diety, które mogą działać prewencyjnie w stosunku do raka jelita grubego należą nabiał, zboża, warzywa i owoce. Wynika to z obecności w nich witaminy D, jonów wapnia, błonnika, antyoksydantów i substancji o charakterze przeciwnowotworowym, takich jak apigenina, genisteina, rezweratrol, kurkumina, epigallokatechina czy triterpenoidy (w tym kwas ursolowy i oleanolowy) [Oostindjer i in., 2014; Ajouz i in., 2014; Campbell, Trump, 2017; Ferrer-Mayorga i in., 2019; Hagggar, Boushey, 2009; Wang i in., 2012].

Ściśle związany z rozwojem raka jelita grubego jest brak aktywności fizycznej. Regularne ćwiczenia z jednej strony zmniejszają tkankę tłuszczową i zapobiegają otyłości, z drugiej zaś dochodzi do indukcji szeregu czynników. Podczas aktywności fizycznej zmienia ulega charakter wydzielania hormonów, zmniejszeniu ulega także insulinooporność [Hagggar, Boushey, 2009].

Na zapoczątkowanie kancerogenezy w jelicie grubym może także wpływać regularne spożywanie alkoholu. Sam alkohol etylowy nie wykazuje aktywności pronowotworowej, odpowiedzialny za nią jest produkt metabolizmu etanolu, aldehyd octowy, który powoduje uszkodzenie struktury jelita, zmianę mikroflory oraz wzmoczenie stanu zapalnego [Na, Lee, 2017].

Zasadniczą rolę w rozwoju i progresji CRC odgrywa mikrobiom – zarówno jego skład, jak i funkcjonalność. Zarówno bakterie patogenne, jak i komensale mogą powodować zmiany strukturalne i wydzielnicze w tkance jelita grubego oraz przyczyniać się do wydzielania cytokin i czynników o charakterze pronowotworowym [Chen i in., 2017; Sun, Kato, 2016; Wang i in., 2017]. Z drugiej strony, metabolity niektórych bakterii, na przykład krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, w szczególności maślan (powstały w wyniku fermentacji błonnika), zmniejszają stan zapalny, działają immunomodulacyjnie ograniczając rozwój raka jelita grubego [Chen i in., 2017; Sun, Kato, 2016]. Wśród bakterii związanych z CRC występują te z rodzajów *Enterococcus*, *Helicobacter*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Salmonella*, *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Fusobacterium*, *Akkermansia*, a także *E. coli*; efekt antynowotworowy wykazują zaś: *Bifidobacterium spp* czy *Propionibacteri spp* [Chen i in., 2017; Sun, Kato, 2016; Wang i in., 2017].

W rozwoju raka jelita grubego udział biorą także czynniki psychologiczne, geograficzne czy socjo-ekonomiczne [Bray i in., 2018; Hagggar, Boushey, 2009].



Ryc. 22. Mechanizm aktywności wybranych czynników etiologicznych i profilaktycznych w rozwoju lub hamowaniu raka jelita grubego [opracowanie własne]

1.2.5. Objawy, diagnoza, biomarkery i leczenie

Objawy raka jelita grubego są zwykle niespecyficzne. We wczesnych stadiach rozwoju choroby mogą nie występować. Pojawiają się natomiast w stadiach, które są trudne do leczenia. To, jakie objawy wystąpią, zależy głównie od umiejscowienia nowotworu [Kordek i in., 2007].

Wśród objawów CRC można wyróżnić zmianę rytmu wypróżnień, uczucie niepełnego wypróżnienia, wzdęcia, nietrzymanie gazów i stolca, zmęczenie, objawy związane z anemią, a także objawy będące wynikiem obstrukcji jelita: ból, nudności, wymioty, problem z oddawaniem stolca. Do bardziej typowych objawów należą ból w okolicy powstania guza czy krew w stolcu [Kordek i in., 2007; Kuipers i in., 2015].

Diagnostyka raka jelita grubego wykorzystuje szeroki wachlarz badań. Do najmniej inwazyjnych należą test na krew utajoną w stolcu (enzymatyczny gFOBT czy immunochemiczny FIT) oraz badanie per rectum. Mogą one jednak dawać wynik fałszywie negatywny. Większe prawdopodobieństwo wykrycia nowotworu dają badania endoskopowe – rektoskopia, sigmoidoskopia i kolonoskopia – umożliwiające

jednocześnie usunięcie polipów czy wczesnych gruczolaków. Ponadto, stosować można diagnostykę opartą na badaniach radiologicznych, ultrasonografii, tomografii komputerowej, rezonansie magnetycznym czy, w ostateczności, biopsji [Kordek i in., 2007; Kuipers i in., 2015; Das i in., 2017]. Obecnie, coraz częściej stosowany jest także test DNA, umożliwiający z wysoką dokładnością wykrycie w stolcu genów związanych z kancerogenezą [Kuipers i in., 2015].

W skryningu CRC wysoką wartość diagnostyczną niosą biomarkery. Do najczęściej wykorzystywanych biomarkerów diagnostycznych należą: antygen karcinoembrionalny (CEA), kadheryna 17, geny septyny 9 (*SEPT9*), *APC*, *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *PTEN*, a także profil niestabilności mikrosatelitarnej (MSI). Ponadto, analizować można markery prognostyczne, dające rozeznanie w zaawansowaniu choroby i szansach przeżycia pacjenta. Do markerów prognostycznych należą: MSI, *BRAF*, *KRAS*, *APC*, CA19-9, COX-2, MMPs, EGFR, VEGF czy SMAD4 [Kuipers i in., 2015; Das i in., 2017; Er i in., 2015; Berretta i in., 2017; Ronnekleiv-Kelly i in., 2016].

Do podstawowych metod leczenia raka jelita grubego należą radioterapia, chemioterapia oraz resekcja chirurgiczna.

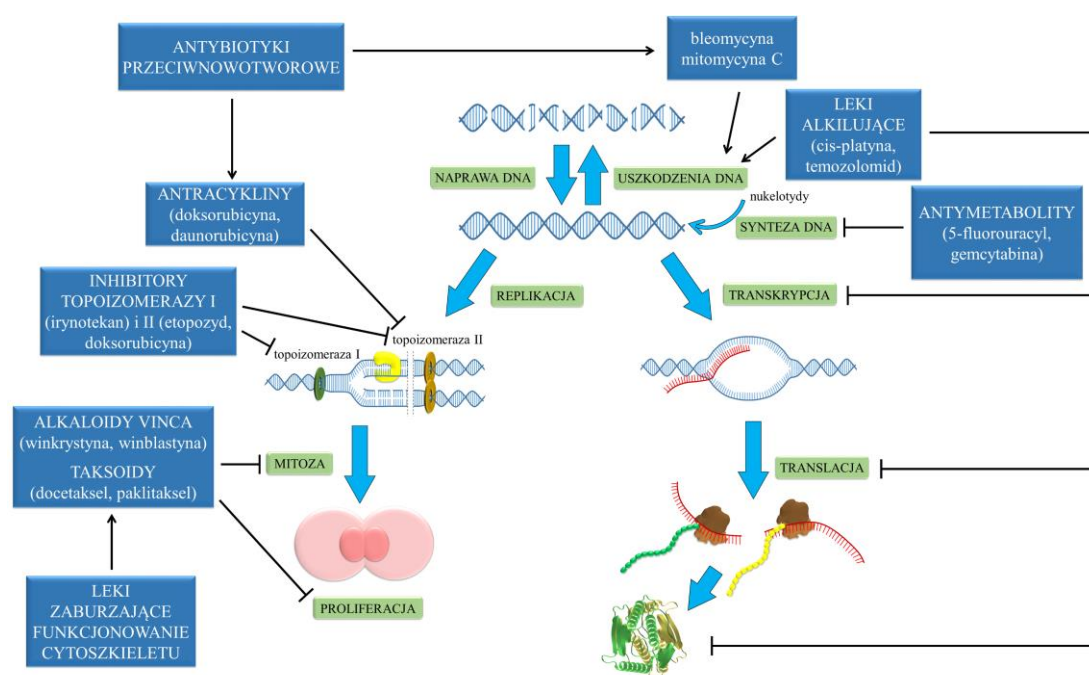
1.3. Terapie przeciwnowotworowe

1.3.1. Rutynowe terapie

Do rutynowych terapii nowotworów złośliwych należą resekcja chirurgiczna, radioterapia, chemioterapia oraz hormonoterapia. Często bywa, iż terapia polega na zastosowaniu kilku różnych strategii – na przykład, często przed operacją dokonuje się wstępnej terapii cytostatykami lub radioterapii. Możliwe, iż podczas interwencji chirurgicznej konieczne będzie dokonanie kolektomii (usunięcia części jelita) lub anastomozy (zespoleń jelitowe) oraz utworzenie stomii (połączenia światła jelita ze skórą w celu utworzenia nowego ujścia narządu) [Kuipers i in., 2015]. Radioterapia, czyli wykorzystanie promieniowania jonizującego (β , γ lub X) w celu miejscowego leczenia nowotworu złośliwego, stosowana jest głównie w przypadku raka odbytu [Kordek i in., 2007]. W chemioterapii CRC obecnie stosowane strategie terapeutyczne oparte są na terapii adjuwantowej – zastosowaniem dwóch lub trzech cytostatyków. Najczęściej stosowane leki to: 5-fluorouracyl, oksaliplatyna, kapecytabina

czy irynotekan, który jest jednocześnie głównym cytostatykiem stosowanym w przypadku terapii przerzutującego CRC [Kuipers i in., 2015; Tsuji, Sugihara, 2016; Gustavsson i in., 2015]. Razem z chemioterapeutykami stosowane mogą być inhibitory EGFR i VEGF oraz przeciwciała monoklonalne [Kuipers i in., 2015; Vogel i in., 2017].

Chemioterapia to zastosowanie cytostatyków, czyli substancji niszczących komórki, w celu zwalczania nowotworu. Eliminacja komórek nowotworowych przez cytostatyki może zachodzić na drodze różnych mechanizmów (Ryc. 23) [Kordek i in., 2007; Li i in., 2016; Espinosa i in., 2003; Malhotra, Perry, 2003].



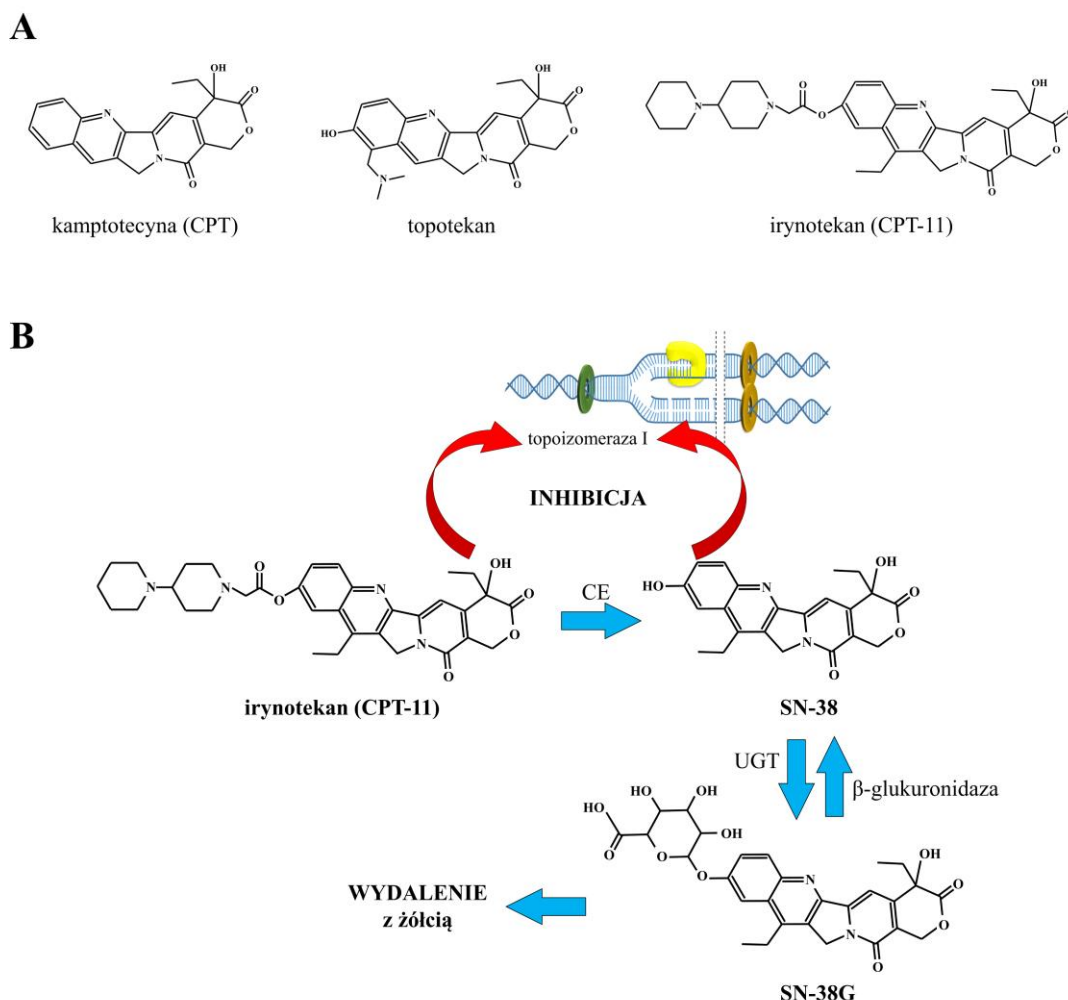
Ryc. 23. Mechanizm aktywności głównych grup chemioterapeutyków [opracowanie własne]

Hormonoterapia stosowana jest w leczeniu nowotworów hormonozależnych (np. rak tarczycy, gruczołu krokowego, jądra czy jajnika), polega na podwyższeniu lub obniżeniu stężenia określonych hormonów [Kordek i in., 2007].

1.3.1.1. Kamptotecyna-11

Głównym cytostatykiem stosowanym w terapii przerzutującego raka jelita grubego jest kamptotecyna-11 (CPT-11), inaczej irynotekan. Lek ten jest analogiem kamptotecyny, alkaloidu izolowanego z kory drzewa *Camptotheca acuminata*. Początkowo w chemioterapii stosowano kamptotecynę, później topotekan, ze względu

jednak na poważne skutki uboczne leki te zostały wycofane i opracowano nową pochodną – irynotekan. Mimo, iż w mniejszym stopniu niż czysta kamptotecyna czy topotekan, to CPT-11 również wykazuje skutki uboczne [Mathijssen i in., 2001; de Man i in., 2018; Li i in., 2017; Martino i in., 2017].



Ryc. 24. Porównanie struktury kamptotecyny (CPT), topotekanu i kamptotecyny-11 (CPT-11, irynotekanu) (A); metabolizm i mechanizm aktywności irynotekanu (CPT-11) (B) [opracowanie własne]

SN-38 – główna forma aktywna CPT-11; SN-38G – glukuronidowa pochodna SN-38; CE – karboksylesteraza; UGT – UDP-glukuronylotransferaza

CPT-11 jest prolekiem, zwykle podawanym dożylnie, który w organizmie metabolizowany jest do kilku form, najważniejszą spośród których jest SN-38, powstała w wyniku hydrozylacji przez karboksylesterazy (CEs, ang. carboxylesterases). W mniejszym stopniu w metabolizmie CPT-11 rolę odgrywają także cytochrom P450, w wyniku czego powstają inne, mniej aktywne,

formy (które pod wpływem CEs mogą być przekształcone w SN-38). SN-38 inaktywowany jest w wyniku przekształcenia do glukuronidu, SN-38G, co katalizowane jest przez UDP-glukuronylotransferazę (UGT, ang. UDP-glucunoryltransferase). Reakcja ta może zostać odwrócona przez β -glukuronidazy produkowane przez bakterie jelitowe, co może skutkować efektami ubocznymi u pacjentów (Ryc. 24) [Mathijssen i in., 2001; de Man i in., 2018].

Przeciwnowotworowy mechanizm aktywności CPT-11 i SN-38 polega na inhibicji topoizomerazy I (Top1), enzymu zaangażowanego w replikację DNA. Kamptotecyna-11 wiąże się z DNA i Top1, tworząc trimer, który blokuje zarówno aktywność topoizomerazy, jak i stanowi przeszkodę dla widełek replikacyjnych. Skutkuje to powstaniem sił naprężeniowych, w wyniku czego dochodzi do pęknięcia podwójnej nici DNA i śmierci komórki. Ponadto, CPT-11 może powodować zmianę ekspresji określonych genów zaangażowanych w kancerogenezę, a także hamować angiogenezę [Li i in., 2017; Martino i in., 2017].

Zarówno CPT-11, jak i SN-38, może występować w dwóch formach, w zależności od pH – laktonu (niskie pH) o wysokiej aktywności lub karboksylanu (pH fizjologiczne i wyższe) o niskiej aktywności. Zatem w prawidłowych tkankach i krwiobiegu irynotekan będzie wykazywał słabszą aktywność, niż w zakwaszonym mikrośrodku guza [Kato i in., 2013; de Man i in., 2018].

1.3.2. Nowoczesne terapie przeciwnowotworowe

Poza rutynowymi terapiami, coraz większą popularnością cieszą się nowoczesne terapie przeciwnowotworowe, zwane biologicznymi. W strategiach tych wykorzystywane są narzędzia inżynierii genetycznej, cytokiny i przeciwciała, specyficzne inhibitory hamujące określone czynniki lub szlaki zaangażowane w kancerogenezę czy też substancje pochodzenia naturalnego, wykazujące właściwości przeciwnowotworowe. Do najważniejszych terapii tego typu należą: (i) terapia genowa – polega na zastąpieniu uszkodzonego genu jego prawidłową kopią, wprowadzeniu genów kodujących białka proapoptotyczne, wyciszeniu genów zaangażowanych w kancerogenezę, przerzutowanie czy inhibicję apoptozy [Śliwińska-Hill, Trocha, 2011]; (ii) przeciwciała monoklonalne (mAbs, ang. monoclonal antibodies) – mogą przyczynić się do zniszczenia guza przez układ gospodarza, czy też w wyniku zablokowania określonych szlaków molekularnych.

Ponadto, mogą być sprzężone z cytostatykiem, toksyną, radioizotopem, cytokiną czy enzymem [Śliwińska-Hill, Trocha, 2011; ElBakri i in., 2010; Chiavenna i in., 2017]; (iii) celowanie w CSC – terapia oparta na wykorzystaniu czynników (przeciwciał monoklonalnych, leków drobnocząsteczkowych czy miRNA) lub substancji pochodzenia naturalnego (np. kwercetyna, rezweratrol, dihydrokapsaicyna czy kurkumina) specyficznie wiążących antygeny charakterystyczne dla CSC czy ingerujących w szlaki i procesy komórkowe prowadzone przez komórki macierzyste [Ciurea i in., 2014; Iqbal i in., 2016; Agliano i in., 2017; Taylor, Jabbarzadeh, 2017]; (iv) immunoterapia – wykorzystanie czynników i komórek immunologicznych stymulujących układ gospodarza do zwalczania nowotworu lub blokujących immunosupresję i ucieczkę nowotworu spod nadzoru immunologicznego [Kaleta-Richter i in., 2019; Phung i in., 2019]; (v) immunoszczepionki – polegają na podaniu pacjentowi antygenów nowotworowych w celu wzmocnienia i skierowania przeciwko nim odpowiedzi immunologicznej; wykorzystywane są modyfikowane genetycznie komórki nowotworowe pacjenta lub pobrane od pacjenta komórki immunologiczne (DC, limfocyty T), indukowane z antygenami nowotworowymi [Śliwińska-Hill, Trocha, 2011; Agliano i in., 2017; Soiffer i in., 2003; Wolny, Lasek, 2010]; (vi) inhibitory kinaz tyrozynowych (TKIs, ang. tyrosine kinase inhibitors) – drobnocząsteczkowe leki, mAbs lub substancje pochodzenia naturalnego (rezweratrol, kwercetyna, kurkumina, apigenina, genisteina czy gallusan epigallokatechiny), których aktywność polega na hamowaniu aktywności kinaz tyrozynowych (EGFR, VEGFR, K-ras, B-raf, MET, CDKs, Src) występujących w nowotworze w nadekspresji i indukujących procesy pronowotworowe [Du, Lovly, 2018; Bhullar i in., 2018; Tan i in., 2018]; (vii) terapia fotodynamiczna (PDT, ang. photodynamic therapy) – zastosowanie substancji, które poddane działaniu określonego rodzaju światła powodują wytworzenie tlenu singletowego $^1\text{O}_2$. Z jednej strony wywołuje on efekt cytotoksyczny w komórkach nowotworowych, z drugiej zaś stymulację komórek immunologicznych gospodarza [Kaleta-Richter i in., 2019; Phung i in., 2019].

Przełomem w terapii nowotworów było zastosowanie tzw. terapii skojarzonej, czyli zastosowania więcej, niż jednej strategii terapeutycznej. Może to dotyczyć zastosowania kilku terapii rutynowych (chirurgia, radio- i chemioterapia), kilku cytostatyków, jak również połączenia terapii rutynowych z biologicznymi

lub kilku różnych biologicznych [Świeboda-Sadlej, 2011; Mokhtari i in., 2017]. Szczególnym typem terapii skojarzonej jest wykorzystanie substancji pochodzenia naturalnego, wykazujących potencjał przeciwnowotworowy, w połączeniu z cytostatykiem. Podejście takie jest przedmiotem poniższych badań.

1.3.3. Substancje o potencjale terapeutycznym

Dotychczas poznano ogromną liczbę substancji pochodzenia naturalnego, ich pochodnych czy też substancji syntetycznych o aktywności przeciwnowotworowej. Związki te mogą samodzielnie wykazywać potencjał zmniejszania wzrostu guza, indukcji apoptozy czy inhibicji proliferacji, angiogenezy migracji i przerzutowania. Ponadto, wiele z tych związków może potęgować efektywność chemioterapii, a nawet działać ochronnie na komórki prawidłowe.

Do substancji naturalnych o aktywności przeciwnowotworowej należą substancje pochodzenia roślinnego, takie jak: kwercetyna (obecna w kwiatach głogu), rezweratrol (winogrona), apigenina (pietruszka), fisetyna (jabłka i truskawki), likopen (pomidory), genisteina (soja), gallusan epigallokatechiny (zielona herbata), kwas rozmarynowy (rozmaryn), kurkumina (kurkuma), dihydroksykapsaicyna (papryka chilli), berberyna (berberys) [Wang i in., 2012; Taylor, Jabbarzadeh, 2017] czy też polisacharydy (głównie β -glukany), proteoglikany, glikoproteiny, białka, związki fenolowe i inne substancje bioaktywne pochodzące z grzybów, takich jak: *Lentinula edodes*, *Flammulina velutipes*, *Phelinus linteus*, *Ganoderma lucidum*, *Inonotus obliquus*, *Formitopsis betulina*, *Trametes versicolor*, *Cerrena unicolor*, *Cordyceps spp*, *Pleurotus spp* i wielu innych [De Silva i in., 2012; Figueiredo, Régis, 2017; Błagodatski i in., 2018]. Istnieją także związki o charakterze przeciwnowotworowym izolowane z organizmów zwierzęcych.

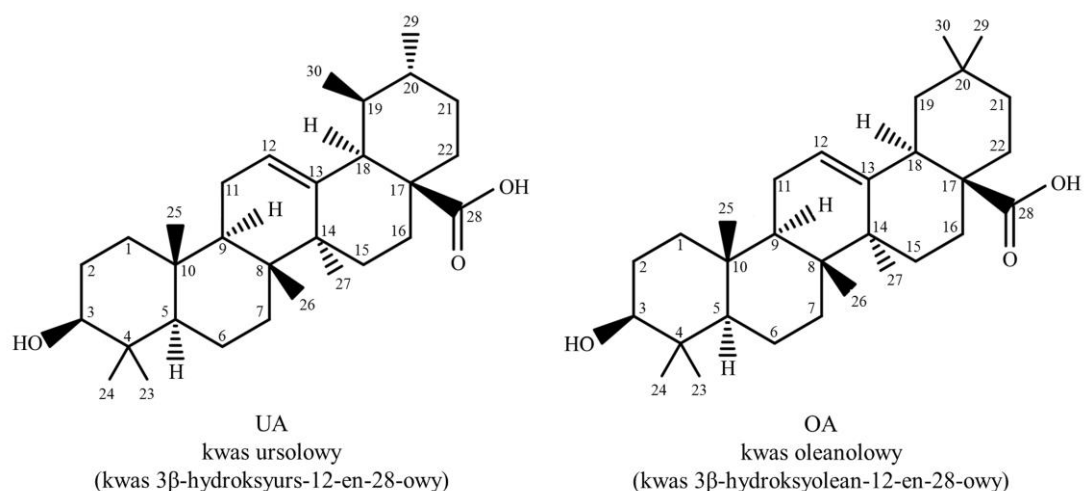
1.3.4. Pentacykliczne triterpenoidy jako przykład substancji o potencjale przeciwnowotworowym

Przykładem grupy związków o pożądanых właściwościach przeciwnowotworowych są triterpenoidy (saponiny). Związki te zbudowane są ze szkieletu, będącego aglikonem, do którego dołączone może być od jednej do trzech reszt cukrowych. Ponadto, triterpenoidy mogą różnić się ilością pierścieni. Najlepiej

poznane pod kątem potencjału przeciwnowotworowego są związki cztero- i pięciopierścieniowe (odpowiednio tetra- lub pentacykliczne). Do najważniejszych grup pentacyklicznych triterpenów należą ursany (kwas ursolowy, α -amyryna), oleany (kwas oleanolowy, kwas maslinowy, betulina, β -amyryna) i lupany (kwas betulinowy) [Parmar i in., 2013; Yang, Laval, 2014].

Pentacykliczne triterpeny produkowane są przede wszystkim przez rośliny. Ich synteza zachodzi najczęściej na drodze szlaku mewalonowego, w wyniku którego dochodzi do powstania podjednostki izoprenowej. W wyniku jej kondensacji wytworzony zostaje skwalen (C₃₀), który następnie ulega epoksydacji do 2,3-oksydoskwalenu. Ten z kolei ulega cyklizacji, w wyniku czego powstają różne związki pierścieniowe [Parmar i in., 2013; Yang, Laval, 2014; Voet i in., 2008].

Jednymi z najważniejszych przedstawicieli pentacyklicznych triterpenoidów są kwas ursolowy (UA, ang. ursolic acid) i kwas oleanolowy (OA, ang. oleanolic acid), będące przedmiotem badań. Związki te są izomerami, a różnią się miejscem przyłączenia dwóch grup metylowych (-CH₃). W przypadku UA przyłączone są one do węgli C-19 i C-20, w przypadku zaś OA obie grupy dołączone są do węgla C-20. W strukturze obu związków występują 3 miejsca aktywne: grupa hydroksylowa (-OH) przy węglu C-3, karboksylowa (-COOH) przy C-28 oraz podwójne wiązanie między C-12 a C-13 (Ryc. 25). Miejsca te mogą ulegać podstawieniu podczas syntezy pochodnych, odpowiadając także za aktywność kwasów. Relacje między strukturą a aktywnością związków nie są do końca poznane. Podejrzewa się, iż UA i OA mogą oddziaływać z cholesterolem, powodując destabilizację błony komórkowej [Podolak i in., 2010; Pollier, Goossens, 2012; Shanmugam i in., 2014; Zhang i in., 2017].



Ryc. 25. Struktura kwasów ursolowego i oleanolowego [opracowanie własne]

Kwasy ursolowy i oleanolowy występują przede wszystkim w roślinach. Kwas ursolowy obecny jest między innymi w skórce jabłek, żurawinie, jagodach, a także ziołach, przede wszystkim w rozmarynie. Kwas oleanolowy występuje głównie w liściach i owocach drzewa oliwnego. Ponadto, izolowany może być z żeń-szenia, jemioli, goździków czy grzyba *Ganoderma lucidum* [Shanmugam i in., 2014; Jung i in., 2010; Shanmugam i in., 2013; do Nascimento i in., 2014; Oprean i in., 2016].

Badane związki pełnią w roślinach różne funkcje. Są składnikami wosków, dzięki czemu chronią roślinę przed utratą wody, biorą udział w oddziaływaniu allelopatycznym oraz pełnią funkcje defensywne uczestnicząc w odstraszeniu roślinożerców [Pollier, Goossens, 2012; Shanmugam i in., 2014].

Wykazano, iż UA i OA wykazują szereg aktywności prozdrowotnych, takich jak: immunomodulacyjne, antyoksydacyjne, przeciwzapalne, przeciw-autoimmunologiczne, antydepresyjne, przeciwcukrzycowe, przeciwdrobnoustrojowe, zmniejszają otyłość i regulują gospodarkę lipidową, a także działają ochronnie na żołądek i wątrobę, serce czy układ nerwowy. Związki te wykazują także potencjał przeciwnowotworowy, opisywany już w literaturze, lecz w nowym układzie badany w prezentowanej pracy [Jung i in., 2010; do Nascimento i in., 2014; Checker i in., 2012; Baek i in., 2014; Machado i in., 2012; Zhang i in., 2006; Kunkel i in., 2012; Jang i in., 2009; Kurek i in., 2012; Fontanay i in., 2008; Kong i in., 2013; Ishikawa i in., 2008; Saravanan i in., 2006; Gutiérrez-Rebolledo i in., 2016; Han, Bakovic, 2015; Lu i in., 2007; Yang i in., 2010; Salvador i in., 2014].

2. Hipotezy badawcze

Celem badań było określenie wpływu kwasu ursolowego (UA), kwasu oleanolowego (OA) i kamptotecyny-11 (CPT-11) podawanych osobno i w połączeniu na zahamowanie migracji komórek raka jelita grubego oraz wyjaśnienie mechanizmu będącego podstawą tej aktywności.

Badania podzielono na etapy odpowiadające postawionym hipotezom cząstkowym:

- a) Czy UA, OA i CPT-11 wykazują aktywność przeciwnowotworową?
Czy połączenie kwasów ze sobą i z cytostatykiem wzmocni ich działanie?
- b) Jaki jest wpływ badanych związków na migrację komórek prawidłowych i nowotworowych oraz czy podanie ich w połączeniu wzmocni ten efekt?
- c) Na jakie szlaki molekularne związane z migracją oddziałują badane związki?
Czy aktywność ta jest silniejsza przy podaniu ich w połączeniu?

3. Materiały i metody

3.1. Materiały

3.1.1. Linie komórkowe

Badania prowadzone były na trzech liniach komórkowych:

- a) jako kontrola, wykorzystane zostały ludzkie prawidłowe adherentne komórki nabłonka jelita grubego transformowane termowrażliwym szczepem wirusa SV40 – linia CCD 841 CoTr (ATCC® CRL-1807™);
- b) model wczesnego stadium rozwoju nowotworu stanowiły ludzkie adherentne komórki raka jelita grubego stadium I (Dukes A) – linia HT-29 (ATCC® HTB-38™);
- c) jako model późnego, przerzutowego, stadium nowotworu stanowiły ludzkie adherentne komórki raka jelita grubego pochodzące z przerzutu do węzła chłonnego – linia SW 620 (ATCC® CCL-227™).

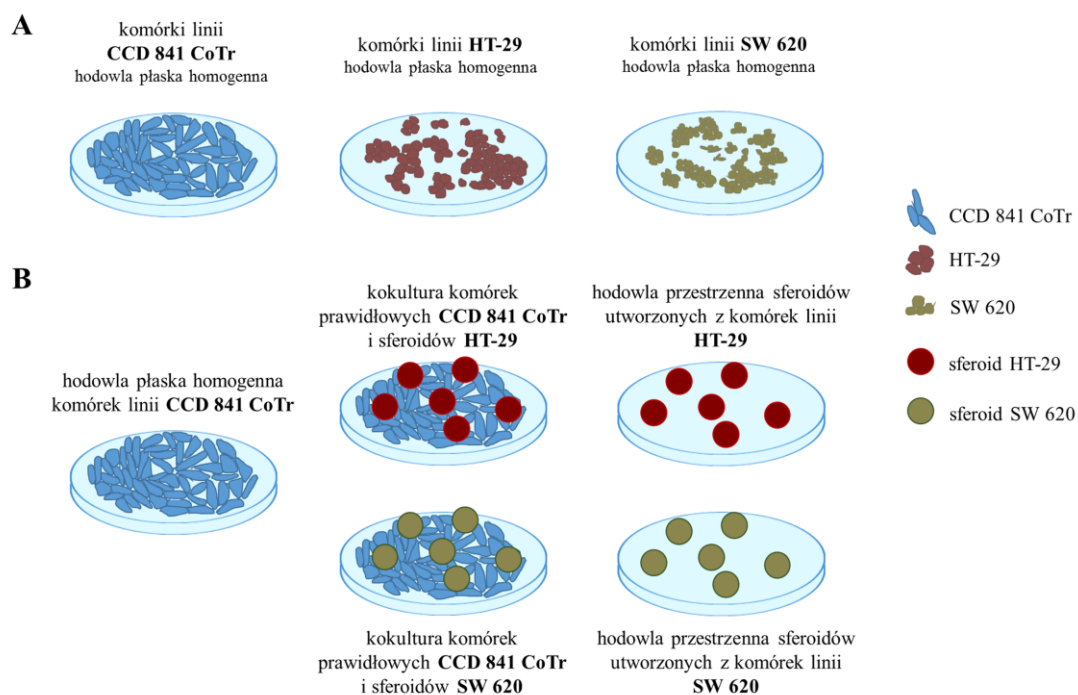
Komórki hodowano w płynie RPMI 1640 – HT-29, SW 620 – lub mieszaninie płynów RPMI 1640 i DMEM (1:1 v/v) (Gibco (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)) – CCD 841 CoTr – z dodatkiem antybiotyków (100 U/mL penicyliny, 100 µg/mL streptomycyny) (Gibco) oraz 10% lub 2% płodowej surowicy bydlęcej (FBS, ang. fetal bovine serum) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Hodowle prowadzono w inkubatorze w wilgotnej atmosferze z przepływem 5% CO₂, w temperaturze 34°C (CCD 841 CoTr) lub 37°C (HT-29, SW 620).

Komórki pasażowano poprzez przepłukanie PBS (roztwór soli fizjologicznej buforowany fosforanami, ang. phosphate buffered saline) bez jonów Ca²⁺ i Mg²⁺ (Biomed, Lublin, Polska) oraz 0,25% roztworem trypsyny z 0,02% roztworem EDTA (Sigma Aldrich), a następnie spłukanie płynem hodowlanym z dodatkiem 10% FBS. W doświadczeniach stosowano kultury o określonej gęstości komórek, która ustalana była każdorazowo poprzez policzenie komórek w komorze Thoma z zachowaniem reguły dwóch boków Bürkera i rozcieńczenie komórek płynem hodowlanym. Wszystkie procedury wymagające warunków sterylnych prowadzono pod komorą z laminarnym przepływem powietrza (Holten Safe model 1.2, Thermo Scientific).

W badaniach wykorzystano model zarówno wczesnego, jak i przerzutowego stadium nowotworu, aby ocenić wpływ UA, OA i CPT-11 na komórki, w których ekspresji podlegają szlaki zaangażowane w metastazę, jak i takie, w których zmiany

prowadzące do przerzutu jeszcze nie zaszły. Miało to na celu ocenę potencjału badanych substancji nie tylko do zahamowania samego procesu migracji i inwazji w komórkach zdolnych do utworzenia przerzutu, lecz również czynników i szlaków prowadzących do nabycia tych cech.

Doświadczenia prowadzone były na hodowlach homogenych płaskich (Ryc. 26A), jak również na kokulturach. Kokultury utworzone były z płaskiej, dwuwymiarowej (2D) kultury komórek CCD 841 CoTr tworzących monowarstwę (ang. monolayer), na które dodawano po 10 sferoidów (forma trójwymiarowa, 3D) utworzonych z komórek linii HT-29 lub SW 620 (2×10^3 komórek/sferoid). Warianty kontrolne dla doświadczeń w hodowlach heterogenych stanowiły kultura płaska (2D) komórek CCD 841 CoTr oraz sferoidy (3D) linii HT-29 i SW 620 (Ryc. 26B).



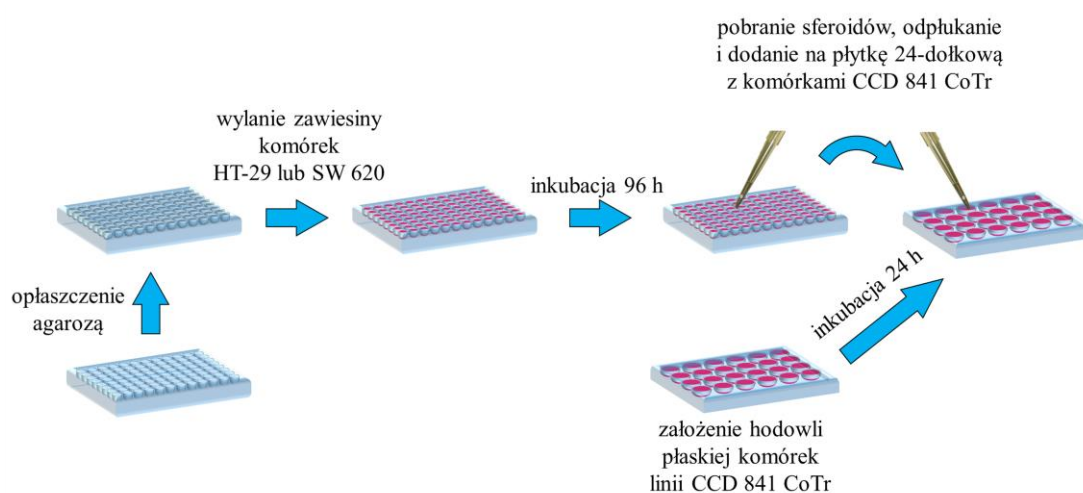
Ryc. 26. Schemat kultur wykorzystywanych w badaniach: hodowli płaskich homogenych (A) oraz kokultur (B) [opracowanie własne]

3.1.1.1. Zakładanie hodowli w kokulturach

W przypadku doświadczeń wykonywanych na kokulturach komórkowych, zakładano trzy rodzaje hodowli: hodowla płaska komórek linii CCD 841 CoTr, hodowla płaska CCD 841 CoTr z wprowadzonymi na nie sferoidami utworzonymi z komórek HT-29 lub SW 620 (po 10 sferoidów na każdy wariant badawczy)

oraz hodowla samych sferoidów utworzonych z komórek nowotworowych. Wykorzystanie hodowli w kokulturach miało na celu częściowe odtworzenie sytuacji, jaka ma miejsce w organizmie podczas przerzutu nowotworowego.

Sferoidy komórkowe otrzymywano poprzez wylanie 200 μ l zawiesiny komórek linii HT-29 lub SW 620 o gęstości 1×10^4 komórek/ml do dołków płytki 96-dołkowej, opłaszczonych wcześniej 1% roztworem agarozы (Fluka (Honeywell), Morristown, NJ, USA) w 0,85% NaCl (Avantor Performance Materials Poland). Po czterech dniach, gdy sferoidy się utworzyły, pobierano je, opłukiwano w świeżym płynie hodowlanym, a następnie umieszczano w dołkach płytki 24-dołkowej, po 10 sferoidów/dołek. Hodowle płaskie komórek linii CCD 841 CoTr zakładane były dzień wcześniej poprzez wylanie 1 ml zawiesiny o gęstości $1,75 \times 10^5$ komórek/ml (Ryc. 27).



Ryc. 27. Schemat zakładania kokultur komórkowych [opracowanie własne]

3.1.2. Badane związki

W projekcie wykorzystano dwa pentacykliczne terpenoidy, kwas ursolowy (UA, kwas 3β -hydroksyurs-12-en-28-owy) i kwas oleanolowy (OA, kwas 3β -hydroksyolean-12-en-28-owy), jak również cytostatyk – kamptotecyna-11 (CPT-11, irynotekan, pochodna kamptotecyny). Substancje podawano osobno, jak i w połączeniu, każdą w jednym określonym stężeniu wyznaczonym empirycznie. Badane związki, zakupione z komercyjnego źródła (UA, OA – Sigma Aldrich, CPT-11 – MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) rozpuszczono w DMSO (dimetylosulfotlenek) (Sigma Aldrich) i rozcieńczono 10-krotnie płynem hodowlanym

do uzyskania stock solution 10 mg/ml (10% DMSO). Podczas prowadzenia doświadczeń, substancje rozcieńczano do określonych stężeń.

W celu ustalenia stężeń substancji oraz czasu inkubacji komórek z ich dodatkiem, dokonano wstępnej analizy metodami NR i MTT, opisanymi niżej. W tym celu, komórki linii CCD 841 CoTr, HT-29 i SW 620 poddano działaniu UA i OA w zakresie stężeń 2,5-250 µg/ml oraz CPT-11 w stężeniach 0,1-10 µg/ml przez czas 24, 48 i 72 godzin. Na podstawie uzyskanych wyników, do dalszych badań wybrano czas inkubacji 24 godz. i stężenia: 5 µg/ml dla UA, 100 µg/ml dla OA i 0,075 µg/ml dla CPT-11 (tabela 3). W kolejnych badaniach, komórki inkubowano ze związkami podawanymi osobno oraz w połączeniu ze sobą. Warianty badawcze przedstawiono w tabeli 4. Stężenia zostały tak dobrane, aby nie wykazywać istotnej toksyczności względem komórek.

Tabela 3. Wybrane (wyznaczone empirycznie) stężenia badanych substancji

Substancja	Stężenie
UA	5 µg/ml (11 µM)
OA	100 µg/ml (220 µM)
CPT-11	0,075 µg/ml (0,215 µM)

Tabela 4. Warianty badawcze

Składowe wariantu	Oznaczenie wariantu
UA (5 µg/ml)	UA
OA (100 µg/ml)	OA
CPT-11 (0,075 µg/ml)	CPT-11
UA (5 µg/ml) + CPT-11 (0,075 µg/ml)	UA+CPT-11
OA (100 µg/ml) + CPT-11 (0,075 µg/ml)	OA+CPT-11
UA (5 µg/ml) + OA (100 µg/ml)	UA+OA
UA (5 µg/ml) + OA (100 µg/ml) + CPT-11 (0,075 µg/ml)	ALL

3.2. Metody

3.2.1. Barwienie May-Grünwalda-Giemsy

Barwienie stosowano w celu zwizualizowania zmian zachodzących w komórkach lub w celu uwidocznienia wyniku prowadzonej analizy. Metoda polega na wybarwieniu cytoplazmy na kolor różowo-niebieski przez barwnik May-

Grünwalda oraz jądra komórkowego na kolor fioletowy z ciemniejszymi jąderkami w wyniku związania barwnika Giemsy z DNA.

W pierwszym etapie barwienia płyn z nad komórek ściągnięto, a komórki przepłukano PBS. Następnie, dodano barwnika May-Grünwalda (0,5 ml w przypadku płytki 24-dołkowej, 1 ml w przypadku szalki Petriego lub płytki 6-dołkowej) (Sigma Aldrich) i barwiono przez 3 minuty. Po tym czasie, dodano równoważną objętość wody dejonizowanej (Zakład Wirusologii i Immunologii UMCS). Po 3 minutach ściągnięto barwnik, komórki opłukano wodą dejonizowaną i dobarwiano przez 30 minut barwnikiem Giemsy (0,5 ml lub 1 ml) (Sigma Aldrich). Po tym czasie barwnik ściągnięto, hodowle przepłukano wodą dejonizowaną i pozostawiono do wyschnięcia.

3.2.2. Barwienie fluorescencyjne cytoszkieletu

Barwienia cytoszkieletu aktynowego można dokonać stosując barwnik sprzężony z czynnikiem wiążącym się specyficznie do F-aktyny. Czynnikiem takim jest falloidyna, toksyna pochodząca z muchomora sromotnikowego (*Amanita phalloides*). Sprzężona jest ona z barwnikiem rodaminą B, dającym żółto-pomarańczową fluorescencję po naświetleniu laserem o długości fali światła 540 nm (światło zielone).

Barwienia wykonano w szklanych, 4-komorowych płytkach typu Lab-Tek™ (Nunc (Thermo Scientific)). Po inkubacji komórek z badanymi substancjami i ich utrwaleniu (5% formaldehyd (Avantor Performance Materials Poland (dawniej POCH), Gliwice, Polska) w PBS przez 5 minut) i permeabilizacji błony (0,2% Triton X-100 (Sigma Aldrich) w PBS przez 2 minuty) dodano po 200 µl barwnika do każdej komory, a następnie inkubowano przez 30 minut w ciemności w temperaturze pokojowej. Po tym czasie, preparaty przepłukano trzykrotnie PBS i wykonano zdjęcia w mikroskopie fluorescencyjnym (Zakład Anatomii i Cytologii Roślin UMCS) [Wulf i in., 1979; Chazotte, 2010].

3.2.3. Efekt cytotoksyczny

Cytotoksyczność związków badano metodami NR i MTT. W przypadku obu metod doświadczenie prowadzono na płytkach 96-dołkowych, na które wylano

po 100 μ l zawiesiny komórek o gęstości $1,75 \times 10^5$ komórek/ml (linia prawidłowa) lub 1×10^5 komórek/ml (komórki nowotworowe) w płynie hodowlanym 10% FBS. Po 24 godzinach medium usunięto, a do dołków dodano po 100 μ l wariantów badanych związków rozpuszczonych w płynie hodowlanym z 2% FBS (lub sam płyn z 2% FBS do wariantu kontrolnego). Komórki inkubowano z substancjami przez 24 godziny, po czym doświadczenie kontynuowano według procedury odpowiedniej dla metody NR lub MTT.

3.2.3.1. Metoda NR

W metodzie NR wykorzystuje się barwnik czerwień obojętną (NR, ang. neutral red), który wnika do komórek. Gdy komórki są żywe, barwnik zgromadzony zostaje w lizosomach. Podczas utrwalania barwnik zostaje wypłukany z komórek martwych, zaś w żywych uwalniany jest w środowisku kwaśnym. Uzyskane wartości absorbancji są wprost proporcjonalne do ilości żywych komórek. Metoda ta wykorzystywana jest w badaniu efektu cytotoksycznego, będącego następstwem przerwania ciągłości błony komórkowej.

Po inkubacji ze związkami, płyn hodowlany usunięto i dodano do wszystkich dołków po 100 μ l barwnika NR (0,4 mg/ml w płynie hodowlanym z 2% FBS) (Sigma Aldrich). Po 3 godzinnej inkubacji w 37 lub 34°C, NR usunięto i utrwalano komórki przez 2 minuty (po 200 μ l 0,5% formaldehydu w 1% roztworze CaCl_2 (Avantor Performance Materials Poland)). Utrwalacz usunięto i do wszystkich dołków dodano po 100 μ l rozpuszczalnika (1% kwas octowy w 50% roztworze etanolu (Avantor Performance Materials Poland)), a następnie inkubowano płytki przez 20 minut z wytrząsaniem w temperaturze pokojowej. Po tym czasie, dokonano pomiaru spektrofotometrycznego (czytnik mikropłytek model EL800, Biotek, Winooski, VT, USA z oprogramowaniem KCjunior) przy długości fali $\lambda = 540$ nm [Borenfreund, Puerner, 1985; Ates i in., 2017].

3.2.3.2. Metoda MTT

Metoda ta oparta jest na reakcji przekształcenia soli tetrazoliowej MTT (bromek 3-(4,5-dwumetylotiazylo-2-yl)-2,5-dwufenylotetrazolu) o barwie żółtej do fioletowych, brunatnych kryształów formazanu. Reakcja katalizowana jest przez

NAD(P)H i enzymy glikolityczne obecne w retikulum endoplazmatycznym. Powstałe, nierozpuszczalne w wodzie kryształy lokują się w aparacie Golgiego i kroplach lipidowych. Absorbancja jest wprost proporcjonalna do ilości żywych komórek. Metodą można badać zarówno cytotoksyczność substancji, jak i ich wpływ na proliferację komórek.

Po inkubacji z badanymi związkami, do wszystkich dołków dodano po 25 μ l MTT (Sigma Aldrich) i inkubowano 3 godziny w 34 lub 37°C. Po tym czasie, do wszystkich dołków dodano po 100 μ l SDS (siarczan dodecyłu sodu; Sigma Aldrich) w celu rozpuszczenia kryształów formazanu i inkubowano przez 24 godziny. Następnie, dokonano odczytu absorbancji przy długości fali $\lambda = 570$ nm [Mosmann, 1983; Stockert i in., 2018].

3.2.4. Właściwości antyproliferacyjne

3.2.4.1. Metoda MTT

Metodę prowadzono jak opisano powyżej, z pewnymi modyfikacjami: gęstość komórek wynosiła 1×10^4 kom./ml, a czas inkubacji z badanymi związkami – 96 godzin.

3.2.4.2. Klonalność

Metoda oparta jest na ocenie klonalności, czyli zdolności do tworzenia kolonii przez proliferujące komórki. Gęstość komórek zostaje dobrana tak, aby na całej powierzchni naczynia hodowlanego komórki były rozproszone i występowały pojedynczo. W wyniku proliferacji, z pojedynczych komórek powstają ich klony w formie kolonii, które następnie były liczone. Potencjał proliferacyjny jest wprost proporcjonalny do liczby utworzonych kolonii.

Doświadczenie prowadzono na plastikowych szalkach Petriego o średnicy 30 mm. Wylano po 1 ml komórek o gęstości 1×10^5 komórek/ml i pozostawiano na dobę. Po tym czasie usunięto płyn hodowlany, a do wszystkich szalek dodano roztwory badanych substancji lub samego płynu hodowlanego z 2% FBS (kontrola) i inkubowano przez 24 godziny. Następnie, odklejono komórki roztworem trypsyny z EDTA, ponownie policzono i wylano do nowych szalek po 1 ml zawiesiny o gęstości 5×10^3 komórek/ml w płynie z 10% FBS. Po upływie 24 godzin, płyn wymieniono

na medium z dodatkiem 2% FBS. Komórki hodowano przez następne 21 dni, co 3 dni zmieniając płyn na świeży, po czym hodowle wybarwiono metodą May-Grünwalda-Giemsy i policzono kolonie [Franken i in., 2006; Li i in., 2015].

3.2.4.3. Czas podwojenia generacji (DT)

Czas podwojenia generacji (DT, ang. doubling time) to czas potrzebny, aby liczba komórek w hodowli uległa podwojeniu. Im współczynnik DT jest niższy, tym szybciej zachodzą podziały komórkowe, a więc tym wyższy potencjał proliferacyjny komórek.

Na płytkach 24-dołkowych założono hodowle o gęstości 1×10^5 komórek/ml w dwóch powtórzeniach. Po 24 godzinach, do jednego powtórzenia dodano po 1 ml medium z 2% FBS i z dodatkiem badanych substancji lub bez nich (kontrola). Komórki z drugiego powtórzenia strypsynizowano i policzono, a ich ilość w każdym wariancie przyjęto jako wartość wyjściową (N_0). Hodowle inkubowano z substancjami przez 24 godziny oraz 72 godziny, po czym strypsynizowano je i policzono. Współczynnik DT obliczono według wzoru [Korzyńska, Zychowicz, 2008]:

$$DT = \frac{(t-t_0) \times \log_2}{\log N - \log N_0},$$

gdzie: DT – czas potrzebny na podwojenie populacji; t_0 – czas początkowy (0 godzin); t – ilość godzin prowadzenia hodowli; N_0 – ilość komórek w czasie t_0 ; N – ilość komórek po czasie t .

Uzyskane wyniki przedstawiono w postaci obliczonego DT oraz w przeliczeniu na kontrolę. W przypadku, gdy efekt cytotoksyczny przewyższał efekt zahamowania proliferacji, wyniki przybierały wartość ujemną; oznaczone zostały jako TOX.

3.2.5. Aktywność immunomodulacyjna

3.2.5.1. Ocena ilości wytworzonego tlenu azotu – metoda Griess’a

Tlenek azotu (NO) wytwarzany przez komórki produkowany jest między innymi przez syntazę tlenu azotu, głównie NOS2. Im wyższe stadium nowotworu, tym wyższa aktywność iNOS. Ponadto, aktywność tego enzymu jest ściśle powiązana z COX-2, i wzrasta też podczas stanu zapalnego.

Pomiaru NO można dokonać przy użyciu metody Griess'a, która polega na określeniu stężenia tlenku azotu na podstawie pomiaru jego stabilnych form: NO₃ i NO₂. Metoda oparta jest na dwuetapowej reakcji, w wyniku której powstaje czerwono-fioletowy produkt azowy. Jego ilość jest wprost proporcjonalna do ilości NO.

Na płytki 24-dołkowe wylano po 1 ml zawiesiny komórek o gęstości $1,75 \times 10^5$ komórek/ml (linia prawidłowa) lub 1×10^5 komórek/ml (komórki nowotworowe). Następnego dnia, do wszystkich dołków dodano płyn hodowlany z 2% FBS i z dodatkiem lub bez badanych związków. Po kolejnych 24 godzinach, płyny zebrano i zamrożono w temperaturze -80°C. W kolejnym etapie sporządzono odczynnik Griess'a (1% sulfanilamid (Sigma Aldrich) oraz 0,1% dihydrochlorek N-(1-naftyl) etylenodiaminy (Sigma Aldrich) w 4% kwasie ortofosforowym (Avantor Performance Materials Poland)) oraz rozcieńczenia azotynu sodu (NaNO₂) (Avantor Performance Materials Poland) jako standard w stężeniach: 0; 0,5; 1 i 2 µM. Zamrożone wcześniej płyny pohodowlane rozmrożono, odwirowano, a z supernatantów pobrano po 100 µl i dodano do dołków płytki 96-dołkowej. Wylano także po 100 µl/dołek przygotowanych stężeń standardów. Następnie, do wszystkich dołków dodano po 100 µl odczynnika Griess'a i inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie, dokonano pomiaru spektrofotometrycznego przy długości fali $\lambda = 570$ nm [Tarpey i in., 2004; Kumar, Kashyap, 2015].

3.2.5.2. Ocena ilości produkowanych cytokin – metoda ELISA

Jednymi z głównych czynników biorących udział w indukcji i utrzymaniu stanu zapalnego są cytokiny. Dokonano więc analizy cytokin prozapalnych, IL-1 β i IL-6 oraz cytokiny przeciwzapalnej, IL-10. W tym celu wykonano analizę w teście ELISA (test immunoenzymatyczny, ang. enzyme-linked immunosorbent assay) według instrukcji producenta (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Ocenie poddano próbki zebrane z hodowli inkubowanych przez 24 godziny z badanymi substancjami.

Badanie przeprowadzono zarówno na hodowlach płaskich, jak i w kokulturach. Doświadczenie prowadzono w płytkach 24-dołkowych. Do każdego dołka wylano po 1 ml zawiesiny komórek o gęstości $1,75 \times 10^5$ (CCD 841 CoTr) lub 1×10^5 komórek/ml (HT-29, SW 620) w przypadku hodowli płaskich lub według opisanej wcześniej procedury w przypadku kokultur. Po upływie 24 godzin dodano po 1 ml

roztworów badanych substancji. Po 24 godzinnej inkubacji zebrano płyny znad hodowli i zamrożono w temperaturze -80°C . Po rozmrożeniu, próbki worteksowano i odwirowano, a następnie wykonano test ELISA.

3.2.6. Właściwości hamowania migracji komórek

3.2.6.1. Metoda rysy (wound assay)

Zasadą metody jest wykonanie w monowarstwie komórkowej rysy (ang. wound, scratch), a następnie pomiar ilości komórek lub odległości przemieszczenia czoła komórek do wnętrza utworzonej rysy. Wartości te są proporcjonalne do potencjału migracji komórek.

Doświadczenie prowadzono w szalkach Petriego o średnicy 30 mm, na których założono hodowle badanych komórek. Po uzyskaniu przez nie 100% konfluencji wykonano rysę. Szalki przepłukano PBS i dodano płyn z 2% FBS i z lub bez badanych substancji. Sporządzono także kontrolę negatywną, tzw. kontrolę rysy, a hodowlę wybarwiono metodą May-Grünwalda-Giemsy zaraz po wykonaniu rysy. W pozostałych przypadkach, kultury wybarwiono po 24 godzinach inkubacji z badanymi substancjami (lub samym płynem hodowlanym z 2% FBS). Po wyschnięciu preparatów wykonano zdjęcia (mikroskop Olympus BX51 z oprogramowaniem CellSens) i zmierzono odległości między czołami komórek po obu stronach rysy. Wyniki przedstawiono w przeliczeniu na kontrolę, jako wartości procentowe (% kontroli) [Hulkower, Herber, 2011; Jonkman i in., 2014].

3.2.6.2. Metoda migracji przez pory membran (chamber migration assay)

W metodzie tej wykorzystuje się inserty posiadające perforowaną błonę z porami o określonej średnicy. W zależności od średnicy porów, komórki migrują przez nie lub wypuszczają protruzje. Ilość komórek (lub wypustek) zliczonych po spodniej stronie insertu (membrany) jest wprost proporcjonalna do potencjału migracyjnego komórek.

W badaniach wykorzystano inserty z porami o średnicy 8 μm (komórki przechodzą w całości) oraz 0,4 μm (przez pory przechodzą tylko wypustki komórek). Inserty (Nunc (Thermo Scientific)) umieszczono w płytce 24-dołkowej, a następnie dodano do nich zawiesinę komórek o gęstości $1,75 \times 10^5$ (CCD 841 CoTr) lub 1×10^5

(HT-29, SW 620) komórek/ml w 300 μ l płynu bez dodatku surowicy. Następnie, do dołka płytki, obok insertu, wiano 750 μ l płynu z dodatkiem 10% FBS, który działać miał jako chemoatraktant dla komórek. Po 12 godzinach inserty przeniesiono do nowej płytki 24-dołkowej, natomiast w płynie pochodzącym z pierwotnych płytek policzono komórki. Do insertów umieszczonych w nowych płytkach wiano po 300 μ l płynu z dodatkiem lub bez badanych substancji i inkubowano 12 (8 μ m) lub 24 (0,4 μ m) godziny. Po tym czasie, ponownie pobrano płyn spod insertów i policzono w nim komórki, z kolei inserty wybarwiono metodą May-Grünwalda-Giemsy. Górną stronę perforowanej błony insertów wytarto, aby usunąć z niej komórki, a następnie inserty oglądano pod mikroskopem. Policzano ilość komórek (lub wypustek) znajdujących się na spodniej warstwie błony we wszystkich wariantach badawczych, a wyniki przeliczono w porównaniu do kontroli i przedstawiono w postaci wartości procentowych (% kontroli) [Hulkower, Herber, 2011].

3.2.7. Hamowanie aktywności białek zaangażowane w migrację, inwazję i oporność lekową

W badaniach poddano analizie białka zaangażowane w migrację i inwazję komórek (MMP-2 i -9, uPA i uPAR, COX-2, RhoA, RhoC, RhoB) oraz oporność wielolekową (MRPs). W tym celu wykonano metody ELISA, immunofluorescencję oraz Western Blotting.

3.2.7.1. ELISA

Metodą ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) dokonano oceny ilości zewnątrzkomórkowych MMP-2 i -9 oraz uPA i uPAR. Próbkę, pochodzącą z płynów z nad hodowli kokultur, przygotowano oraz zbadano według wcześniej opisanej procedury.

3.2.7.2. Zymografia żelatynowa

Zymografia wykorzystywana jest do oceny aktywności enzymatycznej proteaz. Metoda polega na elektroforetycznym rozdziale białek w żelu poliarylamidowym z dodatkiem substratu odpowiedniego dla badanych enzymów.

W pierwszym etapie dokonuje się rozdziału elektroforetycznego białek z warunkach denaturujących z SDS, podczas którego dochodzi do rozfałdowania struktury pro-MMP, co prowadzi do przełączenia cysteinowego. Po elektroforezie SDS zostaje wypłukany z żelu przez Triton X-100, co skutkuje sfałdowaniem białka, jednak już w postaci formy aktywnej. Żele inkubuje się w odpowiednich warunkach w celu strawienia substratu, przy czym kluczową rolę odgrywają jony Ca^{2+} . Odmianą metody jest zymografia żelatynowa, dzięki której określić można aktywność żelatynaz, czyli MMP-2 i -9. W tym przypadku do żelu poliakrylamidowego dodaje się żelatynę. Wielkość stref przejaśnienia lub stopień wytrawienia są wprost proporcjonalne do aktywności enzymatycznej metaloproteinaz.

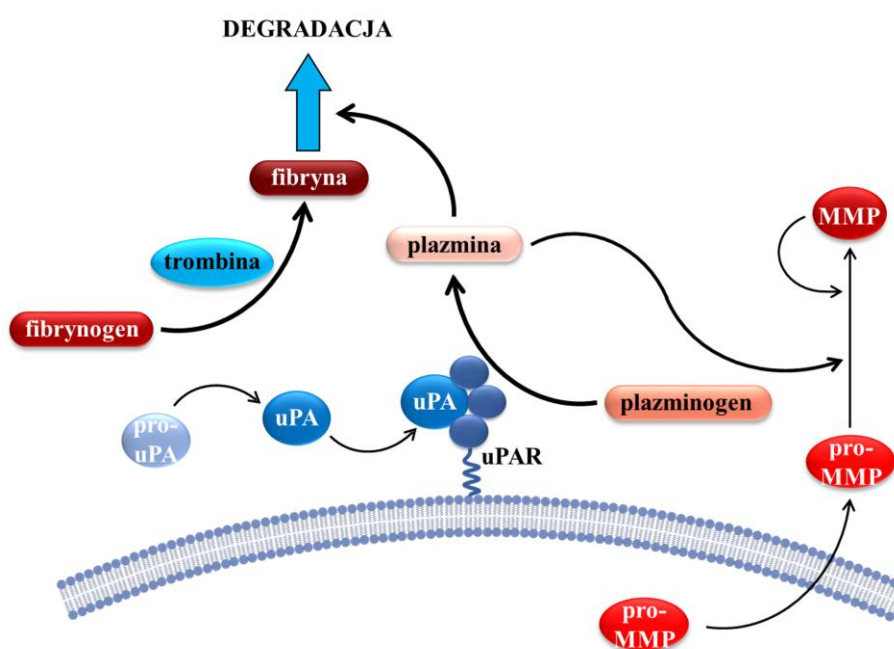
W badaniach wykonano analizę aktywności zewnątrzkomórkowych MMP-2 i MMP-9, produkowanych w hodowlach kokultur.

Próbki do analizy zymograficznej przygotowano tak, jak do metody ELISA – zebrano płyny z nad hodowli komórek inkubowanych z badanymi substancjami. Następnie, próbki (15 μl każdej próbki/slot) z dodatkiem buforu próbkowego (Thermo Scientific) naniesiono na 9% żel poliakrylamidowy z SDS i z dodatkiem 0,1% żelatyny (Sigma Aldrich). Po rozdziale elektroforetycznym (120V) żele przepłukano w buforze I (2,5% Triton X-100 w 50 mM Tris-HCl pH 7,4) trzy razy po 15 minut, następnie w buforze II (50 mM Tris-HCl pH 7,4 (Avantor Performance Materials Poland)) trzy razy po 15 minut, po czym umieszczono je w buforze III (inkubacyjnym) (5 mM CaCl_2 w 50 mM Tris-HCl pH 7,4) i inkubowano przez noc w temperaturze 37°C , co jakiś czas mieszając. Po inkubacji żele barwiono błękitem Coomassie (ICN Biomedicals, Irvine, CA, USA) przez 20 minut, a następnie odbarwiano mieszaniną 10% metanolu i 10% kwasu octowego (Avantor Performance Materials Poland) w H_2O . Po odbarwieniu wykonano zdjęcia przy użyciu Chemi-Doc XRS+ (BioRad, Hercules, CA, USA) i dokonano analizy półilościowej z wykorzystaniem programu Image Studio Lite ver. 4.0 (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) [Hu, Beeton, 2010; Kupai i in., 2010; Ren i in., 2017].

3.2.7.3. Aktywność fibrynolityczna

W celu potwierdzenia wpływu badanych związków na aktywność układu uPA/uPAR dokonano analizy aktywności fibrynolitycznej. Degradacja fibryny, powstałej z fibrynogenu pod wpływem aktywności trombiny, prowadzona jest przez

plazminę. Ta z kolei powstaje w wyniku proteolizy plazminogenu, co katalizowane jest przez uPAR związany ze swoim ligandem, uPA. Analizę wykonuje się poprzez naniesienie badanych próbek na żel, w którym rozpuszczono fibrynogen i trombinę, a następnie wybarwienie i odbarwienie żelu. W miejscu naniesienia próbek powstają strefy przejaśnienia, których wielkość jest wprost proporcjonalna do aktywności plazminy, co jest wprost proporcjonalne do aktywności uPA i uPAR [Chapin, Hajjar, 2015; Shenkman i in., 2012].



Ryc. 28. Mechanizm odpowiedzialny za aktywność fibrynolityczną [opracowanie własne]

Sporządzono 10,5% żel poliakrylamidowy bez dodatku SDS z dodatkiem 0,4% ludzkiego fibrynogenu (Sigma Aldrich) i 20 U/ml ludzkiej trombiny (Sigma Aldrich). Następnie, żel umieszczono w wilgotnych komorach i naniesiono na niego po 10 µl próbek (przygotowanych tak samo, jak do metody ELISA). Po 5 godzinnej inkubacji w 37°C żełe barwiono błękitem Coomassie przez 10 minut, a następnie odbarwiono mieszaniną 10% metanolu i 10% kwasu octowego w H₂O. Analizy stref wytrawienia dokonano przy użyciu programu ImageJ (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA).

3.2.7.4. Immunofluorescencja

W metodzie immunofluorescencji wykorzystuje się przeciwciała pierwszorzędowe skierowane przeciwko badanemu antygenowi oraz sprzężone z fluorochromem przeciwciała drugorzędowe o specyficzności względem przeciwciał pierwszorzędowych. Dzięki temu można określić lokalizację czy poziom badanych czynników. Metodę tę zastosowano w celu określenia wpływu badanych związków na lokalizację i poziom białek MMP-2 i -9, uPAR, COX-2, RhoA, C i B oraz MRP w hodowlach płaskich, homogennych linii CCD 841 CoTr, HT-29 oraz SW 620.

Doświadczenie prowadzono w 4-komorowych szklanych płytkach typu Lab-Tek™, do których dodano po 500 µl zawiesiny o gęstości 1×10^5 komórek/ml. Następnego dnia, do wszystkich komór dodano po 500 µl badanych substancji rozpuszczonych w płynie hodowlanym z 2% FBS (lub samego płynu) i inkubowano przez 24 godziny. Po tym czasie, komórki przepłukano dwukrotnie PBS, a następnie utrwalano 500 µl 5% roztworu formaldehydu w PBS przez 5 minut. Następnie, przepłukano komory dwukrotnie PBS i dokonano permeabilizacji błony komórkowej 500 µl 0,1% roztworu Triton X-100 w PBS (2 minuty). Ponownie przepłukano PBS utrwalone i permeabilizowane hodowle, a następnie dodano po 500 µl 7,5% roztworu FBS w PBS w celu zablokowania niespecyficznych miejsc wiązania przeciwciał. Po godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej, do wszystkich komór dodano po 200 µl zawiesiny przeciwciał pierwszorzędowych rozcieńczonych 250-krotnie w PBS i inkubowano przez noc w temperaturze 4°C. Po tym czasie, komory przepłukano trzykrotnie PBS, a następnie dodano (w ciemności) po 200 µl zawiesiny przeciwciał drugorzędowych związanych z FITC, rozcieńczonych 250-krotnie w PBS i inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie komory przepłukano trzykrotnie PBS i sporządzono zdjęcia pod mikroskopem fluorescencyjnym (linia lasera – 488 nm (światło niebieskie)) (Zakład Anatomii i Cytologii Roślin UMCS).

W przypadku białek RhoA, RhoC i RhoB wykonano dodatkowe barwienie – fluorescencyjne cytoszkieletu aktynowego. W tym celu po inkubacji z przeciwciałami drugorzędowymi, komory przepłukano trzykrotnie PBS, a następnie dodano po 200 µl barwnika falloidyna-rodamina B i inkubowano przez 30 minut w ciemności w temperaturze pokojowej. Następnie, komory przepłukano trzykrotnie PBS i obserwowano pod mikroskopem fluorescencyjnym.

Zdjęcia przeanalizowano pod kątem lokalizacji badanych białek, i dokonano analizy intensywności fluorescencji w celu półilościowego określenia poziomu białek (program Image Studio Lite ver 4.0). W tym celu, z każdego zdjęcia przeanalizowano 6 miejsc (2 wykazujące najsilniejszą fluorescencję, 2 wykazujące najslabszą fluorescencję i 2 wykazujące średnią fluorescencję), z których obliczono średnią. Dla każdego wariantu podawanych substancji dokonano analizy z 5 zdjęć (w sumie 30 wybranych miejsc), z których obliczoną średnią przeliczono względem kontroli [Donaldson, 2015].

3.2.7.5. Western Blotting (WB, immunoblotting)

Immunoblotting wykorzystywany jest do półilościowego określenia poziomu białek. Wykorzystane jest w tym celu wiązanie się do nich specyficznych przeciwciał. Białka poddaje się elektroforetycznemu rozdzielaniu, a następnie transferowi na membranę. Do immobilizowanych na membranie białek wiążą się przeciwciała pierwszorzędowe, a do nich przeciwciała drugorzędowe sprzężone z odpowiednim enzymem – peroksydazą chrzanową (HRP, ang. horseradish peroxidase) lub fosfatazą alkaliczną (AP, ang. alkaline phosphatase) – który katalizuje przekształcenie bezbarwnego substratu w barwny produkt. Analiza chemiluminescencyjna (HRP) lub kolorymetryczna (AP) pozwala na określenie ilości powstałego produktu, która jest wprost proporcjonalna do ilości związanych przeciwciał, co z kolei jest wprost proporcjonalne do ilości badanego białka.

Hodowle komórkowe, założone na płytkach 6-dołkowych, inkubowane przez 24 godziny z badanymi substancjami (lub bez nich) poddano lizie, której wszystkie etapy prowadzono w lodzie. W tym celu, na każdy wariant badawczy dodano po 100 µl zimnego buforu do lizy (z dodatkiem PIC) (Thermo Scientific) i inkubowano przez godzinę. Następnie, zdrapano komórki i przeniesiono zawiesinę do mikroprobówek. Lizaty odwirowano (14000 rpm, 15 minut, 4°C) w celu sedimentacji DNA i frakcji lipidowych, a supernatant przeniesiono do nowych probówek. Inkubowano je następnie przez 5 minut w temperaturze 95°C, po czym ponownie umieszczono w lodzie. Część każdego lizatu przeznaczono do oznaczenia ilości białka, a pozostałą część po dodaniu do niej buforu próbkowego z β-merkaptotanołem (Sigma Aldrich) porcjowano i zamrożono w -80°C.

Białko oznaczono metodą BCA z wykorzystaniem komercyjnego zestawu BCA, według instrukcji producenta (Thermo Scientific).

W kolejnym etapie, dokonano rozdzielania elektroforetycznego rozmrożonych wcześniej lizatów (początkowo 90V, potem zwiększone do 120V) w żelu poliakrylamidowym (żel 9% dla większych białek (MRP, E-kadheryna) lub 10,5% dla mniejszych białek (MMP-2, MMP-9, COX-2, RhoA, RhoC, RhoB, β -aktyna)). Na żele nakładano próbki zawierające po 50 μ g białka. Po rozdzielaniu żele odpłukano w buforze do transferu. W tym czasie, przygotowano membrany (PVDF o wielkości porów 0,45 μ m) poprzez płukanie ich przez 1 minutę kolejno w metanolu i buforze do transferu (50 mM Tris i 40 mM glicyna (Chempur; Piekary Śląskie, Polska) w 20% metanolu). Dokonano transferu pół-suchego (15V, 30 minut) w środowisku buforu do transferu, po czym membrany płukano trzykrotnie w buforze TBST (10 mM Tris-HCl pH 7.4 w 0,9% NaCl z dodatkiem 0,05% Triton-X100) po 15 minut. Następnie, membrany płukano w 10% roztworze mleka odtłuszczonego w TBST przez 30 minut w celu zablokowania niespecyficznego miejsca wiązania przeciwciał. Po tym czasie, membrany przeniesiono do roztworu zawierającego przeciwciała pierwszorzędowe (500-krotne rozcieńczenie w TBST) i inkubowano przez noc w temperaturze 4°C. W kolejnym etapie, membrany płukano 3-krotnie po 15 minut w TBST. Następnie, przeniesiono je do roztworu zawierającego przeciwciała drugorzędowe sprzężone z AP, rozcieńczone 2000x w TBST i inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po inkubacji, membrany płukano dwukrotnie po 15 minut w TBST i jeden raz przez 15 minut w buforze AP (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM Mg^{2+}). Następnie, umieszczono je w buforze do wywoływania (NBT i BCIP (Sigma Aldrich) w buforze AP) na kołysce laboratoryjnej. Po pojawieniu się prążków, wykonano zdjęcia w Chemi-Doc XRS+. Następnie, wykonano analizę pół-ilościową poziomu badanych białek z użyciem programu ImageJ [Kurien, Scofield, 2006; Mahmood, Yang, 2012].

3.2.8. Ocena efektu synergistycznego

Jako, że w badaniach podawano substancje w połączeniu, zbadano efekt synergistyczny. Synergizm występuje wtedy, gdy efekt działania substancji podanych razem przewyższa sumę efektów substancji podanych pojedynczo. Wyróżniono także

antagonizm, gdy efekty działania związków znosiły się oraz addytywność, gdy silniejszy efekt wynikał z sumy efektów pojedynczych substancji.

W celu obliczenia interakcji działania związków posłużono się wzorem:

$$CI = \frac{x+y+z}{a},$$

gdzie: x – efekt działania substancji pierwszej, y – efekt działania substancji drugiej, z – efekt działania substancji trzeciej, a – efekt działania substancji podanych w połączeniu.

Obliczona wartość (CI, combination index) świadczyła o tym, jakie działanie względem siebie wykazują substancje: przy $CI < 0,7$ był to synergizm, $CI = 0,71-1,3$ – addytywność, $CI > 1,3$ – antagonizm.

3.2.9. Analiza statystyczna

Wyniki, zebrane z co najmniej 3 powtórzeń, przedstawiono w postaci wykresów ze średnią $\pm$ odchylenie standardowe. Określono także istotność statystyczną między próbami testem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Dunnett’a przy użyciu programu GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Istotności statystyczne zostały oznaczone w odniesieniu do kontroli i opisane „*” dla $p < 0,05$, „**” dla $p < 0,01$ oraz „***” dla $p < 0,005$.

4. Wyniki

Wyniki uzyskanych analiz przedstawiono w postaci wykresów lub tabel, jako średnia $\pm$ odchylenie standardowe. Istotności statystyczne, obliczone testem ANOVA z testem post-hoc Dunnett'a oznaczono jako „*” (* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,005$) w odniesieniu do kontroli. Sekcja wyników podzielona została na (i) screening, wykonany w celu selekcji stężeń badanych związków i czasu inkubacji z nimi, (ii) podstawowe właściwości przeciwnowotworowe (efekt cytotoksyczny, zahamowanie proliferacji, właściwości immunomodulacyjne i przeciwzapalne), (iii) zahamowanie migracji komórek oraz (iv) wpływ badanych związków na poziom i aktywność białek zaangażowanych w migrację, inwazję i oporność wielolekową. Najważniejsze uzyskane wyniki zostały podsumowane na końcu rozdziału.

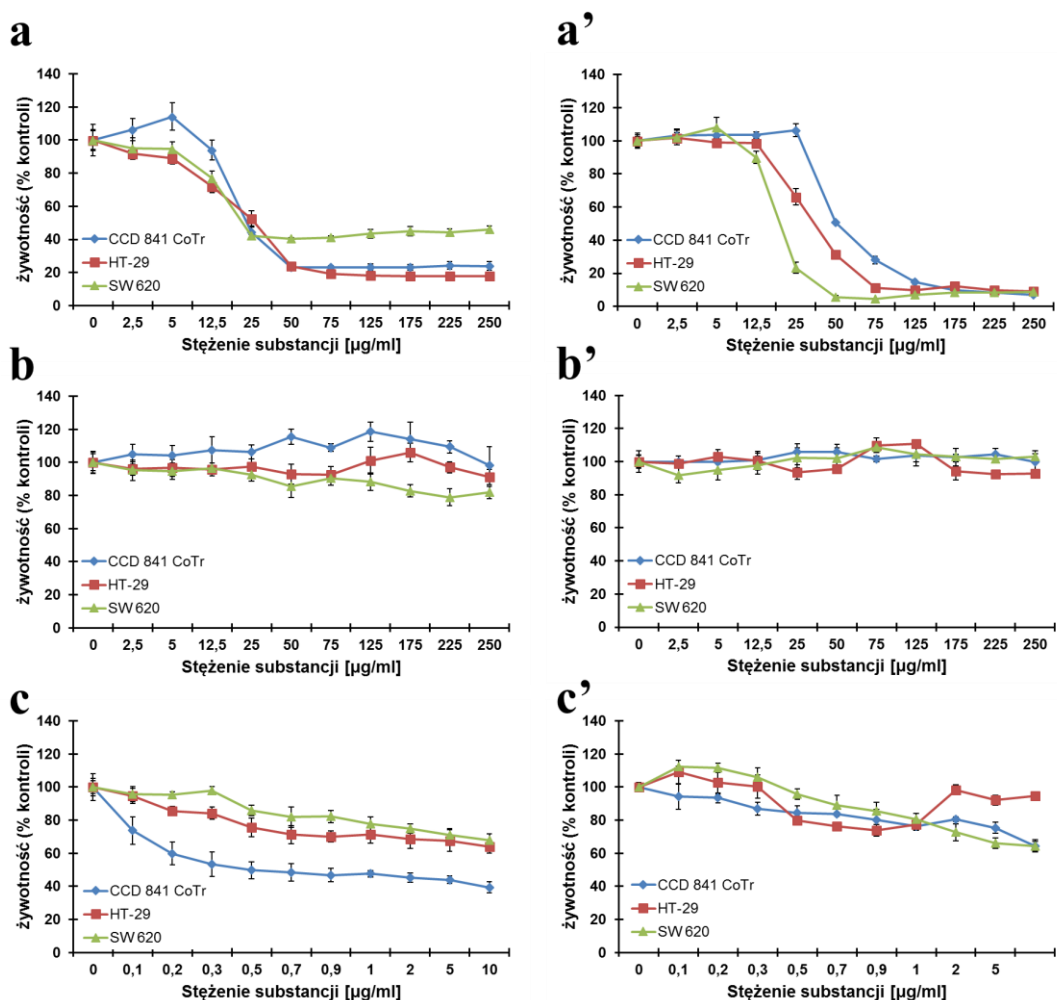
4.1. Screening

Dokonano oceny wpływu kwas ursolowego (UA), kwasu oleanolowego (OA) i kamptotecyny-11 (CPT-11) na żywotność komórek linii CCD 841 CoTr, HT-29 oraz SW 620. Na podstawie uzyskanych wyników wybrano określone stężenia każdej z badanych substancji.

Kwas ursolowy, wraz ze wzrostem stężenia, spowodował spadek żywotności komórek prawidłowych i nowotworowych w przypadku wszystkich czasów inkubacji (24, 48 i 72 godz.). W metodzie NR, przy stężeniach UA powyżej 5 $\mu\text{g/ml}$ dochodziło do znacznego spadku żywotności komórek wszystkich linii, natomiast efekt cytotoksyczny przy tym stężeniu nie przekraczał 11% dla komórek linii CCD 841 CoTr i SW 620 i 15% względem komórek HT-29. W przypadku 24 godzinnej inkubacji uzyskano spadek żywotności komórek nowotworowych (do $89 \pm 3,6\%$ (HT-29) i $94,7 \pm 4,4\%$ (SW 620) względem kontroli)(**Wyk. 1a**) przy jednoczesnym wzroście proliferacji komórek prawidłowych (do $114,2 \pm 8,3\%$ w odniesieniu do kontroli)(**Wyk. 1a**). Wyniki uzyskane po oznaczeniu metodą MTT były podobne, punkt istotnego spadku żywotności był jednak przesunięty do wyższych stężeń UA (powyżej 25 $\mu\text{g/ml}$ dla CCD 841 CoTr i 12,5 $\mu\text{g/ml}$ dla HT-29 i SW 620)(**Wyk. 1a'**). Z tego względu stężenie 5 $\mu\text{g/ml}$ kwasu ursolowego zostało wybrane do dalszych badań.

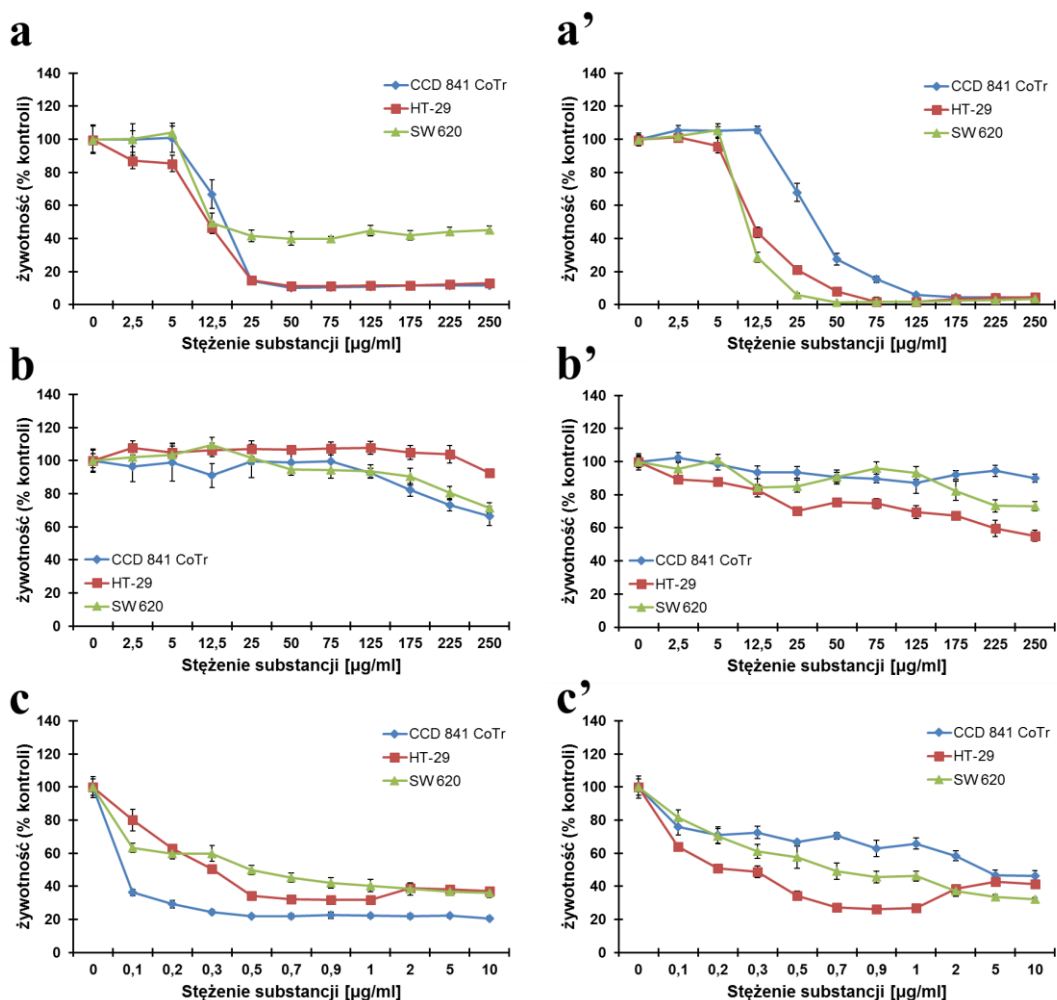
Kwas oleanolowy wykazał o wiele słabszy efekt cytotoksyczny, niż UA. Istotny spadek żywotności następował dopiero przy najwyższych badanych stężeniach przy czasach inkubacji powyżej 24 godzin. Znaczący spadek żywotności nastąpił po inkubacji komórek ze stężeniami OA przekraczającymi 75 $\mu\text{g/ml}$, przy czym efekt cytotoksyczny względem komórek nowotworowych był silniejszy, niż względem prawidłowych w metodzie NR (po 24 godz. inkubacji z OA o stężeniu 75 $\mu\text{g/ml}$ żywotność komórek linii CCD 841 CoTr wynosiła $109,0 \pm 2,2\%$ względem kontroli (**Wyk. 1b**), natomiast komórek nowotworowych: odpowiednio $92,7 \pm 4,8\%$ oraz $90,5 \pm 4,4\%$ dla HT-29 i SW 620 (**Wyk. 2b, 3b**)) lub na podobnym poziomie w metodzie MTT (odpowiednio $101,7 \pm 1,6\%$, $109,9 \pm 4,3\%$ oraz $108,7 \pm 1,7\%$ dla komórek CCD 841 CoTr, HT-29 i SW 620 (**Wyk. 1b'**)).

Do dalszych badań wybrano stężenie 100 $\mu\text{g/ml}$.

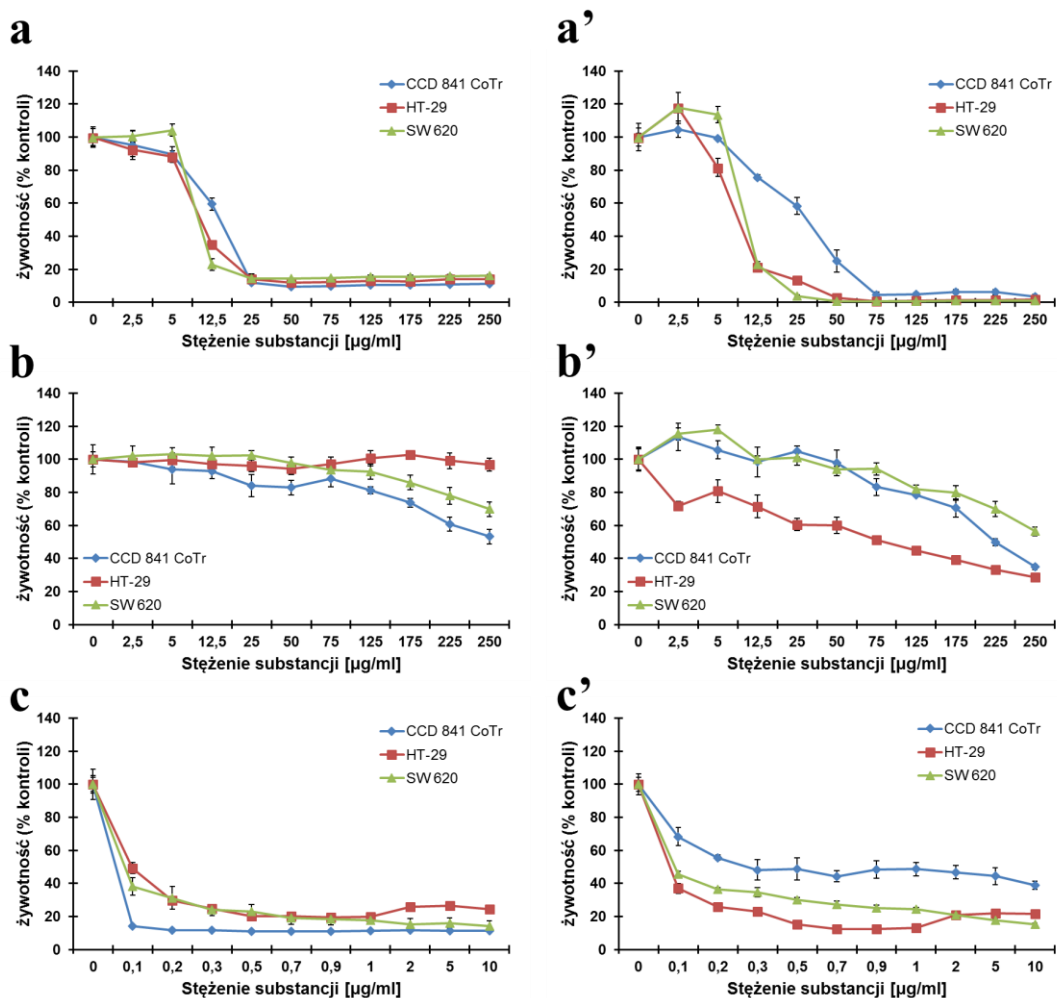


Wyk. 1. Efekt cytotoksyczny UA (a, a'), OA (b, b') i CPT-11 (c, c') po 24 h inkubacji względem komórek linii CCD 841 CoTr, HT-29 i SW 620 mierzony metodami NR (a, b, c) i MTT (a', b', c'); * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,005$, jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnett'a

Kamptotecyna-11, wraz ze wzrostem stężenia i czasu inkubacji, spowodowała istotny spadek żywotności komórek wszystkich badanych linii. Ponadto, w większości przypadków (wyjątkiem są wyniki uzyskane z metody MTT przy czasach inkubacji 48 i 72 godz.) CPT-11 okazała się bardziej cytotoksyczna względem komórek prawidłowych, niż nowotworowych (**Wyk. 1-3**). Znaczący spadek żywotności, zanotowany przy inkubacjach dłuższych niż 24 godziny następował już przy stężeniu związku wynoszącym 0,1 $\mu\text{g/ml}$. W przypadku inkubacji 24-godzinnej, żywotność komórek linii CCD 841 CoTr przy tym stężeniu obniżyła się do $73,7 \pm 8,2\%$ względem kontroli. Z kolei, efekt cytotoksyczny względem komórek nowotworowych był nieznaczny (żywotność na poziomie $94,6 \pm 4,6\%$ i $95,9 \pm 4,6\%$ w odniesieniu do kontroli, odpowiednio komórek linii HT-29 i SW 620) (**Wyk. 1**). W kolejnych badaniach zastosowano stężenie CPT-11 wynoszące 0,075 $\mu\text{g/ml}$.



Wyk. 2. Efekt cytotoksyczny UA (a, a'), OA (b, b') i CPT-11 (c, c') po 48 h inkubacji względem komórek linii CCD 841 CoTr, HT-29 i SW 620 mierzony metodami NR (a, b, c) i MTT (a', b', c'); * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,005$, jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnett'a



Wyk. 3. Efekt cytotoksyczny UA (a, a'), OA (b, b') i CPT-11 (c, c') po 72 h inkubacji względem komórek linii CCD 841 CoTr, HT-29 i SW 620 mierzony metodami NR (a, b, c) i MTT (a', b', c'); * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,005$, jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnett'a

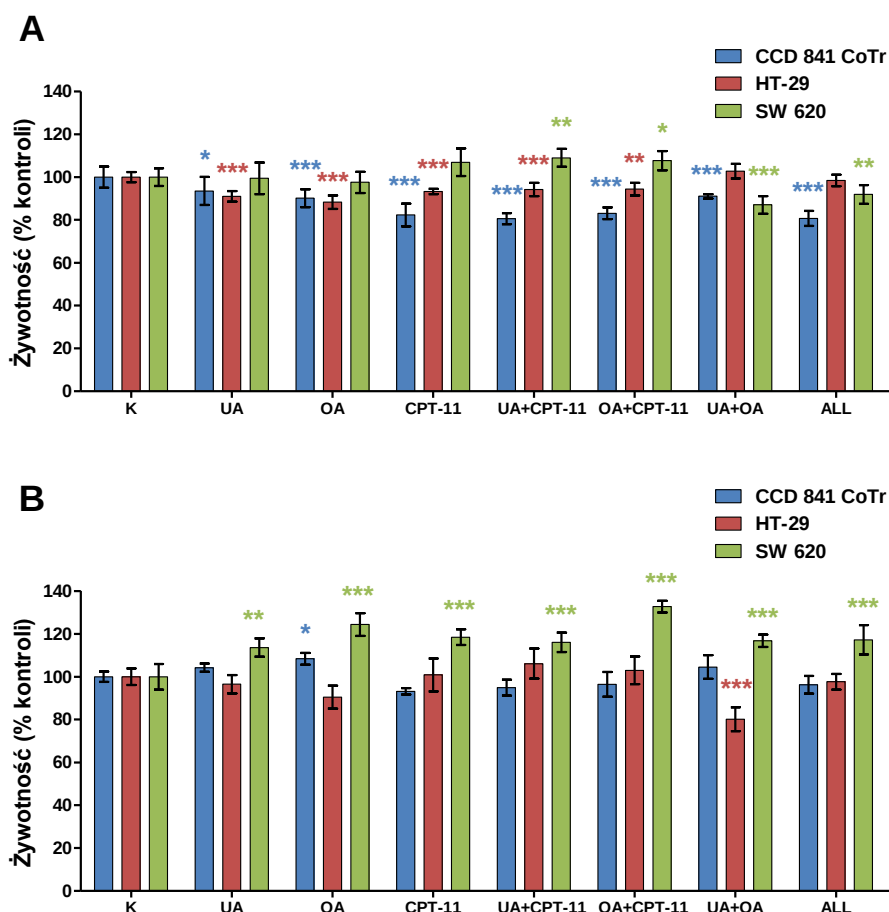
Interesującym wynikiem był wzrost żywności komórek linii HT-29 przy stężeniach CPT-11 powyżej 1 μg/ml w obu metodach badawczych (przy czasach inkubacji powyżej 24 godz. w przypadku NR i we wszystkich badanych czasach w MTT)(Wyk. 1-3). Potencjalną przyczyną takiej obserwacji może być aktywacja przez komórki nowotworowe mechanizmów oporności lekowej.

4.2. Podstawowe właściwości przeciwnowotworowe

W dalszych badaniach wykonano analizę ogólnych właściwości przeciwnowotworowych związków, takich jak: efekt cytotoksyczny, efekt zahamowania proliferacji, właściwości immunomodulacyjne, oddziaływanie

na czynniki zaangażowane w stan zapalny, jak również zahamowanie migracji komórek. Substancje podawane były osobno, jak i w połączeniu, wyznaczono zatem także charakter ich interakcji.

4.2.1. Efekt cytotoksyczny



Wyk. 4. Efekt cytotoksyczny badanych związków względem linii CCD 841 CoTr, HT-29 oraz SW 620 oznaczony metodami NR (A) oraz MTT (B); * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,005$, jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnett'a

W badaniu metodą NR, wszystkie warianty łączonych i pojedynczo stosowanych substancji (Tabela 4 Materiały i Metody) spowodowały nieznaczny, lecz istotny statystycznie spadek żywotności komórek linii CCD 841 CoTr. Najsilniejsze działanie cytotoksyczne wykazały wszystkie warianty z CPT-11, przy czym efekt był najwyższy w przypadku UA+CPT-11 oraz ALL (spadek żywotności do, kolejno, $80,6 \pm 2,6\%$ oraz $80,7 \pm 3,5\%$ w odniesieniu do kontroli)(Wyk. 4A). Efekt cytotoksyczny względem komórek nowotworowych był

niższy, niż w przypadku prawidłowych. Najwyższy spadek żywotności komórek HT-29 zanotowano po inkubacji z OA (do $88,3 \pm 3,1\%$), natomiast w przypadku SW 620 – po działaniu UA+OA ($87,0 \pm 4,2\%$ kontroli) oraz ALL ($91,9 \pm 4,4\%$ kontroli)(**Wyk. 4A**). Badane warianty łączonych substancji wykazały interakcje synergistyczne ich składników (**Tabela 5**). Podobne wyniki względem komórek prawidłowych uzyskano po oznaczeniu żywotności metodą MTT – warianty CPT-11, UA+CPT-11, OA+CPT-11 oraz ALL wykazały nieznaczny efekt cytotoksyczny względem komórek linii CCD 841 CoTr (spadek żywotności do, kolejno: $93,2 \pm 1,5\%$, $93,3 \pm 3,6\%$, $96,5 \pm 5,8\%$, $96,2 \pm 4,1\%$ w porównaniu do kontroli). Warianty UA, OA oraz UA+OA spowodowały nieznaczny (poniżej 10%) wzrost proliferacji komórek prawidłowych (**Wyk. 4B**). Ponadto, wariant OA+CPT-11 wykazał synergistyczny efekt. Kwas oleanolowy poprzez synergizm zmniejszał cytotoksyczne działania kamptotecyny-11 na komórki prawidłowe (**Tabela 5**).

W przypadku komórek HT-29 wyniki były odwrotne, niż uzyskane dla CCD 841 CoTr. Warianty z CPT-11 nie wywoływały efektu cytotoksycznego, natomiast warianty UA, OA i UA+OA spowodowały spadek żywotności komórek. Najwyższy spadek żywotności uzyskano dla UA+OA (do $80,2 \pm 5,6\%$ względem kontroli)(**Wyk. 4B**), co było także efektem interakcji synergistycznej (**Tabela 5**). Żaden z badanych wariantów nie wywarł efektu cytotoksycznego na komórki SW 620 (**Wyk. 4B**).

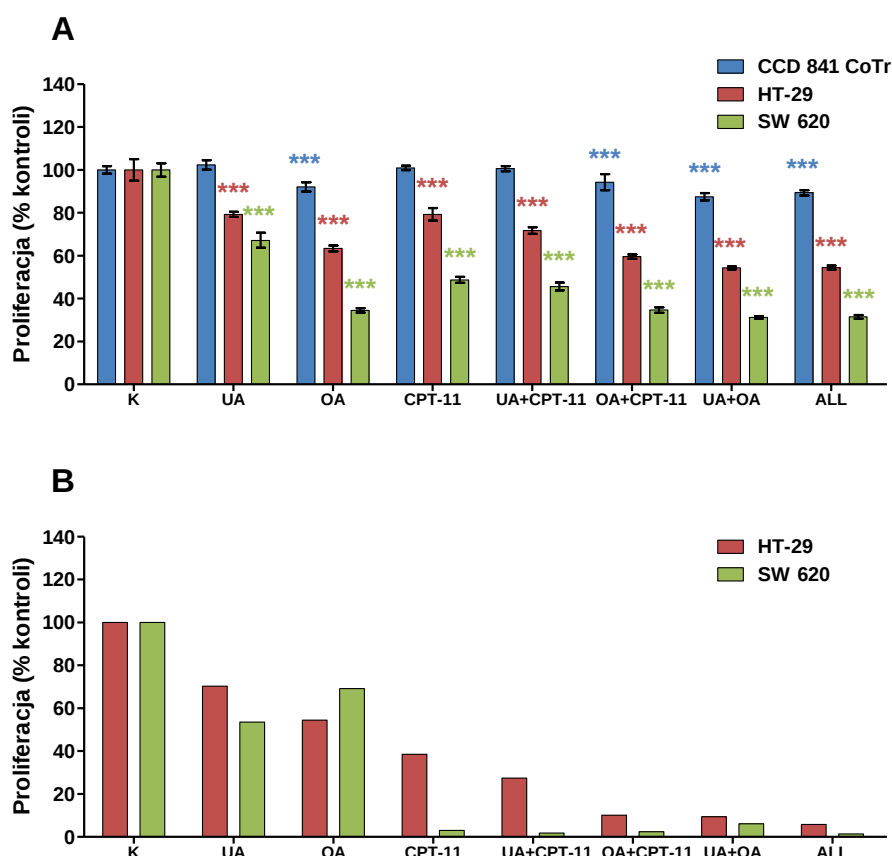
Tabela 5. Określenie zależności między badanymi substancjami podawanymi w połączeniu – ocena efektu cytotoksyczności; (+) – synergizm; (0) – addytywność; (-) – antagonizm

Wariant	Efekt					
	Metoda NR			Metoda MTT		
	CCD 841 CoTr	HT-29	SW 620	CCD 841 CoTr	HT-29	SW 620
UA+CPT-11	0	-	0	+	+	-
OA+CPT-11	-	-	+	+	-	-
UA+OA	-	-	+	-	+	-
ALL	-	-	+	-	-	-

4.2.2. Zahamowanie proliferacji

W metodzie MTT, zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych wywoływały wszystkie badane warianty substancji. Jednocześnie, efekt działania w stosunku do komórek prawidłowych był znikomy. Najsilniejsze działanie

antyproliferacyjne względem komórek HT-29 wykazały warianty OA+CPT-11, UA+OA oraz ALL (spadek proliferacji do, kolejno: $59,5 \pm 1,0\%$, $54,3 \pm 0,7\%$, $54,4 \pm 0,9\%$ w stosunku do kontroli)(**Wyk. 5A**). Te same warianty spowodowały największy spadek proliferacji komórek linii SW 620 (do, odpowiednio, $34,6 \pm 1,3\%$, $31,2 \pm 0,5\%$, $31,4 \pm 0,9\%$ w odniesieniu do kontroli). Ponadto, istotny efekt wykazał także wariant OA (stopień proliferacji na poziomie $34,5 \pm 1,0\%$ kontroli)(**Wyk. 5A**).



Wyk. 5. Zahamowanie proliferacji komórek linii CCD 841 CoTr, HT-29 oraz SW 620 przez badane związki oznaczone metodą MTT (A) oraz metodą opartą na zdolności do klonalności (tworzenia kolonii) (B); * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, * - $p < 0,005$, jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnett'a**

Podobne wyniki uzyskano z oznaczenia klonalności. Istotne działanie antyproliferacyjne względem komórek nowotworowych wykazały warianty połączonych substancji, przy czym najsilniejszy efekt uzyskano po inkubacji z wariantem ALL (zahamowanie proliferacji w $94,2\%$ (HT-29) i $98,7\%$ (SW 620) względem kontroli)(**Wyk. 5B**). Wszystkie badane warianty spowodowały silniejszy efekt antyproliferacyjny względem komórek nowotworowych niż CPT-11 podane osobno (z wyjątkiem UA+OA względem SW 620).

Analizę czasu podwojenia generacji przeprowadzono po 24 i 72 godzinach inkubacji z badanymi związkami. Wyniki uzyskane po 24-godzinnej inkubacji okazały się bardziej miarodajne i tylko ten wariant doświadczenia został zaprezentowany.

Tabela 6. Wpływ badanych substancji na czas podwojenia generacji (DT) komórek linii CCD 841 CoTr, HT-29 oraz SW 620 po 24-godzinnej inkubacji; TOX – warianty badawcze, w których toksyczność substancji przeważała nad efektem antyproliferacyjnym (liczba komórek po inkubacji z substancjami była niższa, niż w czasie t_0)

	CCD 841 CoTr	HT-29	SW 620
Kontrola	42h (100,00%)	18,5h (100,00%)	25h (100,00%)
UA	69h (162,92%)	17,5h (93,69%)	39,5h (157,48%)
OA	37,5h (88,60%)	18h (98,07%)	26,5h (105,76%)
CPT-11	-61,5h [TOX] (-145,72%)	44,5h (240,98%)	218h (865,24%)
UA+CPT-11	-56,5h [TOX] (-134,21%)	67h (363,96%)	-259h [TOX] (-1027,43%)
OA+CPT-11	-71,5h [TOX] (-169,15%)	57,5h (311,97%)	104h (412,06%)
UA+OA	1069,5h (2536,25%)	27,5h (149,54%)	-83,5h [TOX] (-330,83%)
ALL	-27,5h [TOX] (-65,18%)	206h (1121,56%)	-39h [TOX] (153,76%)

Czas podwojenia generacji komórek prawidłowych uległ zwiększeniu po inkubacji z wariantami UA oraz UA+OA, zmniejszeniu zaś w wyniku działania OA. Wszystkie warianty z CPT-11 wykazały działanie cytotoksyczne przewyższające efekt antyproliferacyjny (liczba komórek po inkubacji była mniejsza, niż w czasie t_0)(**Tabela 6**). Wszystkie badane związki podawane w połączeniu oraz CPT-11 podawana pojedynczo spowodowały wydłużenie DT komórek linii HT-29. Najsilniejszy efekt wywołały kwasy ursolowy i/lub oleanolowy w połączeniu z CPT-11 (UA+CPT-11, OA+CPT-11, ALL; wydłużenie DT z 18,5 godz. do, kolejno: 67 godz., 57,5 godz. oraz 206 godz. (**Tabela 6**), a efekt ten był wynikiem interakcji

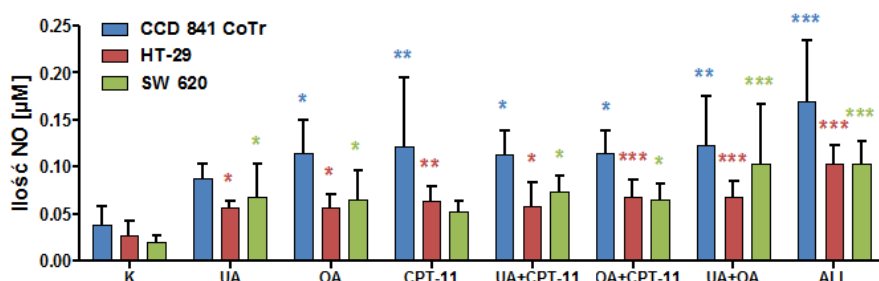
synergistycznej (**Tabela 7**). W przypadku komórek linii SW 620, wszystkie warianty spowodowały wydłużenie czasu podwojenia generacji. Najsilniejszy efekt uzyskano po inkubacji z CPT-11 i OA+CPT-11 (wydłużenie DT z 25 godz. w kontroli do, odpowiednio, 218 godz. i 104 godz.). Warianty UA+CPT-11, UA+OA oraz ALL wykazały przewagę cytotoksyczności nad zahamowaniem proliferacji (**Tabela 6**).

Tabela 7. Określenie zależności między badanymi substancjami podawanymi w połączeniu – ocena efektu zahamowania proliferacji; (+) – synergizm; (0) – addytywność; (-) – antagonizm; brak – ocena efektu była niemożliwa

Metoda	Wariant	Efekt		
		CCD 841 CoTr	HT-29	SW 620
MTT	UA+CPT-11	-	-	-
	OA+CPT-11	0	-	-
	UA+OA	+	0	-
	ALL	+	-	-
Ocena klonalności	UA+CPT-11	brak	0	-
	OA+CPT-11	brak	0	-
	UA+OA	brak	0	0
	ALL	brak	-	-
Czas podwojenia generacji	UA+CPT-11	+	+	+
	OA+CPT-11	0	+	-
	UA+OA	+	+	+
	ALL	0	+	+

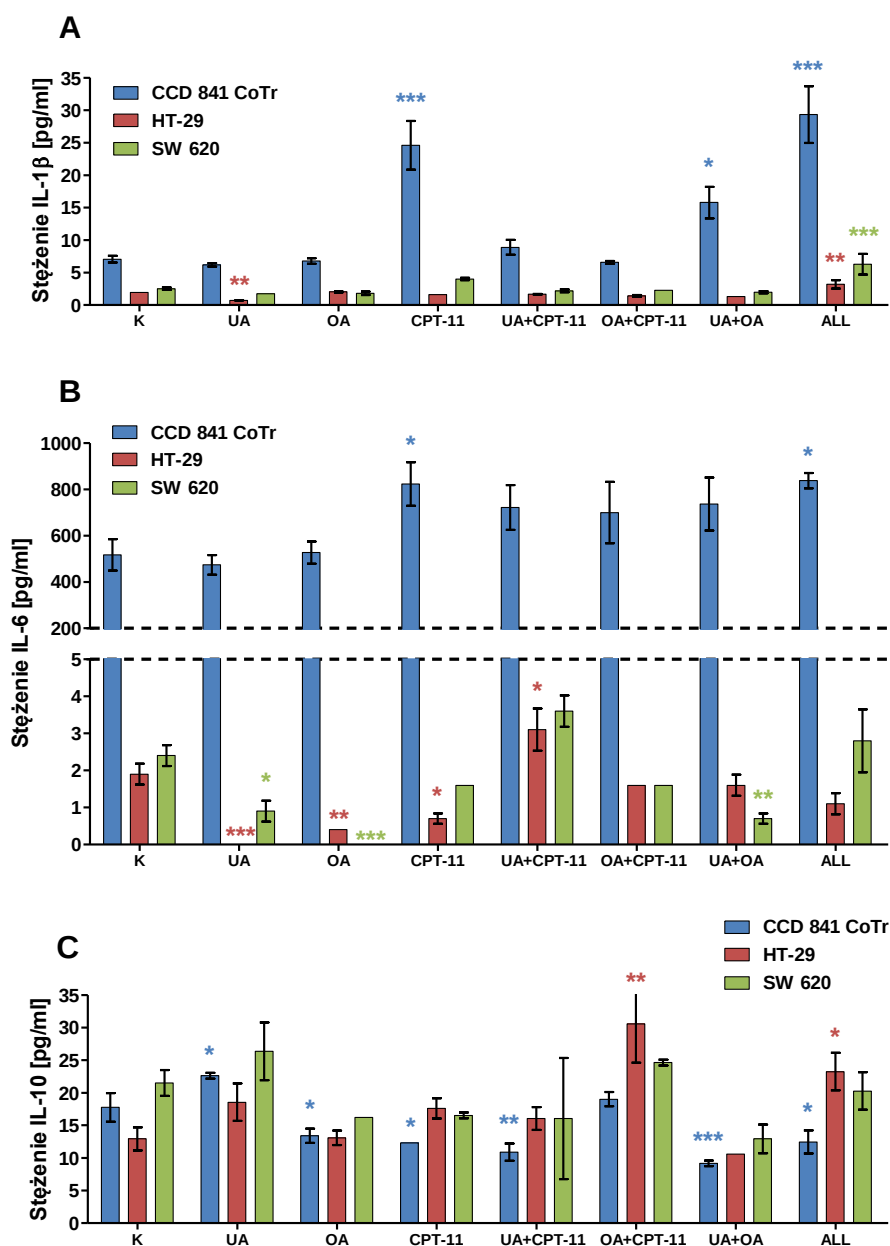
4.2.3. Immunomodulacja i właściwości przeciwzapalne

Analizę właściwości immunomodulacyjnych badanych związków i ich oddziaływania na czynniki związane ze stanem zapalnym wykonano oznaczając metodą Griess’a ilość wydzielanego przez komórki tlenku azotu (NO) oraz metodą ELISA poziomu cytokin (prozapalnych IL-1 β i IL-6 i przeciwzapalnej IL-10).



Wyk. 6. Stężenie tlenku azotu (NO) wydzielanego przez komórki linii CCD 841 CoTr, HT-29 i SW 620 poddanych działaniu badanych substancji oznaczona metodą Griess’a; * - p < 0,05, ** - p < 0,01, * - p < 0,005, jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnett’a**

Analiza wykazała wzrost stężenia NO wydzielanego przez komórki prawidłowe i nowotworowe po inkubacji ze wszystkimi wariantami substancji. Najsilniejszy efekt wykazał wariant ALL w stosunku do komórek CCD 841 CoTr (wzrost do $0,170 \pm 0,064 \mu\text{M}$ NO w porównaniu do kontroli ($0,038 \pm 0,019 \mu\text{M}$)) i HT-29 (wzrost z $0,027 \pm 0,015 \mu\text{M}$ w kontroli do $0,103 \pm 0,021 \mu\text{M}$). Ponadto, istotne działanie wykazały warianty UA+OA oraz ALL w przypadku komórek linii SW 620 (wzrost do, kolejno, $0,103 \pm 0,063 \mu\text{M}$ oraz $0,103 \pm 0,024 \mu\text{M}$ w porównaniu do $0,020 \pm 0,007 \mu\text{M}$ w kontroli)(Wyk. 6).



Wyk. 7. Poziom cytokin: IL-1 β (A), IL-6 (B) i IL-10 (C) wydzielanych przez hodowle płaskie komórek linii CCD 841 CoTr, HT-29 oraz SW 620 poddane działaniu badanych związków oznaczony metodą ELISA; * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,005$, jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnett'a

W badanych homogennych hodowlach płaskich, kwasy ursolowy i oleanolowy podawane osobno nie wykazały istotnych zmian w stężeniu wydzielanych cytokin prozapalnych (IL-1 β i IL-6). Z kolei, podanie ich w połączeniu spowodowało wzrost stężenia tych interleukin w środowisku komórek prawidłowych. UA+OA wywołał prawie dwukrotny wzrost IL-1 β (z $7,05 \pm 0,51$ w kontroli do $15,78 \pm 2,44$ pg/ml) i prawie 1,5-krotny wzrost IL-6 (z $517,50 \pm 67,88$ do $736,50 \pm 114,55$ pg/ml)(**Wyk. 7A-B**). Najsilniejszy efekt prozapalny względem komórek prawidłowych wywołały jednak warianty CPT-11 i ALL: odpowiednio 3,5-krotny (z $7,05 \pm 0,51$ do $24,60 \pm 3,76$ pg/ml) i ponad 4-krotny (z $7,05 \pm 0,51$ do $29,35 \pm 4,36$ pg/ml) wzrost IL-1 β oraz ponad 1,5 krotny wzrost IL-6 (z $517,50 \pm 67,88$ do $823,50 \pm 94,19$ pg/ml (CPT-11) i $837,90 \pm 33,09$ pg/ml (ALL))(**Wyk. 7A-B**). Świadczy to o silnym charakterze prozapalnym cytostatyku. O ile połączenie obu kwasów i kamptotecyny-11 (ALL) spowodowało wzrost stężenia cytokin prozapalnych w odniesieniu do samego cytostatyku, to podanie pojedynczych kwasów w połączeniu z CPT-11 wywołało efekt odwrotny: zmniejszenie ilości wydzielanych IL-1 β (około 3-4 krotnie, z $24,60 \pm 3,76$ (CPT-11) do $8,89 \pm 1,15$ (UA+CPT-11) i $6,57 \pm 0,21$ pg/ml (OA+CPT-11; efekt synergistyczny) i IL-6 (z $823,50 \pm 94,19$ do $722,10 \pm 96,73$ (UA+CPT-11) i $699,90 \pm 132,37$ pg/ml (OA+CPT-11))(**Wyk. 7A-B; Tabela 8**).

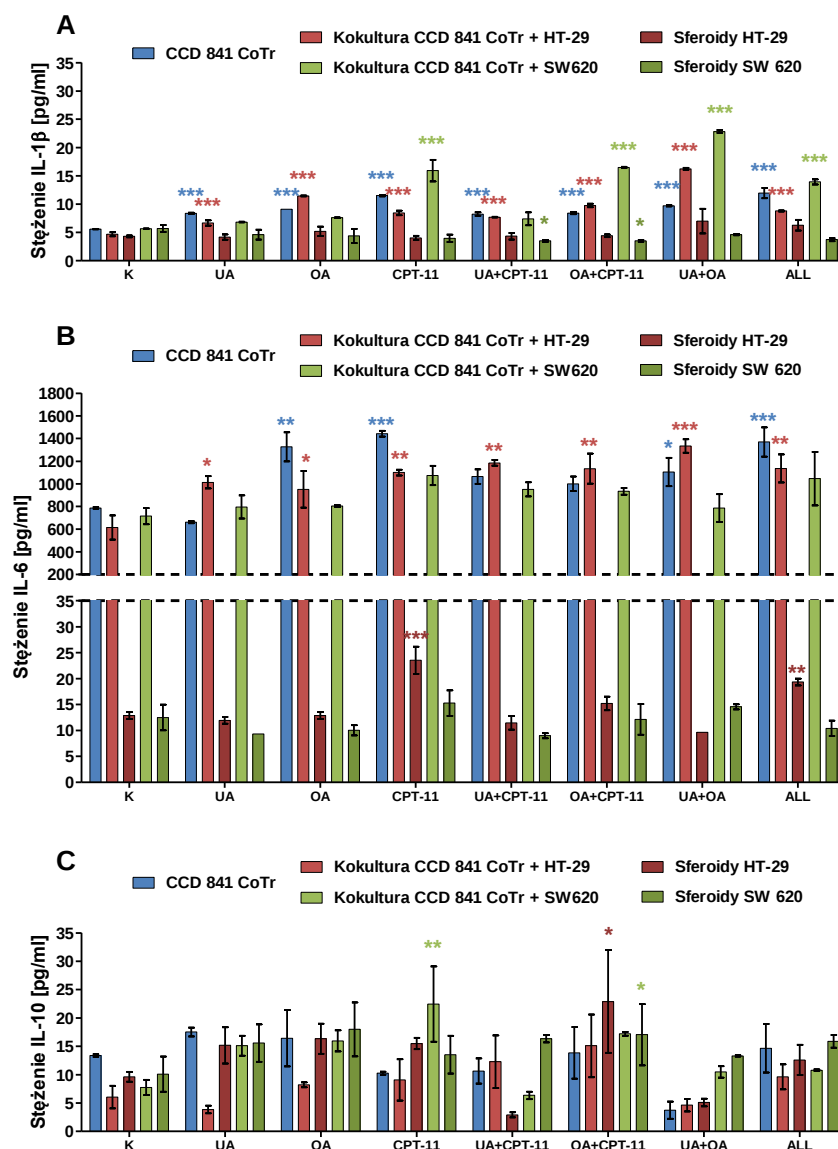
W przypadku IL-10, tylko UA i OA+CPT-11 spowodowały wzrost stężenia tej interleukiny (z $17,77 \pm 2,21$ w kontroli do, odpowiednio, $22,61 \pm 0,44$ i $19,02 \pm 1,10$ pg/ml)(**Wyk. 7C**).

Badane substancje zadziałały odmiennie na komórki nowotworowe, niż na prawidłowe. Względem komórek linii HT-29, wszystkie warianty z wyjątkiem OA i ALL spowodowały spadek stężenia IL-1 β oraz wszystkie z wyjątkiem UA+CPT-11 spadek stężenia IL-6. W obu przypadkach, najsilniejszy efekt wywarł UA, powodując spadek ilości IL-1 β z $1,95 \pm 0,00$ w kontroli do $0,72 \pm 0,02$ i IL-6 z $1,90 \pm 0,28$ do $0,00 \pm 0,00$ (**Wyk. 7A-B**). Ponadto, wszystkie warianty z wyjątkiem UA+OA spowodowały wzrost IL-10. Najsilniejszy efekt odnotowano w przypadku OA+CPT-11. Był to prawie 2,5-krotny wzrost stężenia (z $12,92 \pm 1,77$ w kontroli do $30,58 \pm 5,97$ pg/ml)(**Wyk. 7C**). W przypadku komórek SW 620, warianty UA, OA, UA+CPT-11, OA+CPT-11 oraz UA+OA obniżyły stężenie IL-1 β (najsilniejszy efekt spowodowały kwasy podawane pojedynczo: z $2,52 \pm 0,17$ do $1,73 \pm 0,00$ (UA) i $1,82 \pm 0,26$ (OA) oraz ich połączenie (UA+OA): do $1,98 \pm 0,17$ pg/ml). Efekt prozapalny w ujęciu IL-1 β wywarły warianty CPT-11 i ALL (wzrost do, odpowiednio, $4,00 \pm 0,17$

i $6,30 \pm 1,58$ pg/ml). Podanie CPT-11 w połączeniu z UA lub z OA spowodowało spadek stężenia cytokiny zarówno względem samego cytostatyku, jak i kontroli (do $2,19 \pm 0,21$ (UA+CPT-11) i $2,28 \pm 0,00$ pg/ml (OA+CPT-11))(Wyk. 7A). W obu przypadkach odnotowano efekt synergistyczny (Tabela 8). Efekt względem IL-6 wydzielanej przez komórki SW 620 był podobny. Najsilniej hamująco na uwalnianie tej cytokiny działał UA (z $2,40 \pm 0,28$ do $0,90 \pm 0,28$ pg/ml), OA (do $0,00 \pm 0,00$ pg/ml) oraz UA+OA (do $0,70 \pm 0,14$ pg/ml). Wzrost stężenia IL-6 zaobserwowano pod wpływem UA+CPT-11 (do $3,60 \pm 0,42$ pg/ml) i ALL (do $2,80 \pm 0,85$ pg/ml)(Wyk. 7B). Nieznaczny wzrost IL-10 wywołały UA oraz OA+CPT-11 (do, kolejno, $26,36 \pm 4,42$ i $24,64 \pm 0,44$ względem $21,52 \pm 1,99$ pg/ml w kontroli)(Wyk. 7C).

W homogennych hodowlach płaskich najsilniejszy efekt przeciwzapalny, wyrażony spadkiem stężenia wydzielanych IL-1 β i IL-6 oraz zwiększeniem stężenia IL-10, wywarły warianty UA, OA oraz OA+CPT-11. Świadczy to o właściwościach przeciwzapalnych kwasów ursolowego i oleanolowego, jak również o działaniu ochronnym względem komórek prawidłowych.

W hodowlach kokultur, praktycznie we wszystkich przypadkach badane substancje indukowały wzrost stężenia cytokin prozapalnych. Tylko w przypadku sferoidów komórek SW 620 doszło do istotnego zmniejszenia stężenia IL-1 β (wszystkie warianty) i IL-6 (UA, OA, UA+CPT-11, ALL)(Wyk. 8A-B). Z drugiej strony, w większości przypadków obserwowano wzrost stężenia IL-10 pod wpływem badanych związków. Najsilniejsze działanie w tym zakresie wykazały warianty UA+CPT-11 i OA+CPT-11 względem kokultury komórek prawidłowych i sferoidów HT-29. W tym przypadku obserwowano odpowiednio 2-krotny (z $6,05 \pm 1,99$ do $12,30 \pm 4,64$ pg/ml) i 2,5-krotny wzrost stężenia IL-10 (do $15,11 \pm 5,52$ pg/ml; efekt synergistyczny)(Tabela 8). Z kolei, aktywność CPT-11 i OA+CPT-11 względem kokultury komórek prawidłowych i sferoidów SW 620 wyrażała się odpowiednio, prawie 3-krotnym (do $22,45 \pm 6,63$ względem $7,77 \pm 1,33$ pg/ml w kontroli) i ponad 2-krotnym wzrostem stężenia (do $17,22 \pm 0,33$ pg/ml). Ponadto, wszystkie warianty wywołały wzrost ilości IL-10 wydzielanej przez sferoidy SW 620 oraz wszystkie z wyjątkiem UA+CPT-11 i UA+OA w przypadku sferoidów HT-29 (Wyk. 8C).



Wyk. 8. Poziom cytokin: IL-1 β (A), IL-6 (B) i IL-10 (C) wydzielanych przez hodowle płaskie komórek linii CCD 841 CoTr, kokultury komórek prawidłowych i sferoidów utworzonych z komórek linii HT-29 lub SW 620 oraz same sferoidy komórek nowotworowych, poddanych działaniu badanych związków oznaczony metodą ELISA; * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, * - $p < 0,005$, jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnett'a**

W heterogennych hodowlach przestrzennych aktywność przeciwzapalna badanych substancji zachodziła raczej na drodze zwiększenia stężenia cytokiny przeciwzapalnej, IL-10, niż zmniejszenia ilości cytokin prozapalnych, IL-1 β i IL-6.

Wariantem o największym potencjale przeciwzapalnym, zarówno w przypadku homogennej hodowli płaskiej, jak i kokultury okazało się połączenie kwasu oleanolowego i kamptotecyny-11 (OA+CPT-11). Wariant ten nie tylko

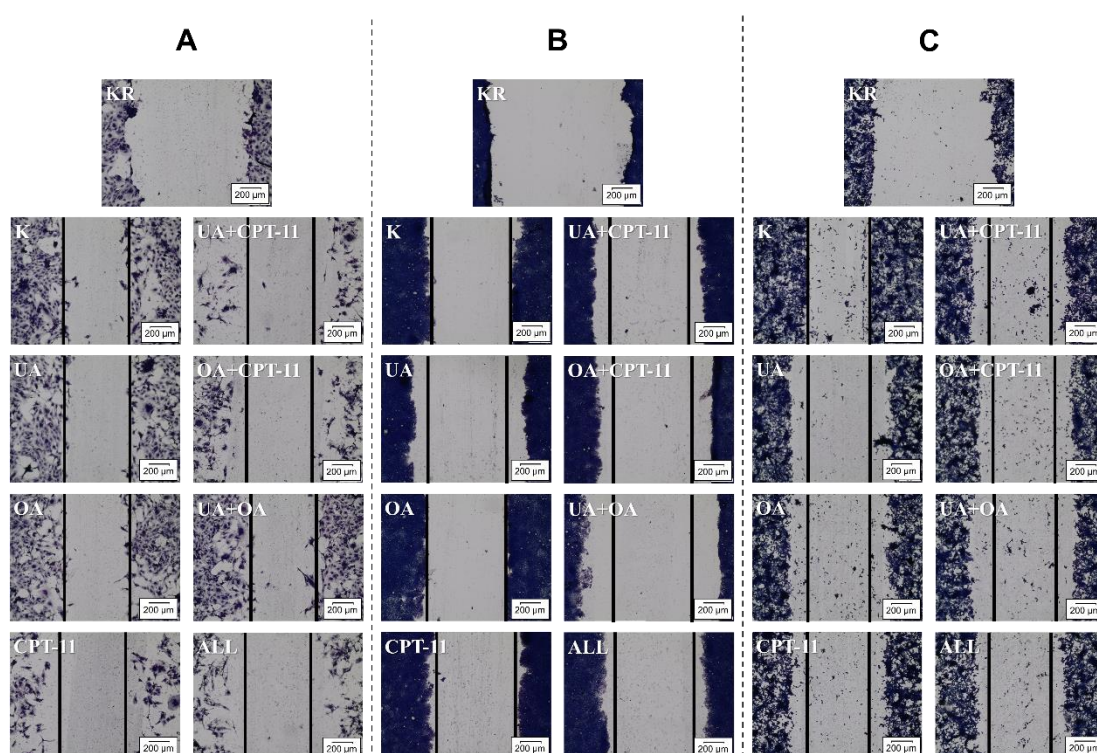
najsilniej obniżał ilość cytokin prozapalnych i zwiększał przeciwzapalnych, ale też chronił komórki prawidłowe linii CCD 841 CoTr przed aktywnością cytostatyku.

Tabela 8. Określenie zależności między badanymi substancjami podawanymi w połączeniu – ocena właściwości immunomodulacyjnych i przeciwzapalnych; (+) – synergizm; (0) – addytywność; (-) – antagonizm

		Efekt				
Metoda	Wariant	CCD 841 CoTr	HT-29	SW 620		
Metoda Griess’a	UA+CPT-11	-	-	-		
	OA+CPT-11	-	-	-		
	UA+OA	-	-	0		
	ALL	-	0	-		
IL-1β – metoda ELISA (kultury płaskie)	UA+CPT-11	-	-	+		
	OA+CPT-11	+	+	+		
	UA+OA	+	-	-		
	ALL	0	+	+		
IL-6 – metoda ELISA (kultury płaskie)	UA+CPT-11	0	+	+		
	OA+CPT-11	-	-	-		
	UA+OA	+	-	-		
	ALL	0	-	+		
IL-10 – metoda ELISA (kultury płaskie)	UA+CPT-11	+	-	+		
	OA+CPT-11	+	+	+		
	UA+OA	+	+	+		
	ALL	0	0	-		
		CCD 841 CoTr (hodowla płaska)	kokultura CCD 841 CoTr i HT-29	Sferoidy HT-29	kokultura CCD 841 CoTr i SW 620	Sferoidy SW 620
IL-1β – metoda ELISA (kokultury)	UA+CPT-11	-	-	+	-	0
	OA+CPT-11	-	-	-	0	-
	UA+OA	-	0	+	+	-
	ALL	-	-	+	-	-
IL-6 – metoda ELISA (kokultury)	UA+CPT-11	-	-	+	-	+
	OA+CPT-11	-	-	-	-	+
	UA+OA	-	0	+	-	+
	ALL	-	-	-	-	-
IL-10 – metoda ELISA (kokultury)	UA+CPT-11	+	+	+	+	-
	OA+CPT-11	+	+	0	-	-
	UA+OA	+	+	+	-	-
	ALL	-	0	-	-	-

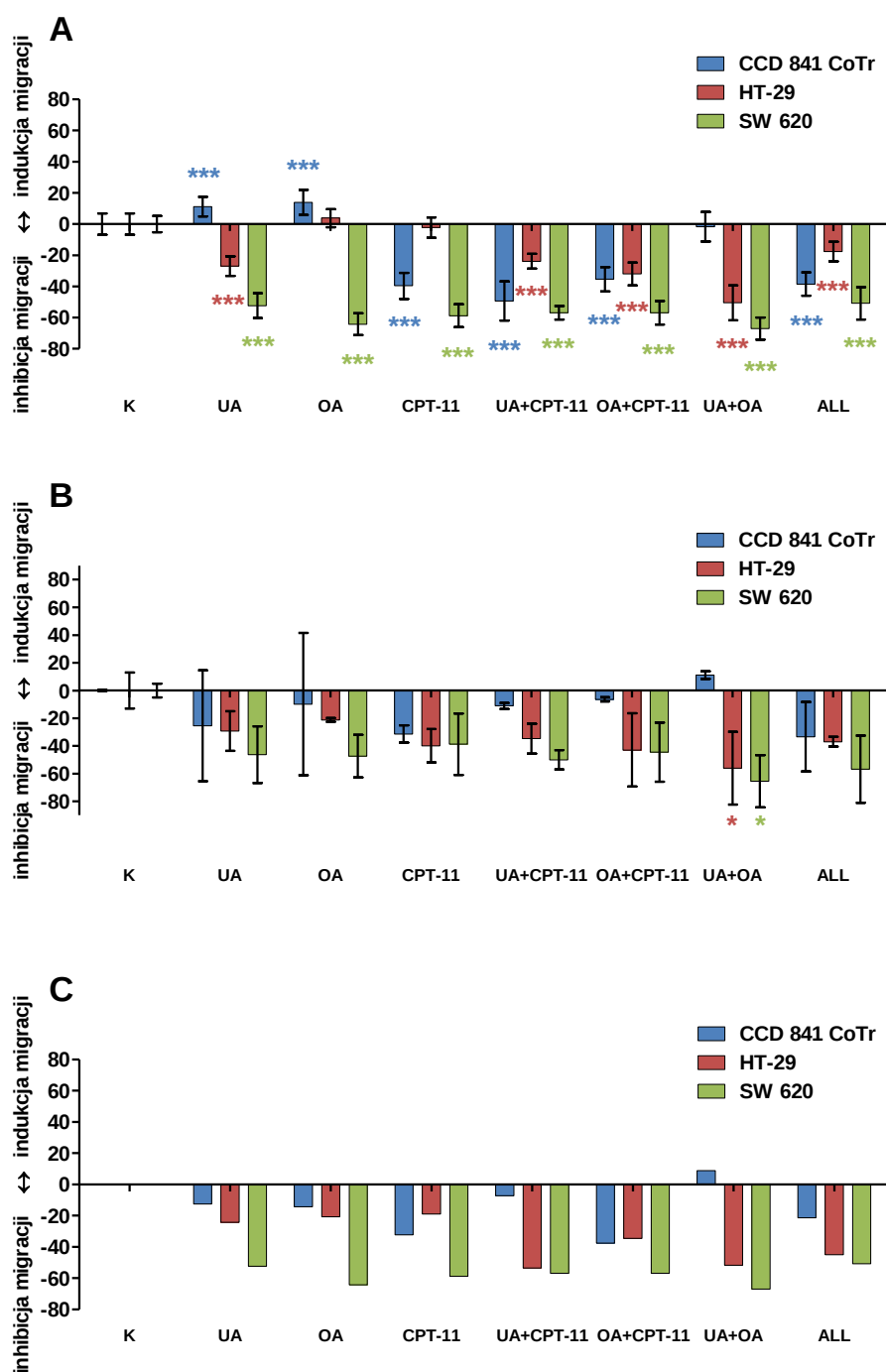
4.3. Zahamowanie migracji

Aktywność UA, OA i CPT-11 podawanych pojedynczo i w połączeniu, hamująca migrację komórek, została zbadana metodą rysy oraz metodą przechodzenia przez porowatą membranę (Transwell) o średnicy porów 8 μm i 0,4 μm . Efekt działania został przedstawiony w przeliczeniu na kontrolę, ustaloną jako 0%. Wartości poniżej 0 świadczą o spadku migracji, z kolei powyżej 0 o pobudzeniu tego procesu.



Zdj. 1. Przedstawienie wpływu badanych substancji na migrację komórek linii CCD 841 CoTr (A), HT-29 (B) oraz SW 620 (C) oznaczony metodą rysy; zaznaczone linie odpowiadają odległości między czołami komórek w wariancie kontrolnym; zaznaczony pasek pomiaru wyznacza 200 μm

Migracja komórek prawidłowych badana metodą rysy została zahamowana przez wszystkie warianty z kamptotecyną-11 (CPT-11, UA+CPT-11, OA+CPT-11, ALL), zaś warianty UA, OA oraz UA+OA nie wykazały żadnego efektu lub wręcz promowały migrację komórek linii CCD 841 CoTr (**Zdj. 1, Wyk. 9A**). Z kolei, migracja komórek nowotworowych została zahamowana przez wszystkie badane warianty, przy czym efekt był silniejszy względem komórek o większym potencjale migracyjnym, czyli linii SW 620. Najsilniejszy efekt wykazał wariant UA+OA



Wyk. 9. Wpływ badanych substancji na migrację komórek linii CCD 841 CoTr, HT-29 oraz SW 620 oznaczony metodą rysy (A) oraz metodą migracji przez porowatą membranę (Transwell): o średnicy porów 8 µm (B) oraz 0,4 µm (C); * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,005$, jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnett'a

($50,4 \pm 11,2\%$ (efekt synergistyczny)(Tabela 9) oraz $67,0 \pm 7,0\%$ w stosunku do kontroli dla, odpowiednio, komórek HT-29 i SW 620)(Wyk. 9, Zdj. 1).

Podobne wyniki uzyskano w metodzie migracji przez porowatą membranę (Transwell). Wszystkie warianty, z wyjątkiem UA+OA, osłabiały migrację komórek

prawidłowych. Najsilniejszy efekt hamujący wykazały warianty CPT-11 i ALL (spadek migracji o $31,4 \pm 6,2\%$ oraz $33,4 \pm 25,1\%$ w stosunku do kontroli) w przypadku membran o średnicy porów $8 \mu\text{m}$ oraz warianty CPT-11 i OA+CPT-11 (spadek o $32,1$ i $37,5\%$ w odniesieniu do kontroli) w przypadku membran o średnicy porów $0,4 \mu\text{m}$. Wariant UA+OA promował migrację komórek linii CCD 841 CoTr do $11,2 \pm 2,7\%$ ($8 \mu\text{m}$; efekt synergistyczny) i $8,9\%$ ($0,4 \mu\text{m}$) w porównaniu do kontroli (**Wyk. 9B-C, Tabela 9**).

W przypadku komórek nowotworowych, wszystkie warianty hamowały migrację komórek, zarówno w przypadku membran o średnicy porów $8 \mu\text{m}$, jak i $0,4 \mu\text{m}$. Najwyższy potencjał ograniczający migrację wykazał wariant UA+OA. Wykazano spadek ilości migrujących komórek o $56,0 \pm 26,3\%$ (HT-29) i $65,5 \pm 18,9\%$ (SW 620) względem kontroli w przypadku insertów o średnicy porów $8 \mu\text{m}$ i spadek o $51,7\%$ (HT-29) i $57,1\%$ (SW 620) w przypadku insertów $0,4 \mu\text{m}$ (**Wyk. 9B-C**).

Tabela 9. Określenie zależności między badanymi substancjami podawanymi w połączeniu – ocena zahamowania migracji; (+) – synergizm; (0) – addytywność; (-) – antagonizm

Metoda	Wariant	Efekt		
		CCD 841 CoTr	HT-29	SW 620
Metoda rysy	UA+CPT-11	+	0	-
	OA+CPT-11	+	+	-
	UA+OA	+	+	-
	ALL	+	-	-
Transwell $8 \mu\text{m}$	UA+CPT-11	-	-	-
	OA+CPT-11	-	-	-
	UA+OA	+	0	-
	ALL	-	-	-
Transwell $0,4 \mu\text{m}$	UA+CPT-11	-	0	-
	OA+CPT-11	0	0	-
	UA+OA	+	0	0
	ALL	-	-	-

4.4. Wpływ substancji na białka i szlaki zaangażowane w progresję nowotworu

W migracji komórek i przerzutowaniu nowotworów, kluczową rolę odgrywają metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej i regulujące je urokinazowy aktywator plazminogenu i jego receptor, a także GTP-azy Rho oraz cykloksygenaza-2. Ponadto, z przerzutowaniem związana jest zwiększona oporność

wielolekowa komórek nowotworowych, z istotną rolą białka MRP. Oceniono więc wpływ badanych związków na lokalizację, poziom i aktywność tych czynników w komórkach prawidłowych i nowotworowych.

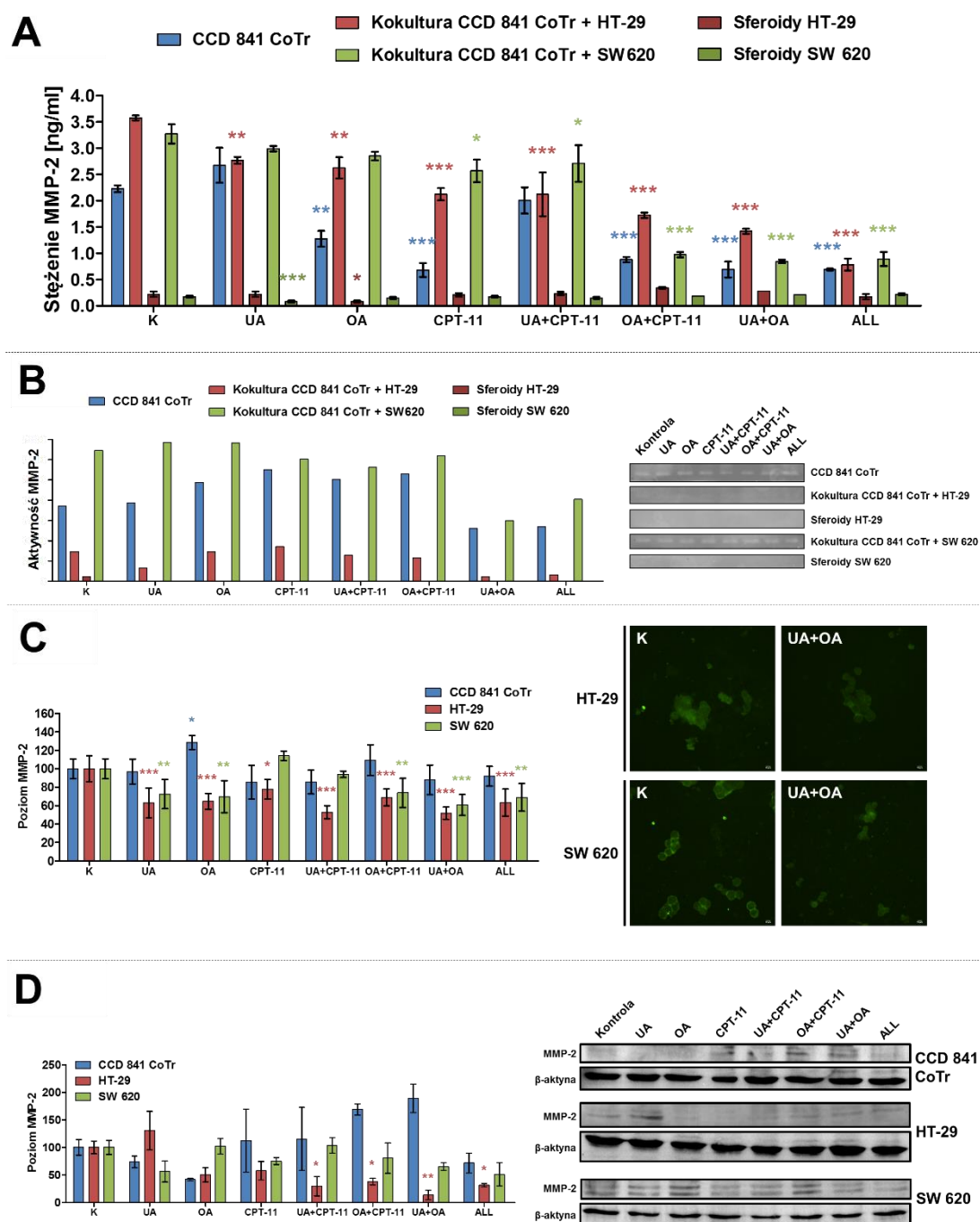
W sekcji wyników zamieszczono tylko wybrane zdjęcia z fluorescencji. Wszystkie zdjęcia reprezentatywne znajdują się na końcu pracy w sekcji Tablice.

4.4.1. Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej

Wpływ UA, OA i CPT-11 na MMPs oszacowano, wykonując analizę ilościową oraz ocenę aktywności metaloproteinaz macierzy -2 i -9 wydzielanych przez komórki w kokulturach. Ponadto, przeprowadzono badania wskazujące na lokalizację wewnątrzkomórkowych MMP-2 i -9 w homogennych hodowlach płaskich.

Stężenie MMP-2 wydzielanej przez kokultury komórek prawidłowych i sferoidów komórek nowotworowych obniżało się pod wpływem wszystkich badanych wariantów substancji, przy czym najsilniejsze działanie wykazały połączenia obu kwasów oraz obu kwasów i cytostatyku. Wpływały one na zmniejszenie ilości metaloproteinazy odpowiednio 2,5 i 4,5-krotnie (z $3,58 \pm 0,05$ w kontroli do $1,42 \pm 0,05$ (UA+OA) i $0,79 \pm 0,12$ ng/ml (ALL)) w kokulturach CCD 841 CoTr i HT-29 oraz prawie 4-krotnie (z $3,27 \pm 0,18$ do $0,85 \pm 0,03$ (UA+OA; efekt synergistyczny) i $0,89 \pm 0,13$ ng/ml (ALL; efekt synergistyczny) w kokulturach CCD 841 CoTr i SW 620 (**Wyk. 10A, Tabela 10**).

W przypadku większości badanych wariantów, w kokulturach prawidłowego nabłonka jelitowego zarówno z komórkami HT-29, jak i SW 620, wykazano indukcję wydzielania metaloproteinazy. Stężenie MMP-2 wydzielonej przez kokultury było większe, niż suma stężeń MMP-2 wydzielonej przez płaską monokulturę komórek CCD 841 CoTr oraz monokulturę sferoidów komórek nowotworowych. Jedynie zastosowanie wariantów UA oraz OA prowadziło do spadku stężenia MMP-2 wydzielanej przez sferoidy SW 620 i HT-29. Z kolei, wszystkie warianty (z wyjątkiem UA) zmniejszały wydzielanie MMP-2 przez komórki CCD 841 CoTr w hodowli płaskiej. Wyciągnięto zatem wniosek, iż spadek stężenia metaloproteinazy wynikał w większym stopniu z wpływu badanych związków na hodowlę płaską komórek prawidłowych, niż na komórki nowotworowe. Z drugiej strony, warianty UA, UA+CPT-11, OA+CPT-11 oraz UA+OA wykazały w większym stopniu działanie w stosunku do kokultur, niż monokultur komórek prawidłowych.



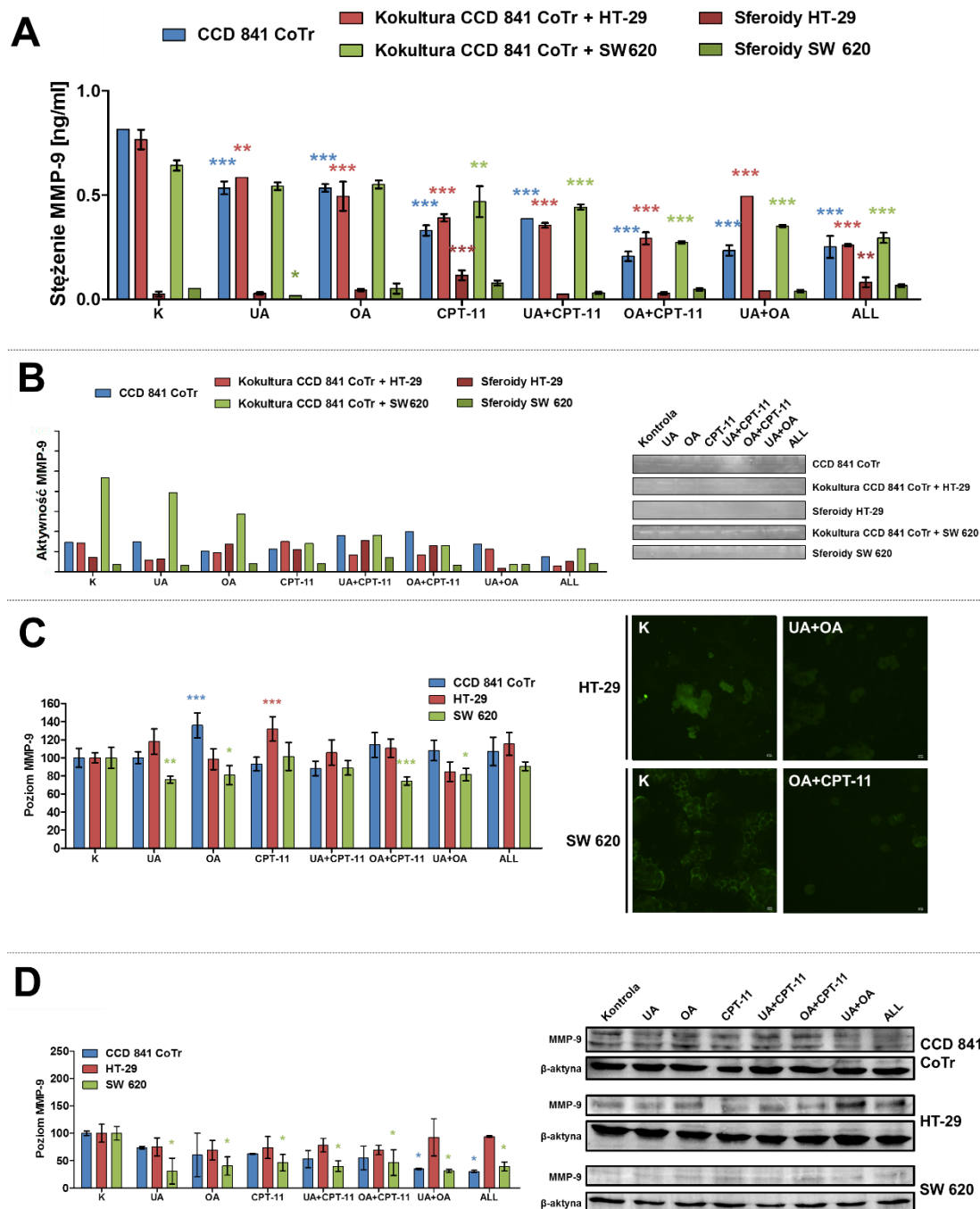
Wyk. 10. Wpływ UA, OA i CPT-11 podawanych pojedynczo i w połączeniu na MMP-2. Stężenie MMP-2 wydzielanej przez komórki linii CCD 841 CoTr w hodowlach płaskich, kokultury komórek prawidłowych i sferoidów utworzonych z komórek linii HT-29 lub SW 620 oraz same sferoidy komórek nowotworowych oznaczane metodą ELISA (A) i jej aktywność mierzona metodą zymografii żelatynowej (B); poziom wewnątrzkomórkowej MMP-2 w komórkach CCD 841 CoTr, HT-29 i SW 620 w hodowlach płaskich homogennych oznaczana metodami immunofluorescencji (C) i Western Blotting (D); * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,005$, jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnett'a

Aktywność MMP-2 w kokulturach uległa znacznemu obniżeniu w wyniku działania badanych substancji. Najskuteczniejszy okazał się wariant UA+OA, powodując około 7-krotne zmniejszenie aktywności MMP-2 w kokulturze CCD 841 CoTr + HT-29 oraz

ponad 2-krotne w przypadku kokultury CCD 841 CoTr + SW 620. W tych warunkach wykazano oddziaływania synergistyczne (**Wyk. 10B, Tabela 10**). Wszystkie badane warianty z wyjątkiem UA+OA oraz ALL spowodowały wzrost aktywności MMP-2 wydzielanej przez układ kontrolny, czyli płaską hodowlę CCD 841 CoTr (**Wyk. 10B**). Wykazano, iż aktywność żelatynazy A wydzielanej przez kokultury prawidłowego nabłonka jelitowego z komórkami linii nowotworowej HT-29 była niższa, niż w przypadku MMP-2 wydzielanej przez same komórki prawidłowe. W przypadku kokultur prawidłowego nabłonka jelitowego z komórkami linii nowotworowej SW 620, aktywność była prawie 2-krotnie wyższa, niż w układzie kontrolnym. Efekt badanych substancji na poziom MMP-2 w komórkach w hodowlach płaskich poddany został analizie z wykorzystaniem metod Western Blotting i immunofluorescencji. Wykazano znacznie silniejszy wpływ związków na komórki nowotworowe, niż prawidłowe.

W przypadku obu metod badawczych, wariant UA+OA spowodował największy spadek

poziomu MMP-2 w komórkach linii HT-29 (do $51,9 \pm 6,7\%$ względem kontroli w metodzie IF i $13,5 \pm 8,6\%$ (efekt synergistyczny) w metodzie WB) oraz SW 620 (do $60,8 \pm 11,4\%$ oraz $65,1 \pm 6,9\%$ w, odpowiednio, IF i WB)(**Wyk. 10C-D, Tablica 1**). W przypadku komórek prawidłowych odnotowano rozbieżność w wynikach pochodzących z obu metod. UA+OA indukował wzrost poziomu MMP-2 do $189,0 \pm 25,9\%$ kontroli w WB (efekt synergistyczny) i spadek do $88,1 \pm 16,0\%$ w metodzie IF (**Wyk. 10C-D, Tabela 10, Tablica 1**). Podobną sytuację zaobserwowano w przypadku OA. Kwas ten spowodował spadek poziomu żelatynazy A mierzony metodą WB i wzrost w metodzie IF. W obu metodach badawczych najsilniejszy wzrost poziomu MMP-2 w komórkach prawidłowych CCD 841 CoTr wykazał natomiast wariant OA+CPT-11 (wzrost do $109,5 \pm 16,6\%$ (IF) i $168,7 \pm 10,3\%$ (WB; efekt synergistyczny) względem kontroli)(**Wyk. 10C-D, Tablica 1**).



Wyk. 11. Wpływ UA, OA i CPT-11 podawanych pojedynczo i w połączeniu na MMP-9. Stężenie MMP-9 wydzielanej przez komórki linii CCD 841 CoTr w hodowlach płaskich, kokultury komórek prawidłowych i sferoidów utworzonych z komórek linii HT-29 lub SW 620 oraz same sferoidy komórek nowotworowych oznaczane metodą ELISA (A) i jej aktywność mierzona metodą zymografii żelatynowej (B); poziom wewnątrzkomórkowej MMP-9 w komórkach CCD 841 CoTr, HT-29 i SW 620 w hodowlach płaskich homogennych oznaczana metodami immunofluorescencji (C) i Western Blotting (D); * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,005$, jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnett'a

Stężenie MMP-9 wydzielanej przez komórki w kokulturach było kilkakrotnie niższe (około 5-krotnie w kontroli i około 2,5 – 6-krotnie niższe w wariantach badawczych), niż MMP-2. Niemniej jednak, wykazano istotny statystycznie spadek

stężenia żelatynazy B pod wpływem wszystkich badanych wariantów. W obu układach kokultury najsilniejsze działanie wykazały warianty połączenia OA+CPT-11 oraz obu kwasów jednocześnie z cytostatykiem. Wykazano prawie 3-krotny spadek stężenia MMP-9 w układzie CCD 841 CoTr + sferoidy HT-29 (z $0,77 \pm 0,05$ w kontroli do $0,29 \pm 0,03$ (OA+CPT-11) i $0,26 \pm 0,01$ ng/ml (ALL)) oraz ponad 2-krotny w układzie CCD 841 CoTr + sferoidy SW 620 (z $0,64 \pm 0,02$ w kontroli do $0,27 \pm 0,01$ (OA+CPT-11) i $0,29 \pm 0,02$ ng/ml (ALL))(Wyk. 11A). Stężenie MMP-9 wydzielanej przez sferoidy było bardzo niskie i mieściło się w granicach 0,02-0,12 ng/ml (w porównaniu do 0,08-0,34 ng/ml MMP-2). Badanie związku spowodowały spadek stężenia MMP-9 wydzielanej przez komórki prawidłowe. Można zatem przypuszczać, że zahamowanie wydzielania enzymu w kokulturach było w większym stopniu skutkiem działania substancji na komórki prawidłowe niż transformowane.

Mimo że ilość MMP-9 wydzielanej w kokulturze prawidłowego nabłonka jelitowego z komórkami linii nowotworowej HT-29 i SW 620 było na podobnym poziomie, to aktywność żelatynazy w układzie z komórkami SW 620 była kilkukrotnie wyższa. Ponadto, aktywność MMP-9 wydzielanej przez monokultury sferoidów nowotworowych była wyższa, niż MMP-2.

Wszystkie badane warianty (z wyjątkiem CPT-11 względem kokultury CCD 841 CoTr + sferoidy HT-29) spowodowały spadek aktywności MMP-9. Najsilniejsze działanie wykazały warianty UA względem CCD 841 CoTr + HT-29 (prawie 2,5-krotny spadek aktywności) oraz UA+OA względem CCD 841 CoTr + SW 620 (13-krotny spadek aktywności; efekt synergistyczny)(Wyk. 11B, Tabela 10). We wszystkich przypadkach spadek aktywności żelatynazy B był zależny od działania związków w większym stopniu względem komórek nowotworowych, niż prawidłowych.

Badane związki spowodowały spadek poziomu MMP-9 w hodowlach płaskich wszystkich linii komórkowych. Najsilniejsze działanie względem komórek prawidłowych wykazały warianty CPT-11 i UA+CPT w metodzie IF (spadek do, kolejno, $93,2 \pm 7,5\%$ i $88,4 \pm 8,1\%$ względem kontroli) oraz warianty UA+OA i ALL w metodzie WB (spadek do, odpowiednio, $35,1 \pm 1,5\%$ i $30,0 \pm 2,1\%$ w odniesieniu do kontroli)(Wyk. 11C-D, Tablica 2). W stosunku do komórek linii HT-29 efekt działania oceniony oboma metodami był niższy, niż w przypadku komórek prawidłowych. Najsilniejsze zahamowanie wytwarzania żelatynazy B wykazał wariant UA+OA w metodzie IF (spadek poziomu do $84,6 \pm 10,8\%$; efekt synergistyczny (Wyk. 11C, Tabela 10, Tablica 2)) oraz warianty OA i OA+CPT-11

w metodzie WB (spadek do, odpowiednio, $69,0 \pm 18,1\%$ i $69,1 \pm 8,5\%$)(**Wyk. 11D**). Badane substancje wykazały bardzo silne działanie względem komórek SW 620. Wszystkie warianty (z wyjątkiem CPT-11 w WB) spowodowały spadek poziomu MMP-9 w tych komórkach mierzony metodami IF i WB. Najsilniej wytwarzanie tego enzymu hamował wariant UA+OA w metodzie IF (spadek do $31,3 \pm 2,9\%$ kontroli) oraz OA+CPT-11 w metodzie WB (spadek poziomu do $74,4 \pm 4,5\%$ względem kontroli; efekt synergistyczny)(**Wyk. 11C-D, Tabela 10, Tablica 2**).

Badane substancje wpływały na wytwarzanie MMP-2 i -9 w kokulturach komórkowych. Mimo, iż spadek stężenia enzymów zależny był w większym stopniu od działania substancji na komórki prawidłowe, to spadek aktywności MMPs był skutkiem ich oddziaływań na komórki nowotworowe. Najsilniej działającymi wariantami okazały się OA+CPT-11, UA+OA oraz ALL. Świadczy to o pozytywnym wpływie kwasów ursolowego i oleanolowego na aktywność przeciwnowotworową kamptotecyny-11.

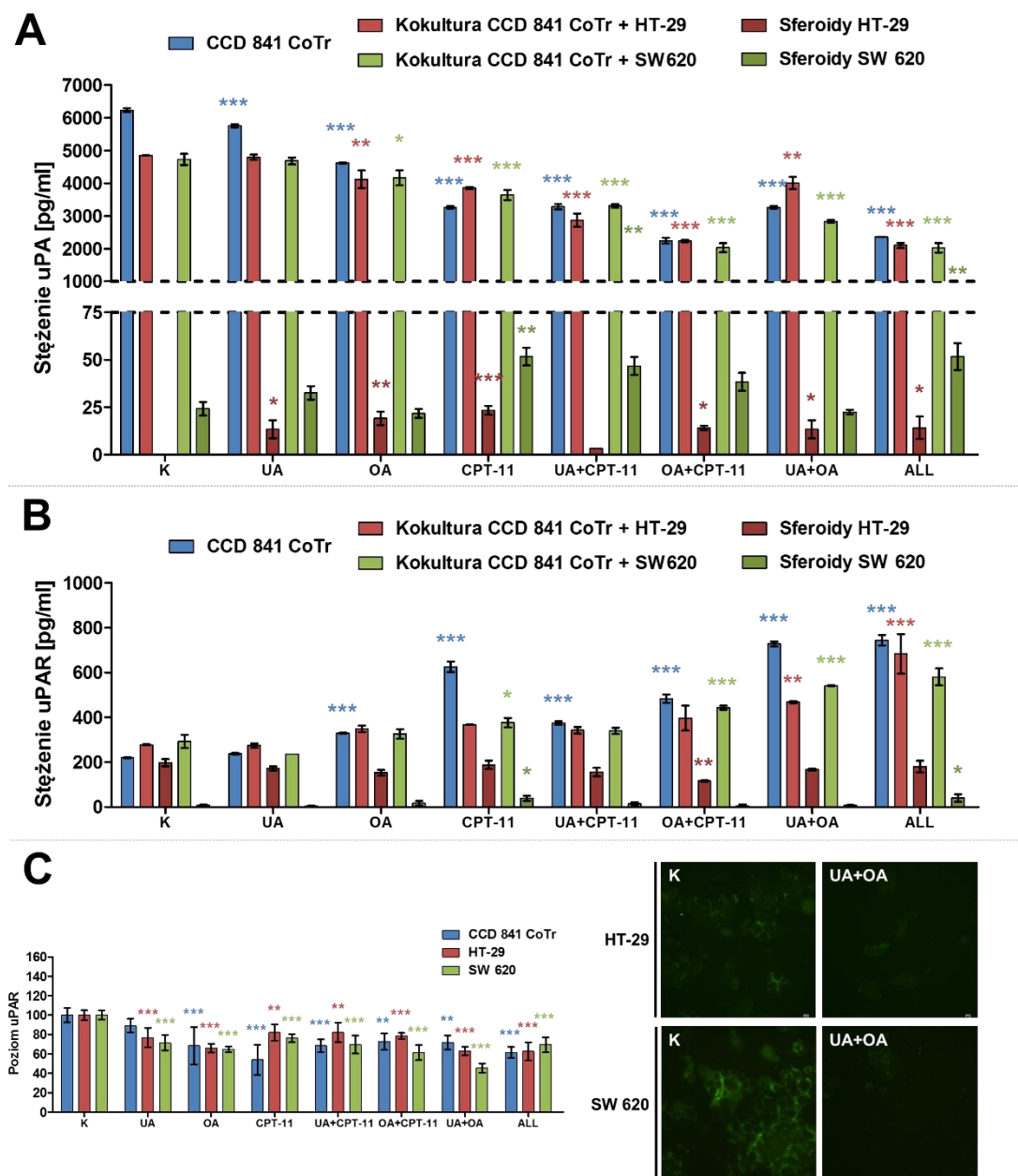
Tabela 10. Określenie zależności między badanymi substancjami podawanymi w połączeniu – ocena wpływu na metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej; (+) – synergizm; (0) – addytywność; (-) – antagonizm; brak – ocena efektu była niemożliwa

Metoda	Wariant	Efekt				
		CCD 841 CoTr (hodowla płaska)	kokultura CCD 841 CoTr i HT-29	Sferoidy HT-29	kokultura CCD 841 CoTr i SW 620	Sferoidy SW 620
MMP-2 – metoda ELISA (kokultury)	UA+CPT-11	-	-	+	-	-
	OA+CPT-11	-	0	+	+	+
	UA+OA	+	0	+	+	+
	ALL	-	0	-	+	+
MMP-9 – metoda ELISA (kokultury)	UA+CPT-11	-	-	+	-	+
	OA+CPT-11	0	-	-	0	+
	UA+OA	0	-	-	+	-
	ALL	-	-	-	0	+
MMP-2 – zymografia (kokultury)	UA+CPT-11	-	-	-	+	brak
	OA+CPT-11	-	0	-	+	brak
	UA+OA	+	+	-	+	brak

	ALL	+	+	-	+	brak
MMP-9 – zymografia (kokultury)	UA+CPT-11	+	-	+	-	+
	OA+CPT-11	+	+	-	-	+
	UA+OA	-	-	+	+	+
	ALL	0	0	+	-	+
		CCD 841 CoTr	HT-29	SW 620		
MMP-2 – immunofluorescencja	UA+CPT-11	0	0	-		
	OA+CPT-11	-	-	+		
	UA+OA	+	-	-		
	ALL	+	-	-		
MMP-9 – immunofluorescencja	UA+CPT-11	+	-	-		
	OA+CPT-11	-	-	+		
	UA+OA	-	+	-		
	ALL	-	-	-		
MMP-2 – Western Blotting	UA+CPT-11	+	+	+		
	OA+CPT-11	+	-	0		
	UA+OA	+	+	0		
	ALL	-	0	-		
MMP-9 – Western Blotting	UA+CPT-11	-	-	-		
	OA+CPT-11	-	-	-		
	UA+OA	0	-	-		
	ALL	-	-	-		

Efekt działania UA, OA i CPT-11 na układ regulujący szlak metaloproteinaz macierzy, uPA i jego receptora uPAR, był znaczący. Wszystkie warianty z wyjątkiem UA, spowodowały istotny statystycznie spadek stężenia uPA wydzielanego przez oba układy kokultur. Najwyższy, ponad 2-krotny spadek poziomu uPA zanotowano w przypadku kokultur prawidłowego nabłonka jelitowego ze sferoidami komórek nowotworowych inkubowanych z OA+CPT-11 oraz ALL. Wykazano spadek poziomu tego czynnika z $4847,50 \pm 5,89$ do, odpowiednio, $2233,33 \pm 30,64$ i $2099,17 \pm 76,60$ pg/ml w kokulturach ze sferoidami komórek linii HT-29 oraz z $4724,17 \pm 168,53$ do,

kolejno, $2030,00 \pm 141,42$ i $2025,83 \pm 142,60$ pg/ml w kokulturach ze sferoidami komórek linii SW 620 (**Wyk. 12A**). Pomędzy składowymi tych wariantów doszło do efektu synergistycznego, skutkującego wzmocnieniem inhibicji wydzielania uPA (**Tabela 11**).



Wyk. 12. Wpływ UA, OA i CPT-11 podawanych pojedynczo i w połączeniu na uPA i uPAR. Stężenie uPA (A) i uPAR (B) wydzielanych przez komórki linii CCD 841 CoTr w hodowlach płaskich, kokultury komórek prawidłowych i sferoidów utworzonych z komórek linii HT-29 lub SW 620 oraz same sferoidy komórek nowotworowych oznaczane metodą ELISA; poziom komórkowego uPAR w komórkach CCD 841 CoTr, HT-29 i SW 620 w hodowlach płaskich homogennych oznaczana metodą immunofluorescencji (C); * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,005$, jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnett'a

W przypadku uPAR, zaobserwowano sytuację odwrotną. Badanie związku spowodowały wzrost stężenia białka. Najwyższy w przypadku wariantów UA+OA (prawie 2-krotny wzrost względem kokultury prawidłowego nabłonka jelitowego ze sferoidami komórek linii HT-29 (z $278,13 \pm 2,65$ do $468,13 \pm 4,42$ pg/ml) i ze sferoidami komórek linii SW 620 (z $293,13 \pm 29,17$ do $541,25 \pm 1,77$ pg/ml)) oraz ALL (2,5-krotny (z $278,13 \pm 2,65$ do $683,75 \pm 88,39$ pg/ml) względem kokultury prawidłowego nabłonka jelitowego ze sferoidami komórek linii HT-29 i 2-krotny (z $293,13 \pm 29,17$ do $580,63 \pm 38,01$ pg/ml) względem kokultury prawidłowego nabłonka jelitowego ze sferoidami komórek linii SW 620)(**Wyk. 12B**). W warunkach tych wykazano wystąpienie interakcji synergistycznych (**Tabela 11**).

Wykonano analizę lokalizacji i poziomu receptora w komórkach metodą immunofluorescencji.

Najwyższa intensywność fluorescencji zaobserwowana została na obrzeżach komórek, co świadczy o błonowej lokalizacji receptora. Pod wpływem badanych związków intensywność fluorescencji była niższa, co świadczyć może o spadku poziomu uPAR na komórkach. Wszystkie warianty spowodowały wzrost stężenia uPAR wydzielanego przez komórki linii CCD 841 CoTr i jednocześnie spadek poziomu receptora na komórkach. Najwyższy poziom uPAR w płynie pozakomórkowym oznaczony metodą ELISA zanotowano w przypadku wariantów CPT-11, UA+OA i ALL, z kolei najniższy poziom białka w komórkach prawidłowych w metodzie IF odnotowano w przypadku wariantów CPT-11 i ALL (spadek do, odpowiednio, $54,0 \pm 15,5\%$ i $61,6 \pm 5,6\%$ względem kontroli)(**Wyk. 12B-C, Tablica 3**). Podobną zbieżność zaobserwowano w przypadku linii nowotworowych: najsilniejszy wzrost stężenia wydzielanego uPAR i jednocześnie najwyższy spadek poziomu komórkowego receptora nastąpiły po inkubacji komórek z wariantem UA+OA i ALL w przypadku linii HT-29 (spadek poziomu do, odpowiednio, $62,9 \pm 4,3\%$ i $62,6 \pm 9,2\%$ w odniesieniu do kontroli) oraz wariantem UA+OA w przypadku SW 620 (spadek poziomu uPAR do $45,5 \pm 4,7\%$ względem kontroli)(**Wyk. 12B-C, Tablica 3**).

Tabela 11. Określenie zależności między badanymi substancjami podawanymi w połączeniu – ocena wpływu na urokinazowy aktywator plazminogenu i jego receptor; (+) – synergizm; (0) – addytywność; (-) – antagonizm

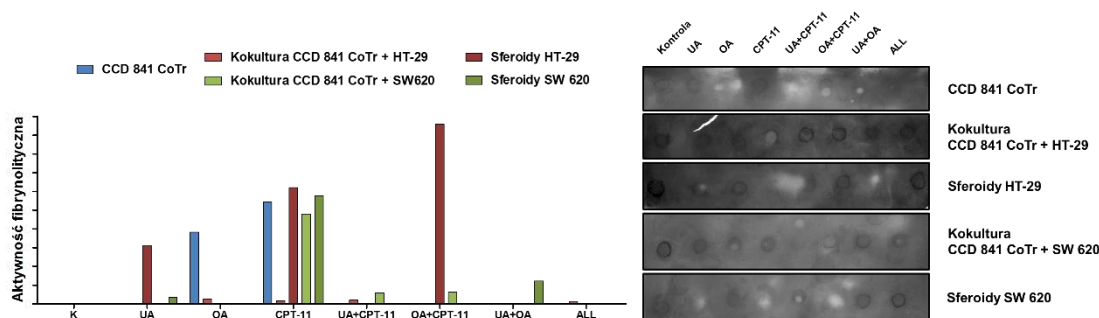
Metoda	Wariant	Efekt				
		CCD 841 CoTr (hodowla płaska)	kokultura CCD 841 CoTr i HT-29	Sferoidy HT-29	kokultura CCD 841 CoTr i SW 620	Sferoidy SW 620
uPA – metoda ELISA (kokultury)	UA+CPT-11	0	+	brak	0	-
	OA+CPT-11	0	+	brak	+	-
	UA+OA	+	0	brak	+	+
	ALL	-	+	brak	+	0
uPAR – metoda ELISA (kokultury)	UA+CPT-11	-	-	0	+	-
	OA+CPT-11	-	-	+	0	+
	UA+OA	+	+	-	+	-
	ALL	0	+	-	+	0
		CCD 841 CoTr	HT-29	SW 620		
uPAR – immunofluorescencja	UA+CPT-11	-	-	-		
	OA+CPT-11	-	-	-		
	UA+OA	-	-	-		
	ALL	-	-	-		

W celu potwierdzenia wpływu badanych związków na metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej oraz czynniki ich regulacji (uPA, uPAR) wykonano ocenę aktywności fibrynolitycznej pod wpływem UA, OA i CPT-11. Wzrost aktywności fibrynolitycznej świadczy o wzroście ilości plazminy, co z kolei jest wynikiem indukcji szlaku uPA/uPAR.

Wykazano, iż aktywność fibrynolityczna wzrosła pod wpływem wariantu UA względem sferoidów linii HT-29, a OA względem komórek prawidłowych CCD 841 CoTr. CPT-11 indukowała aktywność fibrynolityczną we wszystkich modelach z wyjątkiem kokultur CCD 841 CoTr + HT-29. Z kolei, OA+CPT-11 indukowała aktywność względem sferoidów HT-29 (**Wyk. 13**).

Wzrost aktywności fibrynolitycznej pod wpływem UA obserwowano w sferoidach linii HT-29. Jednocześnie stwierdzono wzrost poziomu MMP-2 (metoda WB), MMP-9 (metoda IF) w komórkach HT-29 oraz wzrost stężenia uPA (ELISA)

wydzielanego przez sferoidy HT-29. Pod wpływem OA obserwowano wzrost aktywności fibrynolitycznej komórek prawidłowych CCD 841 CoTr z jednoczesnym wzrostem stężenia i aktywności MMP-2 i -9. Kamptotecyna-11, we wszystkich modelach z wyjątkiem kokultury CCD 841 CoTr + HT-29 prowadziła do wzrostu aktywności fibrynolitycznej. Cytostatyk ten wywołał również wzrost aktywności MMP-2 i spadek poziomu uPAR wydzielanych przez komórki prawidłowe oraz poziomu MMP-9 w komórkach prawidłowych CCD 841 CoTr. Indukował także wydzielanie MMP-9 i uPA przez sferoidy linii HT-29 oraz wzrost aktywności MMP-9 w komórkach linii HT-29. W stosunku do komórek linii SW 620 rosnących w formie sferoidów, związek ten powodował wzrost stężenia uwalnianych MMP-9 i uPA. Wariant OA+CPT-11 spowodował indukcję aktywności fibrynolitycznej sferoidów HT-29, jak również indukcję aktywności MMP-9; ponadto, wykazano wzrost stężenia uPA i spadek stężenia uPAR wydzielanych przez te sferoidy. OA+CPT-11 indukował wzrost poziomu MMP-9 i uPAR w komórkach linii HT-29 (**Tabela 12**).



Wyk. 13. Aktywność fibrynolityczna badanych wariantów

Tabela 12. Porównanie wyników uzyskanych z analizy aktywności fibrynolitycznej oraz oceny wpływu badanych związków na białka zaangażowane w szlak metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP-2, MMP-9, uPA, uPAR)

Ocena aktywności fibrynolitycznej		efekt badanych substancji względem białek zaangażowanych w szlak metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (metoda badawcza/model komórkowy)			
wzrost aktywności	model komórkowy	MMP-2	MMP-9	uPA	uPAR
UA	sferoidy HT-29	• poziom MMP-2↑ (WB/HT-29)	• poziom MMP-9↑ (IF/HT-29)	• stężenie uPA↑ (ELISA/sferoidy HT-29)	

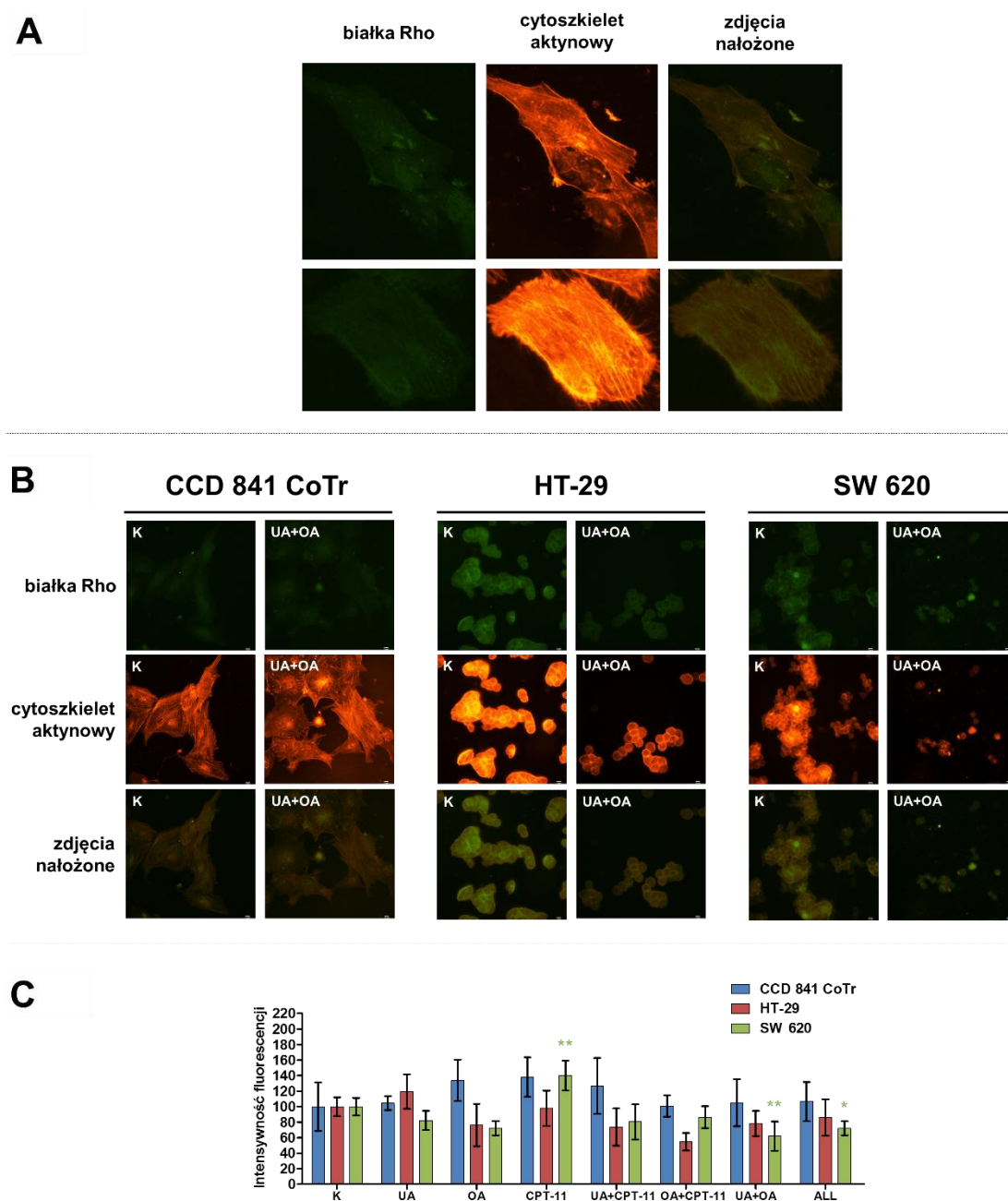
OA	płaska hodowla CCD 841 CoTr	• stężenie MMP-2↑ (ELISA/ płaska hodowla CCD 841 CoTr) • aktywność MMP-2↑ (zymografia/ płaska hodowla CCD 841 CoTr)	• stężenie MMP-9↑ (ELISA/ płaska hodowla CCD 841 CoTr)
		• aktywność MMP-2↑ (zymografia/ płaska hodowla CCD 841 CoTr)	• poziom MMP-9↑ (WB/ CCD 841 CoTr)
CPT-11	płaska hodowla CCD 841 CoTr	• aktywność MMP-2↑ (zymografia/ płaska hodowla CCD 841 CoTr)	• poziom MMP-9↑ (WB/ CCD 841 CoTr)
	sferoidy HT-29	• stężenie MMP-9↑ (ELISA/ sferoidy HT-29) • aktywność MMP-9↑ (zymografia/ sferoidy HT-29) • poziom MMP-9↑ (IF/HT-29)	• stężenie uPA↑ (ELISA/ sferoidy HT-29)
	kokultura CCD 841 CoTr + SW 620	• stężenie MMP-9↑ (ELISA/ sferoidy SW 620)	• stężenie uPA↑ (ELISA/ sferoidy SW 620)
	sferoidy SW 620		
OA+CPT-11	sferoidy HT-29	• aktywność MMP-9↑ (zymografia/ sferoidy HT-29) • poziom MMP-9↑ (IF/HT-29)	• stężenie uPA↑ (ELISA/ sferoidy HT-29) • stężenie uPAR↓ (ELISA/sferoidy HT-29) • poziom uPAR↑ (IF/ HT-29)

4.4.2. Białka podrodziny Rho

Obok metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej, kluczową rolę w migracji komórek odgrywają GTP-azy Rho. Poddano zatem analizie głównych przedstawicieli podrodziny Rho: zaangażowane w migrację białka RhoA i RhoC oraz indukujące apoptozę RhoB. W doświadczeniu wykorzystano metodę immunofluorescencji w połączeniu z barwieniem fluorescencyjnym cytoszkieletu aktynowego w celu oceny lokalizacji i poziomu białek w komórce. Ponadto, wykonano analizę metodą Western Blotting w celu potwierdzenia wpływu badanych związków na poziom białek Rho.

Wykazano, iż białka Rho lokalizują się wzdłuż włókien F-aktyny (**Wyk. 14A**).

Struktura cytoszkieletu aktynowego komórek prawidłowych była uporządkowana i dobrze widoczna. W przypadku komórek nowotworowych, F-aktyna miała strukturę bardziej chaotyczną, zlokalizowana była głównie na obrzeżach komórek. Może być to odzwierciedleniem odmiennej morfologii i fizjologii komórek nowotworowych w porównaniu do prawidłowych (**Wyk. 14B-C, Tablice 4-9**). Badane związki nie wykazały negatywnego wpływu na strukturę cytoszkieletu aktynowego komórek prawidłowych. Nie zaobserwowano żadnych zmian strukturalnych szkieletu, jak również intensywności fluorescencji emitowanej przez komórki CCD 841 CoTr poddane działaniu substancji. (**Wyk. 14B-C, Tablice 4, 7**). W przypadku komórek nowotworowych doszło do zaburzenia struktury cytoszkieletu w porównaniu do kontroli. Wykazano zmniejszenie ilości włókien F-aktyny na obrzeżach komórek i ich równomierne rozproszenie w całej objętości komórki. Może to być skutkiem przywrócenia prawidłowej struktury F-aktyny przez badane substancje. Wszystkie warianty związków podawanych w połączeniu (UA+CPT-11, OA+CPT-11, UA+OA i ALL) spowodowały zmniejszenie intensywności fluorescencji. Najsilniejszy efekt spowodował wariant OA+CPT-11 w stosunku do komórek linii HT-29 i UA+OA do komórek linii SW 620 (**Wyk. 14C, Tablice 5-6, 8-9**).

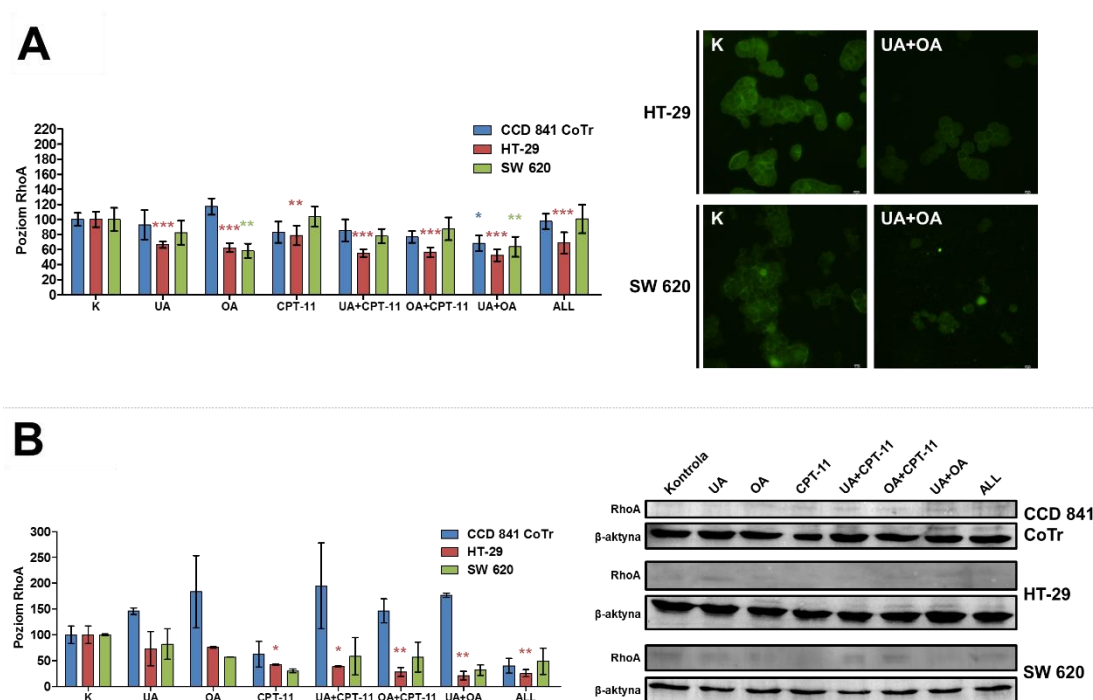


Wyk. 14. Lokalizacja białek Rho w komórce (A) oraz wpływ badanych substancji na strukturę cytoszkieletu aktynowego i związanych z nim białek Rho – zdjęcia z mikroskopii fluorescencyjnej (B) i analiza pół-ilościowa intensywności fluorescencji (C); * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,005$, jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnett'a

Wykazano pożądane działanie badanych wariantów względem białek Rho. Spowodowały one spadek poziomu białek RhoA i RhoC zaangażowanych w migrację komórek oraz wzrost poziomu białek RhoB indukujących apoptozę.

Badane substancje spowodowały nieznaczny spadek poziomu białka RhoA w komórkach linii CCD 841 CoTr mierzone metodą immunofluorescencji. Jedynie wariant OA pobudził produkcję RhoA (do $117,1 \pm 10,9\%$ względem kontroli)(Wyk.

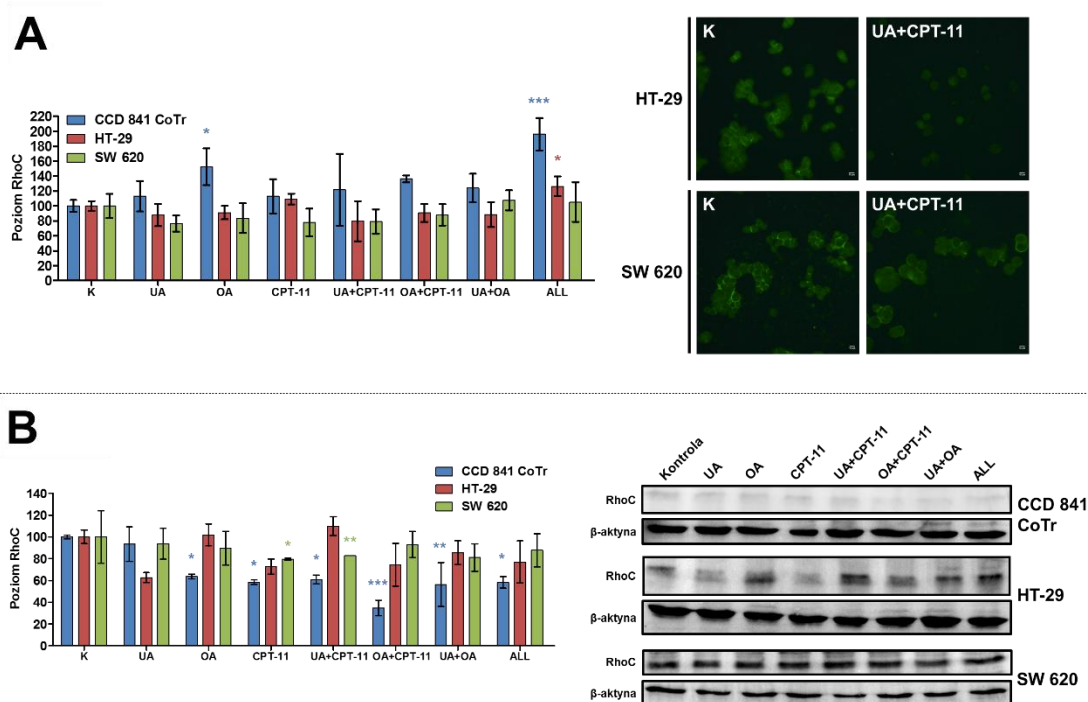
15A, Tablica 4). W przypadku metody Western Blotting, wszystkie warianty z wyjątkiem CPT-11 i ALL spowodowały znaczny wzrost poziomu białka. Najsilniejsze działanie wykazały OA, UA+CPT-11 oraz UA+OA (wzrost poziomu do, kolejno, $183,5 \pm 70,1\%$, $194,8 \pm 83,4\%$ i $176,8 \pm 4,3\%$ w odniesieniu do kontroli)(**Wyk. 15B**); efekt UA+CPT-11 był skutkiem interakcji synergistycznej (**Tabela 13**). Połączenie kwasu ursolowego lub oleanolowego z CPT-11 zmniejszyło niekorzystny efekt cytostatyku względem komórek prawidłowych. W przypadku komórek nowotworowych, wszystkie warianty (z wyjątkiem CPT-11 i ALL względem SW 620 w metodzie WB) spowodowały spadek poziomu RhoA. Najwyższą aktywność hamującą wytwarzanie tego białka wykazał wariant UA+OA. Poziom tego czynnika spadł do $52,4 \pm 7,8\%$ i $20,8 \pm 8,4\%$ (efekt synergistyczny) kontroli w, odpowiednio, metodach IF i WB względem komórek HT-29 i do $63,7 \pm 13,3\%$ (IF) i $31,6 \pm 10,0\%$ (WB) w odniesieniu do kontroli względem komórek SW 620 (**Wyk. 15, Tabela 13, Tablice 5-6**).



Wyk. 15. Wpływ badanych związków na poziom białka RhoA w komórkach linii CCD 841 CoTr, HT-29 oraz SW 620 określony metodą immunofluorescencji (A) oraz Western Blotting (B); * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, * - $p < 0,005$, jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnett'a**

Poziom białka RhoC w komórkach prawidłowych zwiększył się pod wpływem działania badanych związków. W metodzie IF najsilniej zadziałały OA

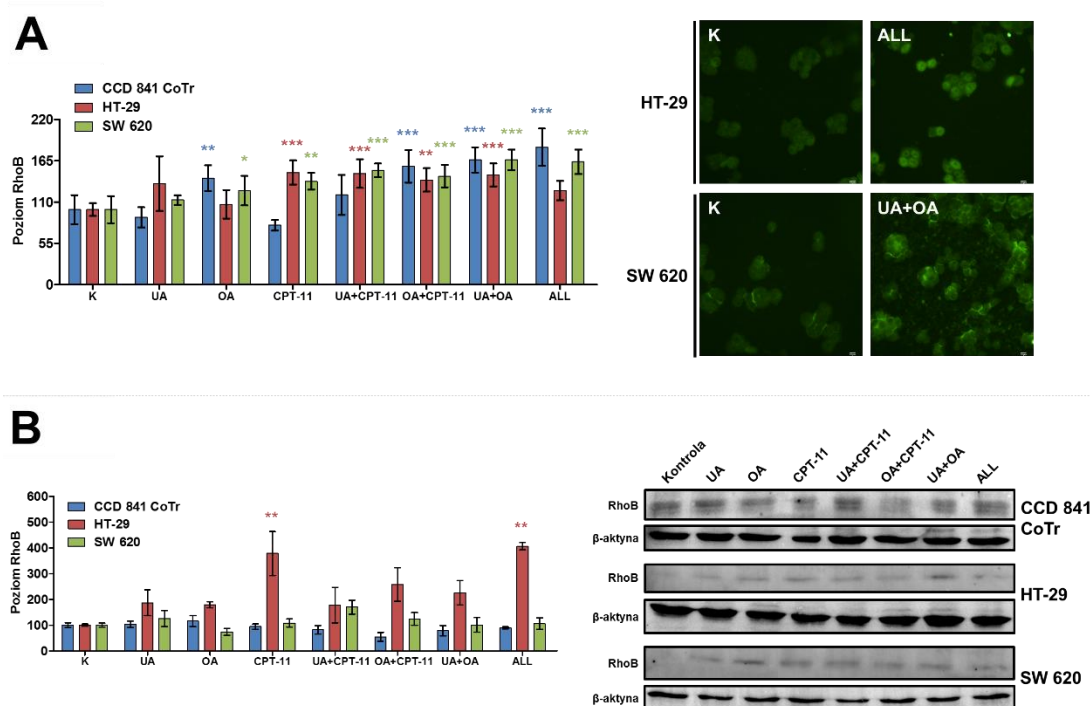
($152,6 \pm 24,7\%$ kontroli) i ALL ($196,0 \pm 21,7\%$ kontroli). Z kolei, w metodzie WB stwierdzono spadek poziomu RhoC. Najsilniejszy efekt wykazał wariant OA+CPT-11, wywołując spadek poziomu białka do $34,7 \pm 7,1\%$ względem kontroli)(**Wyk. 16, Tablica 7**). W prawie wszystkich przypadkach doszło do zmniejszenia poziomu RhoC w komórkach nowotworowych. Do inhibicji RhoC w komórkach HT-29 doszło w najwyższym stopniu pod wpływem wariantów UA (WB; spadek do $62,7 \pm 4,6\%$ w porównaniu do kontroli) i UA+CPT-11 (IF; $79,7 \pm 26,9\%$ względem kontroli)(**Wyk. 16, Tablica 8**). Najsilniejsze działanie względem komórek SW 620 wykazały warianty UA, CPT-11 i UA+CPT-11 w metodzie IF (spadek do, kolejno, $76,3 \pm 10,8\%$, $78,0 \pm 18,6\%$ i $79,2 \pm 16,3\%$ w odniesieniu do kontroli) oraz wariant UA+CPT-11 w metodzie WB ($66,9 \pm 7,4\%$ kontroli)(**Wyk. 16, Tablica 9**).



Wyk. 16. Wpływ badanych związków na poziom białka RhoC w komórkach linii CCD 841 CoTr, HT-29 oraz SW 620 określony metodą immunofluorescencji (A) oraz Western Blotting (B); * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,005$, jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnett'a

Wykazano pożądany wpływ badanych substancji na przeciwnowotworowe białko RhoB. Wszystkie warianty spowodowały wzrost poziomu białka w komórkach nowotworowych ocenianych zarówno metodą IF, jak i WB. Najsilniejszy efekt względem komórek HT-29 wykazały warianty CPT-11, UA+CPT-11 i UA+OA

w metodzie IF (wzrost do, odpowiednio, $149,5 \pm 16,1\%$, $148,0 \pm 19,2\%$ i $146,3 \pm 15,4\%$ w odniesieniu do kontroli)(Wyk. 17A, Tablica 10) oraz CPT-11 i ALL w metodzie WB (wzrost do, kolejno, $378,2 \pm 85,2\%$ i $405,8 \pm 14,3\%$ kontroli)(Wyk. 17B). Z kolei, najsilniejsze działanie w odniesieniu do komórek SW 620 wykazały warianty UA+OA i ALL w metodzie IF ($166,4 \pm 13,7$ i $163,8 \pm 16,4\%$ kontroli)(Wyk. 17A, Tablica 10) oraz UA+CPT-11 w metodzie WB ($169,7 \pm 26,9\%$ kontroli)(Wyk. 17B). Działanie związków względem komórek prawidłowych CCD 841 CoTr różniło się w zależności od użytej metody badawczej (IF i WB). Wszystkie warianty z wyjątkiem UA i CPT-11 spowodowały wzrost poziomu RhoB ocenione metodą IF, z kolei w metodzie WB wszystkie warianty z wyjątkiem UA i OA hamowały wytwarzanie RhoB w komórkach prawidłowych. W metodzie WB najsilniejsze zmniejszenie poziomu RhoB spowodowane było przez wariant OA+CPT-11 (spadek do $54,5 \pm 17,2\%$ kontroli). Ponadto, połączenie UA lub OA z CPT-11 spowodowało zmniejszenie poziomu RhoB w porównaniu do samego cytostatyku, z $94,1 \pm 10,6\%$ (CPT-11) do $81,5 \pm 16,7\%$ (UA+CPT-11) i $54,5 \pm 17,2\%$ (OA+CPT-11) w odniesieniu do kontroli, co dodatkowo było skutkiem synergizmu działania (Wyk. 17B, Tabela 13). Świadczy to o ochronnym działaniu kwasów ursolowego i oleanolowego stosunku do komórek prawidłowych.



Wyk. 17. Wpływ badanych związków na poziom białka RhoB w komórkach linii CCD 841 CoTr, HT-29 oraz SW 620 określony metodą immunofluorescencji (A) oraz Western Blotting (B); * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,005$, jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnett'a

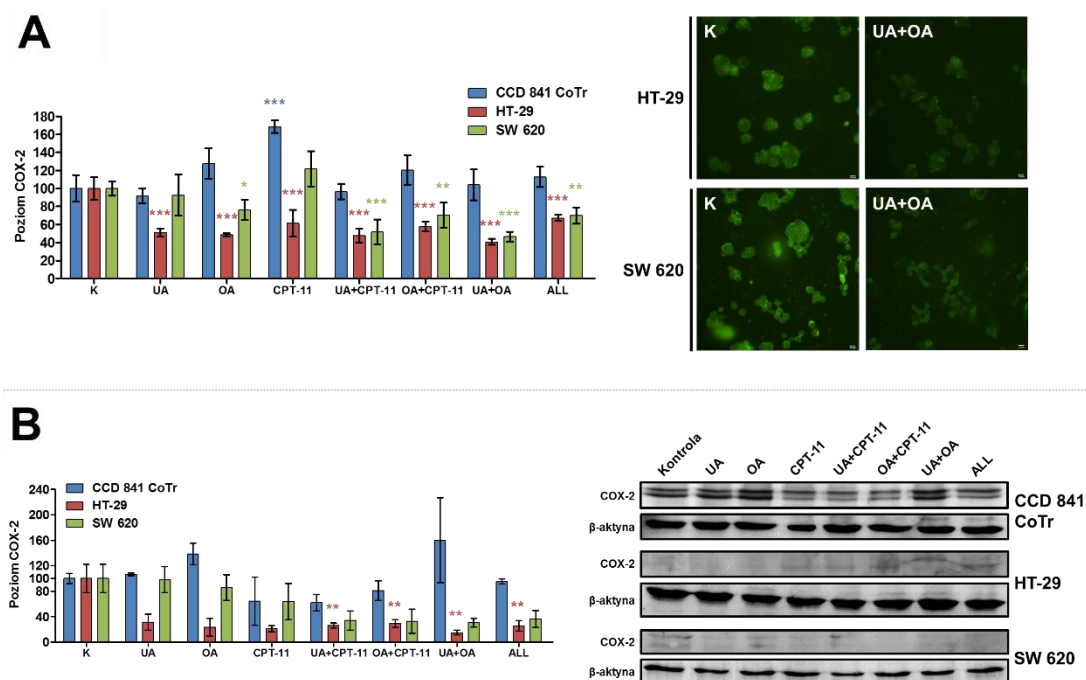
Tabela 13. Określenie zależności między badanymi substancjami podawanymi w połączeniu – ocena wpływu na białka RhoA, RhoC i RhoB; (+) – synergizm; (0) – addytywność; (-) – antagonizm

Metoda	Wariant	Efekt		
		CCD 841 CoTr	HT-29	SW 620
RhoA – immunofluorescencja	UA+CPT-11	-	0	+
	OA+CPT-11	+	-	-
	UA+OA	+	-	-
	ALL	-	-	+
RhoC – immunofluorescencja	UA+CPT-11	0	+	-
	OA+CPT-11	-	+	-
	UA+OA	-	-	+
	ALL	0	+	+
RhoB – immunofluorescencja	UA+CPT-11	+	-	0
	OA+CPT-11	+	-	-
	UA+OA	+	0	+
	ALL	0	-	0
RhoA – Western Blotting	UA+CPT-11	+	-	-
	OA+CPT-11	0	0	-
	UA+OA	-	+	0
	ALL	+	-	-
RhoC – Western Blotting	UA+CPT-11	0	+	0
	OA+CPT-11	0	0	-
	UA+OA	0	-	0
	ALL	-	-	-
RhoB – Western Blotting	UA+CPT-11	+	-	+
	OA+CPT-11	+	-	+
	UA+OA	+	-	+
	ALL	+	-	-

Wpływ badanych związków na poziom białek Rho był znaczący. Badane warianty stosowanych substancji wywołały spadek poziomu białek RhoA i RhoC, zaangażowanych w migrację i ruchliwość komórek. Efekt inhibicji nastąpił w komórkach nowotworowych, zaś w komórkach prawidłowych doszło do wzrostu poziomu tych białek. Z drugiej strony, UA, OA i CPT-11 podawane osobno, jak i w połączeniu, spowodowały wzrost poziomu zaangażowanego w indukcję apoptozy białka RhoB w komórkach nowotworowych z jednoczesnym spadkiem jego poziomu w komórkach prawidłowych.

Najsilniejszym działaniem względem GTP-az Rho wykazały się warianty UA+CPT-11 i UA+OA. Ponadto, podanie cytostatyku w połączeniu z UA i/lub OA skutkowało zmniejszeniem jego niekorzystnego wpływu na komórki prawidłowe.

4.4.3. Cyklooksygenaza-2



Wyk. 18. Wpływ badanych związków na poziom białka COX-2 w komórkach linii CCD 841 CoTr, HT-29 oraz SW 620 określony metodą immunofluorescencji (A) oraz Western Blotting (B); * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,005$, jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnett'a

Analiza poziomu COX-2 w komórkach pod wpływem działania badanych substancji wykazała pożądaną aktywność związków. Wszystkie warianty spowodowały spadek poziomu białka w komórkach nowotworowych, a wariant UA+OA wykazał najsilniejsze działanie. Stwierdzono spadek poziomu COX-2 do $40,8 \pm 3,3\%$ (IF) i $15,1 \pm 3,9\%$ (WB) kontroli względem komórek linii HT-29 oraz do $46,5 \pm 5,4\%$ (IF; efekt synergistyczny) i $30,8 \pm 6,6\%$ (WB; efekt synergistyczny) kontroli w komórkach linii SW 620 (**Wyk. 18, Tabela 14, Tablica 11**). Ten sam wariant spowodował także niekorzystny efekt względem komórek prawidłowych. Stwierdzono bowiem wzrost poziomu COX-2. Z kolei, połączenie UA+CPT-11 spowodowało spadek poziomu cyklooksygenazy-2 zarówno w komórkach prawidłowych CCD 841 CoTr (do $96,4 \pm 8,5\%$ i $62,0 \pm 13,0\%$ kontroli w, odpowiednio, metodzie IF i WB)(**Wyk. 18, Tablica 11**), jak i komórkach

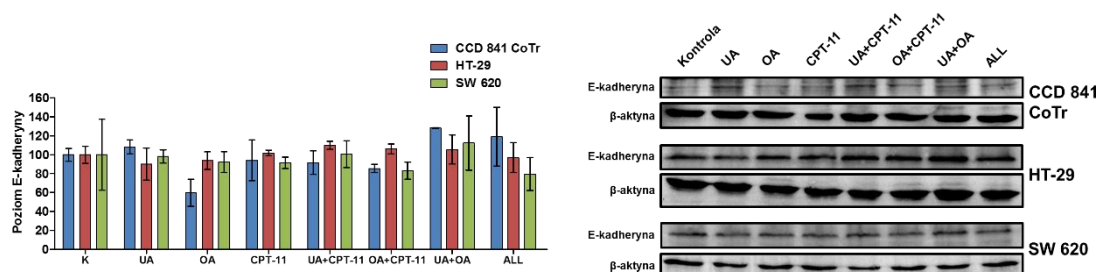
nowotworowych: do $47,8 \pm 7,5\%$ (IF) i $26,0 \pm 4,0\%$ (WB) w linii HT-29 oraz $51,7 \pm 13,9\%$ (IF) i $34,0 \pm 15,0\%$ (WB) w linii SW 620. Aktywność UA+CPT-11 względem komórek linii SW 620 była efektem synergizmu działania związków (**Wyk. 18, Tabela 14, Tablica 11**).

Produkcja COX-2 była najsilniej hamowana po zastosowaniu wariantu UA+OA. Wywołał on jednak niekorzystne działanie względem komórek prawidłowych, powodując wzrost poziomu badanego enzymu. Bardziej obiecujące działanie wykazał wariant UA+CPT-11, który spowodował spadek poziomu tego białka zarówno w komórkach nowotworowych, jak i prawidłowych.

Tabela 14. Określenie zależności między badanymi substancjami podawanymi w połączeniu – ocena wpływu na cyklooksygenazę-2; (+) – synergizm; (0) – addytywność; (-) – antagonizm

Metoda	Wariant	Efekt		
		CCD 841 CoTr	HT-29	SW 620
Metoda immunofluorescencji	UA+CPT-11	+	-	+
	OA+CPT-11	-	-	+
	UA+OA	-	-	+
	ALL	-	-	+
Western Blotting	UA+CPT-11	0	-	+
	OA+CPT-11	+	-	0
	UA+OA	0	-	+
	ALL	+	-	0

4.4.4. E-kadheryna



Wyk. 19. Wpływ badanych związków na poziom E-kadheryny w komórkach linii CCD 841 CoTr, HT-29 oraz SW 620 określony metodą Western Blotting; * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, * - $p < 0,005$, jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnett'a**

Wpływ badanych substancji na poziom E-kadheryny oceniono metodą Western Blotting. Warianty OA oraz OA+CPT-11 spowodowały spadek poziomu tego białka w komórkach prawidłowych, zaś pozostałe warianty wzrost. Najsilniejsze działanie wykazały UA+OA oraz ALL (wzrost poziomu do, odpowiednio, $128,1 \pm 0,2\%$ i $119,0 \pm 31,0\%$ w odniesieniu do kontroli)(**Wyk. 19**). Podanie OA pojedynczo powodowało spadek poziomu analizowanej cząstki adhezyjnej, zaś podanie OA w połączeniu z UA znosiło ten efekt. Co więcej, doszło do synergistycznej interakcji między związkami (**Tabela 15**). Wariant OA spowodował spadek poziomu CDH1 także w komórkach nowotworowych. Podobne działanie wykazał także UA w przypadku linii HT-29 oraz CPT-11, OA+CPT-11 i ALL w przypadku linii SW 620. Inkubacja komórek nowotworowych z pozostałymi wariantami wywołała wzrost poziomu E-kadheryny, przy czym najsilniejszy efekt związany był z wariantem UA+CPT-11 względem komórek HT-29 (do $109,9 \pm 4,4\%$ w odniesieniu do kontroli; efekt synergistyczny) i UA+OA względem linii SW 620 (wzrost poziomu CDH1 do $112,4 \pm 28,6\%$ kontroli; efekt synergistyczny)(**Wyk. 19, Tabela 15**).

Mimo niekorzystnego wpływu UA i OA podawanych pojedynczo, ich połączenie skutkowało wzrostem poziomu E-kadheryny we wszystkich liniach komórkowych. W tym wypadku stwierdzono interakcję synergistyczną. Ponadto, podanie obu związków w połączeniu z cytostatykiem powodowało odwrócenie niekorzystnego efektu kwasu oleanolowego oraz kamptotecyny-11 względem komórek prawidłowych. Świadczyć to może o ochronnym wpływie UA na te komórki.

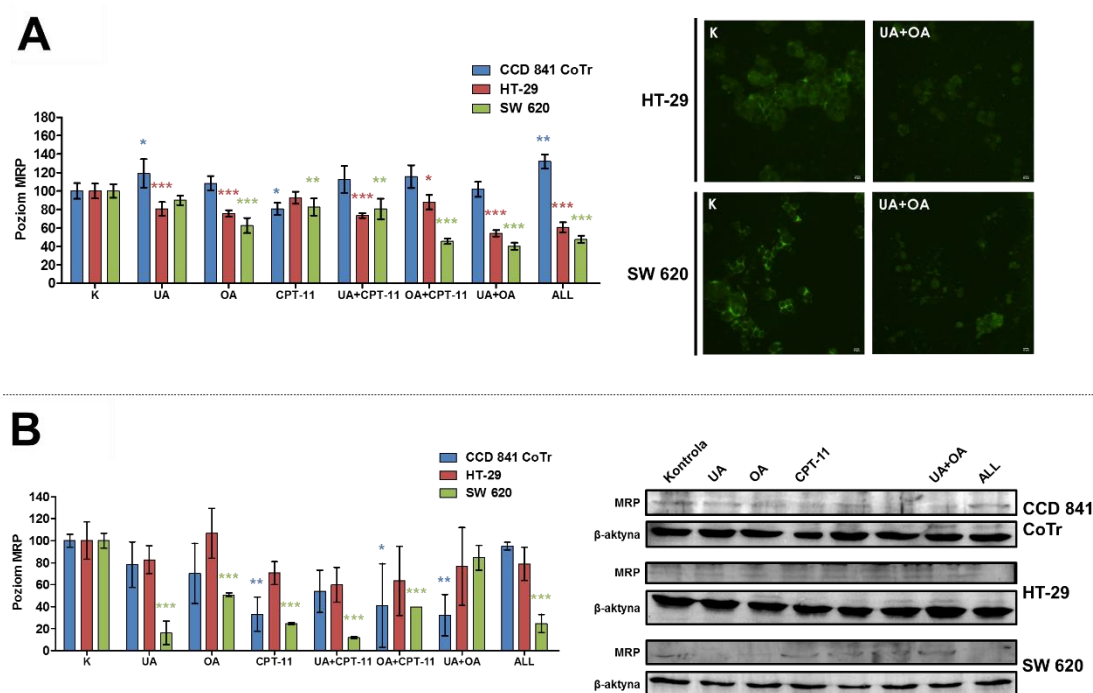
Tabela 15. Określenie zależności między badanymi substancjami podawanymi w połączeniu – ocena wpływu na E-kadherynę; (+) – synergizm; (0) – addytywność; (-) – antagonizm

Metoda	Wariant	Efekt		
		CCD 841 CoTr	HT-29	SW 620
Western Blotting	UA+CPT-11	+	+	+
	OA+CPT-11	-	+	0
	UA+OA	+	+	+
	ALL	+	-	0

4.4.5. Białko związane z opornością wielolekową

Poziom białka związanego z opornością wielolekową oceniano metodami immunofluorescencji i Western Blotting. Wykazano, iż wszystkie badane warianty (z wyjątkiem OA względem HT-29 w WB) spowodowały istotny spadek poziomu

MRP w komórkach nowotworowych obu linii. Najwyższy poziom inhibicji wykazały warianty UA+OA w metodzie IF (spadek do $54,2 \pm 3,4\%$ i $40,1 \pm 3,8\%$ w odniesieniu do kontroli względem, odpowiednio, komórek HT-29 i SW 620)(**Wyk. 20A, Tablica 12**) oraz UA+CPT-11 w metodzie WB ($59,9 \pm 15,9$ (HT-29) i $12,0 \pm 1,0$ (SW 620))(**Wyk. 20B**). W stosunku do komórek CCD 841 CoTr obserwowany efekt był rozbieżny w obu zastosowanych metodach badawczych. W IF wszystkie warianty z wyjątkiem CPT-11 spowodowały wzrost poziomu MRP, z kolei w metodzie WB wszystkie warianty ograniczały poziom MRP. Najwyższą wartość inhibicji wykazały warianty CPT-11 w metodzie IF (spadek poziomu do $80,7 \pm 6,6\%$ względem kontroli) oraz OA+CPT-11 i UA+OA w metodzie WB (spadek do, odpowiednio, $3,5 \pm 1,6\%$ i $10,9 \pm 0,4\%$ kontroli)(**Wyk. 20A, Tablica 12**). Z kolei, najwyższe pobudzenie produkcji MRP wywołał wariant ALL ($132,0 \pm 7,6\%$ kontroli, metoda IF)(**Wyk. 20B**).



Wyk. 20. Wpływ badanych związków na poziom białka MRP w komórkach linii CCD 841 CoTr, HT-29 oraz SW 620 określony metodą immunofluorescencji (A) oraz Western Blotting (B);
 * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,005$, jednoczynnikowa ANOVA, test post-hoc Dunnett'a

Tabela 16. Określenie zależności między badanymi substancjami podawanymi w połączeniu – ocena wpływu na białko związane z opornością wielolekową; (+) – synergizm; (0) – addytywność; (-) – antagonizm

Metoda	Wariant	Efekt		
		CCD 841 CoTr	HT-29	SW 620
Metoda immunofluorescencji	UA+CPT-11	+	0	-
	OA+CPT-11	+	-	0
	UA+OA	-	0	0
	ALL	+	0	0
Western Blotting	UA+CPT-11	-	0	-
	OA+CPT-11	0	+	-
	UA+OA	+	+	-
	ALL	-	-	-

4.5. Podsumowanie wyników

Badane związki wykazały szereg aktywności przeciwnowotworowych:

- UA, OA i CPT-11 podawane pojedynczo nie wykazały znacznego efektu cytotoksycznego względem komórek nowotworowych. Podanie ich w połączeniu spowodowało wzmocnienie aktywności w stosunku komórek linii HT-29 i SW 620. Najsilniejszy efekt wywarł wariant UA+OA. Wszystkie warianty w połączeniu z CPT-11 spowodowały istotny spadek żywotności komórek prawidłowych, jednakże podanie cytostatyku w połączeniu z UA lub OA zmniejszało jego cytotoksyczność na komórki prawidłowe CCD 841 CoTr.
- Wszystkie badane warianty hamowały proliferację komórek nowotworowych. Warianty UA+OA oraz ALL wywarły najsilniejsze działanie, przy jednoczesnym znikomym wpływie lub jego braku na komórki prawidłowe.
- Po inkubacji z każdym z badanych wariantów odnotowano wzrost poziomu tlenu azotu (NO) wydzielanego przez komórki wszystkich trzech linii. Z jednej strony, może to świadczyć o charakterze prozapalnym związków, z drugiej zaś o silnej aktywności immunomodulacyjnej.
- Kamptotecyna-11 działała prozapalnie w stosunku do komórek prawidłowych z hodowli płaskiej, zaś w połączeniu z UA lub OA efekt ten był ograniczany. Badane warianty wykazały działanie przeciwzapalne względem komórek nowotworowych w hodowli płaskiej, powodując spadek stężenia cytokin prozapalnych i wzrost cytokiny przeciwzapalnej. W kokulturowaniach, badane związki

zwiększały stężenia zarówno cytokin prozapalnych, jak i przeciwzapalnej. We wszystkich modelach badawczych, hodowlach płaskich, jak i kokulturach, najsilniej przeciwzapalnie działał wariant OA+CPT-11. W największym stopniu ograniczał stężenie cytokin prozapalnych i stymulował wzrost przeciwzapalnej.

- Wszystkie badane warianty hamowały migrację komórek nowotworowych, zaś w mniejszym stopniu działały na komórki prawidłowe. Najsilniejszą aktywność wykazał wariant UA+OA, hamując migrację komórek linii HT-29 i SW 620 oraz promując nieznacznie migrację komórek prawidłowych CCD 841 CoTr.
- Warianty OA+CPT-11 oraz UA+OA najsilniej ograniczały ilość i aktywność MMP-2 i MMP-9, w kokulturach, oraz w komórkach w hodowli płaskiej.
- Jednym z głównych miejsc ingerencji UA, OA i CPT-11 w szlak metaloproteinaz macierzy okazał się układ uPA/uPAR. Badane warianty spowodowały spadek stężenia uPA wydzielanego przez komórki w kokulturach oraz zrzucanie jego receptora uPAR. Podanie związków w połączeniu wzmacniało ten efekt. Ponadto, UA i OA zmniejszały szkodliwe działania cytostatyku względem komórek prawidłowych.
- Warianty UA+CPT-11, OA+CPT-11 oraz UA+OA spowodowały zmiany w strukturze cytoszkieletu komórek nowotworowych, jednocześnie nie mając niekorzystnego wpływu na komórki prawidłowe.
- Białka Rho, zaangażowane przede wszystkim w mechanizm ruchu komórek oraz tworzenie protruzji, także były celem badanych związków. Najsilniejszy efekt na komórki nowotworowe wykazały warianty UA+CPT-11 oraz UA+OA, powodując zmniejszenie poziomu związanych z migracją białek RhoA i RhoC oraz zwiększenie poziomu zaangażowanego w indukcję apoptozy białka RhoB. Warianty te jednocześnie wywarły odwrotne działanie na komórki prawidłowe, powodując wzrost poziomu białek RhoA i RhoC oraz spadek poziomu białka RhoB.
- Jednym z punktów regulacji i integracji badanych szlaków związanych z migracją komórek jest COX-2. Wariant UA+CPT-11 spowodował spadek poziomu cyklooksygenazy-2 w komórkach prawidłowych CCD 841 CoTr, i nowotworowych linii HT-29 oraz SW 620. Ponadto, taki sam efekt na komórki nowotworowe wykazał wariant UA+OA.

- Ważnym czynnikiem biorącym udział w regulacji adhezji komórek oraz szlaków związanych z migracją jest E-kadheryna. Zmniejszenie jej ekspresji jest jednym z najbardziej kluczowych procesów zapoczątkowujących nabywanie przez komórki nowotworowe zdolności do ruchu. Wykazano, że badane warianty, w szczególności UA+CPT-11 oraz UA+OA, powodują wzrost poziomu CDH1 zarówno w komórkach prawidłowych, jak i nowotworowych.
- Wykazano, że wszystkie badane warianty obniżały poziom białka MRP w komórkach nowotworowych i w większości przypadków także prawidłowych, przy czym najsilniejszy efekt wywarły warianty UA+CPT-11, OA+CPT-11 oraz UA+OA.

5. Dyskusja

Celem niniejszej pracy była analiza właściwości przeciwnowotworowych kwasów ursolowego i oleanolowego, ze szczególnych uwzględnieniem aktywności hamowania migracji komórek nowotworowych. Drugim, nadrzędnym celem, było określenie potencjału badanych substancji w terapii skojarzonej z rutynowo stosowanym chemioterapeutykiem, kamptotecyną-11. Dokonano analizy wpływu badanych substancji, podawanych pojedynczo i w połączeniu, na ludzkie komórki nowotworowe wczesnego (HT-29), jak i późnego, przerzutowego (SW 620), stadium raka jelita grubego. Miało to na celu określenie nie tylko aktywności związków do hamowania migracji czy inwazji komórek nowotworowych, ale także do zatrzymania mechanizmów prowadzących do nabycia tych cech. Badania prowadzono także na modelu ludzkich komórek prawidłowych nabłonka jelitowego (CCD 841 CoTr), aby określić potencjalny wpływ substancji na komórki pochodzące z niezmiennych nowotworowo tkanek.

Podjęto także próbę wyjaśnienia mechanizmu odpowiedzialnego za hamowanie migracji komórek nowotworowych. W tym celu wykonano analizę wpływu substancji na białka zaangażowane w szlaki metaboliczne związane z migracją i przerzutowaniem: metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej, urokinazowy aktywator plazminogenu i jego receptor, białka podrodziny Rho, cyklooksygenazę-2 oraz E-kadherinę. Ocenie poddano także wpływ związków na białko związane z opornością wielolekową w celu wyjaśnienia, czy efekt wzmocnienia aktywności cytostatyku wynikał wyłącznie z interakcji między substancjami, czy też był skutkiem ingerencji w mechanizm oporności wielolekowej.

Do badań wybrane zostały nietoksyczne stężenia substancji, ustalone empirycznie. Miało to na celu dokonanie analizy właściwości związków do hamowania migracji komórek (i mechanizmów regulujących ten proces) przy ich niewielkiej toksyczności.

5.1. Podstawowe właściwości przeciwnowotworowe

UA, OA oraz CPT-11 podawane pojedynczo nie wykazały znacznego spadku żywotności komórek nowotworowych, przy czym efekt cytotoksyczny wykazano względem komórek CCD 841 CoTr po inkubacji z CPT-11. Wskazywać to może

na niekorzystne działanie cytostatyku na komórki prawidłowe. Efekt ten jednak był mniejszy po podaniu kamptotecyny-11 w połączeniu z OA, co świadczyć może o ochronnym działaniu kwasu oleanolowego.

Uzyskane wyniki sugerują, iż kwasy ursolowy i oleanolowy w większym stopniu działają na integralność błony komórkowej, niż na metabolizm komórkowy. Jednym z sugerowanych w literaturze mechanizmów aktywności tych związków jest ich oddziaływanie z błonowym cholesterolem, co prowadzić może do destabilizacji plazmalemmy [Podolak i in., 2010]. Z kolei, badania Teixeira'y i wsp. oraz Lőrincza i wsp. wykazały, iż UA i OA (w formie monomerów, dimerów lub agregatów) wiążą się z lipidami, co powoduje zmiany strukturalne w błonie komórkowej [Teixeira i in., 2007; Lőrincz i in., 2015].

Wszystkie badane warianty substancji, w metodach MTT i ocenie klonalności, hamowały proliferację komórek nowotworowych, z jednocześnie słabszym lub znikomym efektem w stosunku do komórek prawidłowych. Potwierdzają to liczne badania wskazujące, że UA i OA już w niewielkich stężeniach hamują proliferację komórek raka jelita grubego i powodują zahamowanie cyklu komórkowego, a efekt jest mocniejszy wraz ze wzrostem stężenia i czasu inkubacji [Shan i in., 2009; Wang i in., 2013; Lin i in., 2013; Li i in., 2015; Guo i in., 2017]. Ponadto, wykazano, iż UA jest toksyczny względem komórek prawidłowych linii CCD841 oraz LO2 dopiero przy wysokich stężeniach (powyżej 20 i 40 μM , co odpowiada około 9,1 i 18,3 $\mu\text{g/ml}$) [Wang i in., 2013]. Wykazano, iż mechanizmem odpowiedzialnym za zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych przez UA i OA jest ingerencja w szlak cykliny D1 i CDK4, regulujących cykl podziałowy komórek [Lin i in., 2013; Li i in., 2015; Guo i in., 2017]. Ponadto, naukowcy wykazali, iż kwasy ursolowy i oleanolowy indukują inhibitory tego szlaku, a mianowicie białko p53 i p21 [Lin i in., 2013; Li i in., 2015]. Co więcej, hamują aktywność induktorów cykliny i CDK: EGFR, JNK, MAPK/ERK, p38 i Akt [Shan i in., 2009; Wang i in., 2013; Lin i in., 2013; Li i in., 2015].

Wykazano, iż po inkubacji komórek z badanymi wariantami substancji doszło do wzrostu stężenia wydzielanego tlenku azotu (NO). Z jednej strony może to świadczyć o niekorzystnym działaniu związków, gdyż wzrost NO związany jest z indukcją czynników zaangażowanych w migrację komórek, np. COX-2 lub indukcją czynników stanu zapalnego. Z drugiej jednak strony literatura podaje, iż wzrost ilości tlenku azotu może działać przeciwnowotworowo. W sytuacji takiej dochodzi

do uszkodzenia komórek nowotworowych, inhibicji czynników zaangażowanych we wzrost, proliferację czy migrację komórek, jak również do indukcji apoptozy [Vannini i in., 2015]. Jak wynika z literatury, kwas ursolowy powoduje wytworzenie reaktywnych form tlenu w wyniku indukcji oksydazy NADPH 2 (NOX2, ang. NADPH oxidase 2). Z jednej strony, może to skutkować promocją wydzielania IL-1 β , z drugiej zaś promować apoptozę czy hamować proliferację komórek na skutek zmniejszenia ekspresji HIF-1 α [Ikeda i in., 2007; Guo i in., 2017].

Fu i wsp. dokonali syntezy pochodnej OA powodującej wydzielanie przez komórki tlenu azotu. Wraz z tą aktywnością związane były także inhibicja proliferacji komórek raka jelita grubego (linii HCT-116 i HCT-15), zmniejszenie wielkości guza u myszy, a także spadek poziomu białek zaangażowanych w proliferację (p38, HIF-1 α) i progresję (Wnt, β -katenina, COX-2, PGE2) [Fu i in., 2015]. Ponadto, wykazano aktywację przez OA mechanizmu przeciwnowotworowego zależnego od reaktywnych form tlenu (ROS). Kwas oleanolowy w komórkach HCT-15 i HT-29 powodował indukcję NOX2, co prowadziło do zwiększenia ilości ROS i tym samym inaktywacji HIF-1 α . Indukcja NOX2 przez OA skutkowała także inhibicją cykliny D1 i CDK2 [Guo i in., 2017]. Zwiększona aktywność iNOS i wyższe stężenie NO w komórkach transfekowanych wektorem z genem dla iNOS, uczuła komórki raka prostaty (DU145, PC-3) i raka jelita grubego (SNU-1040, HCT-116, HT-29) na chemio- i radioterapię [Chung i in., 2003; Adams i in., 2009].

Dokonano zatem porównania wyników uzyskanych z badania cytotoksyczności związków i ich wpływu na migrację komórek. Do indukcji wydzielania NO dochodziło w największym stopniu pod wpływem wariantów UA+OA oraz ALL. Warianty te także wykazały najsilniejszy efekt cytotoksyczny względem komórek nowotworowych oraz najefektywniej hamowały migrację komórek.

Ocena właściwości przeciwzapalnych badanych związków dokonana została w modelu monohodowli płaskich oraz kokultur. W obu modelach, najkorzystniejsze działanie wykazały warianty UA oraz OA+CPT-11, powodując spadek stężenia interleukin prozapalnych (IL-1 β i IL-6) i wzrost stężenia interleukiny przeciwzapalnej (IL-10). Ponadto, kwasy ursolowy i oleanolowy zmniejszały niekorzystne, prozapalne, działanie kamptotecyny-11 względem komórek prawidłowych (warianty UA+CPT-11 oraz OA+CPT-11). Liczne badania wykazały aktywność przeciwzapalną kwasów ursolowego i oleanolowego. OA oraz UA zmniejszały poziom NF- κ B i kinazy regulującej jego ekspresję w komórkach raka jelita grubego linii HT-29 i Colo 205

[Chun i in., 2014; Kim i in., 2014]. Shan i wsp., badając kwas ursolowy, uzyskali podobne wyniki na komórkach linii SW 620 i RKO. Ponadto wykazali, iż podanie UA w połączeniu z cytostatykiem oksaliplatyną (OXL) wzmacniało tę aktywność [Shan i in., 2016a]. Wykazano także aktywność UA hamującą stan zapalny w tkankach jelita grubego i komórkach makrofagów otrzewnowych u myszy z zapaleniem jelita grubego indukowanego kwasem trinitrobenzosulfonowym (TNBS). Kwas ursolowy hamował aktywność interleukin prozapalnych (IL-1 β , IL-6, TNF- α), receptora TLR4 oraz COX-2, PGE2, iNOS i składników szlaku NF- κ B z jednoczesną promocją IL-10 [Jang i in., 2014].

5.2. Zahamowanie migracji

Migracja komórek nowotworowych została zahamowana przez wszystkie badane warianty w obu metodach badawczych, czyli metodzie rysy oraz metodzie z migracją przez porowate membrany. Wyższą aktywność hamującą wykazano w przypadku komórek najszybciej migrujących, tj. SW 620. Działanie UA, OA i CPT-11 względem komórek prawidłowych było słabsze, lub wręcz dochodziło do promocji migracji. Najwyższą pożądaną aktywnością charakteryzowały się warianty OA+CPT-11 oraz UA+OA, jako że w najwyższym stopniu hamowały migrację komórek nowotworowych, a najniższym prawidłowych.

Wyniki z metody rysy interpretować można jako zahamowanie migracji opartej o mechanizm kolektywnego ruchu komórek, czyli całych grup komórek [Hulkower, Herber, 2011; Jonkman i in., 2014]. W mechanizmie tym największe znaczenie odgrywiają metaloproteazy (MMPs) oraz integryny [Friedl, Alexander, 2011; Singh i in., 2018]. W przypadku membran z porami o średnicy 8 μ m dochodzi do migracji pojedynczych komórek, natomiast membrany z porami 0,4 μ m umożliwiają jedynie przeciskanie wypustek plazmatycznych (protruzji). W takim typie migracji większą rolę odgrywiają MMPs oraz małe białka G, w szczególności przedstawiciele podrodziny Rho [Friedl, Alexander, 2011; Singh i in., 2018]. Można zatem wnioskować, iż badane warianty wykazały aktywność hamowania migracji komórek niezależnie od typu ruchu, tj. kolektywnego, mezenchymalnego, czy ameboidalnego. Z literatury wynika, iż zahamowanie aktywności MMPs, czy to przez selektywne, czy nieselektywne inhibitory, nie jest wystarczające dla zatrzymania migracji i przerzutowania komórek. Zatem możliwym jest, iż komórki pozbawione zdolności

trawienia macierzy zewnątrzkomórkowej, dokonują zmiany w strategii migracji i inwazji. Mechanizmem zaangażowanym w taki proces może być przejście mezenchymalno-ameboidalne (MAT), gdy komórki zaczynają poruszać się ruchem ameboidalnym, opartym na przeciskaniu się pomiędzy składnikami tkanki, aniżeli ich proteolizie [Simiczyjew i in., 2018]. Uzyskane wyniki sugerują, iż aktywność zahamowania migracji komórek przebiega na drodze inhibicji kilku różnych szlaków metabolicznych, zaangażowanych w różne strategie ruchu.

Do tej pory przeprowadzono szereg badań, w których zademonstrowano aktywność UA i OA hamującą migrację komórek, zarówno w modelu raka jelita grubego, jak i w modelach innych nowotworów. Wang i wsp. wykazali zahamowanie migracji komórek linii SW480 i LoVo pod wpływem UA w metodzie rysy, z kolei Xiang i wsp. – inwazji komórek SW 620 w metodzie z porowatymi membranami opłaszczonymi matrygelem, imitującym błonę podstawną [Wang i in., 2013; Xiang i in., 2015]. Zahamowanie migracji lub inwazji przez kwas ursolowy, przy zastosowaniu metod rysy lub porowatych membran, zostało przedstawione także przez inne zespoły: Yeh i wsp. oraz Tang i wsp. w modelu raka piersi (komórki linii MDA-MB-231 oraz MCF-7), Kim i Moon w modelu raka żołądka (SNU-484), Liu i wsp. na komórkach raka płuca (A549, H1875) oraz zespół Zhang i wsp. w modelu raka jajnika (SKOV3) [Yeh i in., 2010; Tang i in., 2016; Kim, Moon, 2015; Liu i in., 2013; Zhang J. i in., 2015]. Z kolei, aktywność kwasu oleanolowego hamującą migrację komórek wykazano w modelu glejaka, na komórkach linii U-87 MG i U-251 MG oraz dwóch liniach pierwotnych, wyizolowanych bezpośrednio od pacjentów [Yeh i in., 2010; Tang i in., 2016; Kim, Moon, 2015; Liu i in., 2013; Zhang J. i in., 2015; Guo i in., 2013]. UA wykazał aktywność antymetastatyczną w modelu przerzutującego raka jelita grubego, ograniczając ilość metastaz w płucach, wątrobie, szpiku czy jelicie cienkim [Xiang i in., 2015; Prasad i in., 2012], raka trzustki, ograniczając ilość wtórnych ognisk w wątrobie i szpiku kostnym [Prasad i in., 2016] czy raka piersi, powodując ograniczenie przerzutowania do płuc [Tang i in., 2016]. Kwas ursolowy wykazał także aktywność wzmocnienia przeciwp przerzutowego działania cytostatyku, zarówno w badaniach *in vitro* w modelu raka jajnika w połączeniu z cis-platyną [Zhang J. i in., 2015], jak i *in vivo* w modelach przerzutujących raka jelita grubego (połączenie z kapecytabiną) lub raka trzustki (w połączeniu z gemcytabiną) [Prasad i in., 2012; Prasad i in., 2016].

5.3. Wpływ substancji na białka i szlaki zaangażowane w progresję nowotworu

W niniejszych badaniach dokonano próby wyjaśnienia mechanizmu odpowiedzialnego za aktywność UA, OA i CPT-11 hamującą migrację komórek nowotworowych. W tym celu, ocenie poddano aktywność związków, podawanych pojedynczo i w połączeniu, na MMP-2 i -9, szlak uPA i jego receptor (uPAR), COX-2 oraz E-kadherynę. Ponadto, dokonano analizy wpływu wariantów substancji na białko zaangażowane w oporność wielolekową (MRP).

5.3.1. Szlak metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej oraz cyklooksygenazy-2

Stężenie i aktywność wydzielanych przez komórki MMP-2 i MMP-9 uległy zmniejszeniu pod wpływem badanych wariantów substancji. Najbardziej korzystne działanie w tym zakresie wykazały OA+CPT-11, UA+OA oraz ALL. Cechowało się ono najwyższą aktywnością ograniczania metaloproteinaz produkowanych i wydzielanych przez komórki nowotworowe i najniższą przez komórki prawidłowe. Świadczy to o synergizmie działania kwasów ursolowego i oleanolowego oraz cytostatyku. Wyniki te zbieżne były z testami migracji. Te same warianty wykazały najsilniejsze zahamowanie migracji komórek nowotworowych, z jednoczesnym słabszym efektem względem komórek prawidłowych.

Mimo, iż stężenie wydzielanych metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej było podobne w przypadku kokultury ze sferoidami obu linii nowotworowych, to ich aktywność istotnie się różniła. Metaloproteiny wydzielane przez kokultury prawidłowego nabłonka jelitowego z komórkami nowotworowymi linii SW 620 wykazały kilkukrotnie większą aktywność, niż te wydzielane przez kokultury z komórkami linii HT-29. Może to świadczyć o wyższym stopniu zaangażowania szlaków aktywacji MMPs w przypadku komórek zdolnych do przerzutowania. Ponadto, wykazano iż stężenie i aktywność wydzielanej MMP-2 oraz jej poziom w komórkach były wyższe, niż w przypadku MMP-9. Jedynie sferoidy HT-29 i SW 620 wykazały wyższą aktywność, lecz niższe stężenie MMP-9. Można zatem przypuszczać, iż komórki nowotworowe w kulturze homogennej przestrzennej wytwarzają w większym stopniu MMP-9, co w organizmie prowadziłoby między

innymi do ściągnięcia komórek o charakterze pronowotworowym w miejsce mikrośrodowiska guza oraz aktywacji szeregu czynników i szlaków zaangażowanych w progresję nowotworu. W przypadku napotkania tkanki prawidłowej, czego odpowiednikiem w przeprowadzonych badaniach *in vitro* była hodowla sferoidów z komórkami prawidłowymi w kokulturze, komórki nowotworowe zaczynają wytwarzać MMP-2 w celu degradacji napotkanej bariery. Zatem wyciągnięto wnioski, iż migracja i inwazja komórek zależna była w większym stopniu od MMP-2, z kolei MMP-9 pełniła w większym stopniu funkcje regulatorowe. Podobną zależność zaobserwowano w przypadku komórek prawidłowych. Wariant UA+CPT-11 istotnie ograniczał stężenie i poziom MMP-9 produkowanej i wydzielanej przez komórki, jednocześnie wykazując najwyższą inhibicję migracji komórek CCD 841 CoTr w metodzie rysy.

Głównym szlakiem regulacji metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej jest układ uPA i jego receptor. Wykazano, iż stężenie uPAR w płynach komórkowych wzrosło. Postawiono zatem hipotezę, iż, jako że uPAR jest receptorem błonowym, to zwiększenie jego stężenia w płynie pochodzonym świadczy o złuszczeniu go, a tym samym negatywnej regulacji szlaku uPA/uPAR przez badanie związku. W celu potwierdzenia tej hipotezy, wykonano analizę lokalizacji i poziomu receptora w komórkach metodą immunofluorescencji. W komórkach prawidłowych najwyższe stężenie uPAR w płynach pozakomórkowych zmierzono po inkubacji z wariantami CPT-11, UA+OA i ALL, natomiast najsilniej poziom receptora obniżały CPT-11 i ALL. Podobna sytuacja nastąpiła w przypadku komórek nowotworowych. Najwyższe stężenie w płynach pozakomórkowych i najniższy poziom na powierzchni komórek odnotowano po inkubacji komórek HT-29 z wariantami UA+OA i ALL oraz UA+OA w przypadku komórek SW 620. Uzyskane wyniki zdają się popierać postawioną hipotezę, wskazującą możliwość złuszczenia receptora uPAR z powierzchni komórek pod wpływem działania badanych związków.

Cyklooksigenaza-2 jest jednym z najważniejszych onkogenów, modulującym procesy proliferacji, stanu zapalnego czy migracji i przerzutowania komórek nowotworowych. Wzrost aktywności tego enzymu związany jest z progresją choroby nowotworowej. Ponadto, cyklooksigenaza-2, jak i jeden z produktów jej aktywności, prostaglandyna E2 (PGE2), mogą promować aktywność MMPs oraz białek oporności wielolekowej [Sobolewski i in., 2010; Greenhough i in., 2009].

Wykonano więc analizę wpływu badanych związków na poziom wewnątrzkomórkowej COX-2. Najwyższą aktywnością wobec komórek nowotworowych wykazały się warianty UA+CPT-11 oraz UA+OA. Ponadto, połączenie kwasu ursolowego z kamptotecyną-11, w przeciwieństwie do połączenia z kwasem oleanolowym, obniżało poziom COX-2 w komórkach prawidłowych. Wzrost ilości COX-2 w komórkach prawidłowych spowodowany może być prozapalnym charakterem tego wariantu, indukował on bowiem wydzielanie NO, IL-1 β i IL-6 oraz zmniejszał IL-10. Wszystkie warianty hamowały wytwarzanie COX-2 w komórkach nowotworowych, przy czym kwasy ursolowy i oleanolowy w połączeniu ze sobą lub z cytostatykiem wzmacniały ten efekt.

Właściwości UA i OA do hamowania COX-2 potwierdzone zostały w licznych publikacjach. Jedinak i wsp. wykazali, iż kwasy ursolowy i oleanolowy zdolne były do hamowania aktywności proteaz, w tym uPA czy katepsyny B, biorącej udział w szlaku aktywacji uPA/uPAR [Jedinak i in., 2006]. Aktywność względem metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej wykazana została także w modelach komórkowych. Kwas ursolowy, podawany pojedynczo lub w połączeniu z kapecytabiną, może hamować MMP-9, VEGF i ekspresję czynnika adhezyjnego ICAM-1 w modelu raka jelita grubego *in vitro* i *in vivo*. Szlakami molekularnymi odpowiedzialnymi za taką aktywność okazały się STAT3 i EGFR [Prasad i in., 2012]. Podobne wyniki uzyskano w 2016 w modelu raka trzustki. W modelach *in vitro* i *in vivo*, UA podawany pojedynczo lub w połączeniu z gemcytabiną ograniczał produkcję MMP-9, ICAM-1 i VEGF oraz COX-2, ograniczając aktywność STAT3 i NF- κ B. Ponadto wykazano, iż UA lub UA+GEM zmniejszał ekspresję miRNA zaangażowanego w progresję nowotworu [Prasad i in., 2016]. UA ograniczał także aktywność szlaku COX-2/PGE2, ERK, oraz PI3K/Akt w komórkach nowotworowych linii SW480 i LoVo [Wang i in., 2013]. Szlak COX-2/PGE2 hamowany był także przez pochodne kwasu oleanolowego w komórkach HT-29 oraz w komórkach linii HCT-116 [Fu i in., 2015; Kim i in., 2014]. Kwas ursolowy wpływał również na COX-2 w modelach innych nowotworów. Wykazano, iż kwas ursolowy już w niskich stężeniach (5 μ M, odpowiadające około 2,3 μ g/ml) powodował inhibicję aktywności MMP-2 i MMP-9 wydzielanych przez komórki raka żołądka linii SNU-484 [Kim, Moon, 2015], a także hamował aktywność MMP-2, MT1-MMP, uPA oraz promował aktywność ich inhibitorów TIMP i PAI-1 w komórkach raka piersi. Szlakiem odpowiedzialnym za taką aktywność był JNK i Akt/mTOR [Yeh i in., 2010].

Badania te potwierdzone zostały przez zespół Tang i wsp., którzy wykazali aktywność kwasu ursolowego obniżającą poziom MMP-2, MMP-9 i COX-2, z jednoczesną promocją E-kadheryny, w komórkach linii MCF-7 i MDA-MB-231. Ponadto, UA w modelu *in vitro* i *in vivo* hamował ekspresję integryn $\alpha 6$ i $\beta 1$ oraz receptora CD44 [Tang i in., 2016]. Białka te zaangażowane mogą być w aktywację białek Rho zależną od MMPs i uPAR.

5.3.2. Białka podrodziny Rho

Poza MMPs, kluczowymi białkami dla migracji komórek są GTP-azy Rho. Uczestniczą one w przekształcaniu cytoszkieletu komórki, dzięki czemu może ona zmieniać kształt, wytwarzać protruzje oraz generować „siłę napędową” do ruchu. Ponadto, białka Rho mogą promować aktywność cyklooksygenazy-2 [Benitah i in., 2003; Lang i in., 2017]. Oceniono zatem wpływ UA, OA i CPT-11 podawanych pojedynczo i w połączeniu na poziom wewnątrzkomórkowych RhoA i RhoC. Wykazano istotny spadek poziomu tych białek w komórkach linii HT-29 i SW 620 z jednoczesnym słabszym lub podwyższającym poziom tych GTP-az w komórkach prawidłowych. Najkorzystniejsze działanie wykazały warianty UA+CPT-11 oraz UA+OA, powodując najsilniejszą inhibicję białek RhoA i RhoC w komórkach nowotworowych i najsilniejszą promocję w komórkach prawidłowych. Wariant UA+CPT-11 hamował MMP-9 w komórkach prawidłowych i jednocześnie najefektywniej hamował migrację komórek w metodzie rysy. W przypadku badania migracji przez porowate membrany (Transwelle) i oceny poziomu białek Rho sytuacja wyglądała odwrotnie. Wariant ten promował lub w nieistotnym stopniu hamował powstawanie białek RhoA i RhoC w komórkach prawidłowych i jednocześnie najslabiej ograniczał migrację przez membrany o średnicy porów 8 i 0,4 μm . Podobne działanie wykazał wariant UA+OA, przy czym migracja komórek przez membrany była wyższa w porównaniu do kontroli.

Badane warianty, w szczególności związków podawanych w połączeniu, wykazały działanie przeciwnowotworowe w ujęciu aktywności względem białka RhoB. Wykazano wzrost jego poziomu w komórkach nowotworowych i spadek w komórkach prawidłowych. Mimo, iż należy ono do tej samej podrodziny co RhoA i RhoC, w przypadku raka jelita grubego wykazuje ono aktywność przeciwnowotworową, między innymi na skutek indukcji apoptozy. Na tej podstawie wyciągnięto wniosek,

iż różnica w aktywności RhoA/RhoC względem RhoB może wynikać z dwóch mechanizmów: 1) jest to wynik niewielkiej różnicy w budowie białek lub 2) jest to skutek aktywności UA/OA w większym stopniu ukierunkowanym na mechanizmy regulacji białek Rho, aniżeli same GTP-azy. Białka RhoA/RhoC i RhoB różnią się przede wszystkim resztami lipidowymi. Wszystkie mogą mieć dołączoną resztę geranylogeranylu, ale tylko RhoB może być modyfikowane dodatkowo resztą farnezyłu lub palmityłu [Vega, Ridley, 2018]. Możliwe jest zatem, iż tak subtelna różnica w budowie jest wystarczająca, aby białka RhoA i RhoC stały się celem dla UA/OA, ale RhoB już nie. Ponadto, różnica w resztach lipidowych skutkuje inną lokalizacją tych białek w komórce [Vega, Ridley, 2018]. Druga hipoteza zakłada odrębność w mechanizmach regulacji RhoA/RhoC i RhoB. Czynniki regulujące RhoB i jednocześnie nie wywierające wpływu na RhoA i/lub RhoC do tej pory nie zostały poznane [Vega, Ridley, 2018]. Możliwe jednak, iż takim punktem regulacji jest białko CD44, receptor błonowy dla kwasu hialuronowego, który indukowany może być także przez MMP-9, a jego indukcja prowadzi, z kolei, do aktywacji białek Rho [Bourguignon i in., 2010; Torre i in., 2010; Chen i in., 2018]. W badaniach Maherally i wsp., wyciszenie genu dla CD44 spowodowało spadek poziomu RhoA i RhoC w większym stopniu, niż RhoB [Maherally i in., 2012].

Wykazano, iż białka Rho lokalizują się wzdłuż włókien F-aktyny. Aktywność białek Rho związana jest z modyfikacją cytoszkieletu aktynowego, zatem lokalizują się one w jego pobliżu. Wykazano wpływ badanych wariantów na strukturę cytoszkieletu aktynowego komórek nowotworowych, co zarejestrowano zarówno jako zmiana morfologii, jak i obniżenie intensywności fluorescencji. Żaden z wariantów nie wykazał destrukcyjnego działania badanych czynników względem szkieletu aktynowego komórek prawidłowych.

Przeprowadzono niewiele badań w kontekście wpływu UA i OA na białka podrodziny Rho. Yeh i wsp. wykazali zdolność kwasu ursolowego do hamowania RhoA w komórkach raka piersi linii MDA-MB-231 [Yeh i in., 2010]. W innych badaniach wykazano hamujący wpływ UA na czynniki pozytywnej regulacji białek Rho: kinazy FAK i Src, integryny $\alpha 6$ i $\beta 1$ czy receptora CD44 w modelach raka wątroby i raka piersi [Xiang i in., 2015; Tang i in., 2016]. UA i OA wykazały także aktywność w stosunku do białek docelowych dla Rho: kinazy ROCK i kofiliny-1 w modelach raka żołądka i raka prostaty [Li i in., 2014; Gai i in., 2016] oraz szlaku YAP/TEAD w modelu raka wątroby [Wang i in., 2019].

Białko RhoB, w zależności od typu nowotworu, może pełnić funkcje pro- lub przeciwnowotworowe. W raku jelita grubego, RhoB jest białkiem o charakterze przeciwnowotworowym, a jedną z głównych jego aktywności jest uczestnictwo w zahamowaniu cyklu komórkowego i indukcji apoptozy, między innymi poprzez indukcję białka p21. Liczne publikacje potwierdzają proapoptotyczne działanie kwasów ursolowego i oleanolowego, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [Shan i in., 2009; Prasad i in., 2012; Wang i in., 2013; Zhang Y. i in., 2018]. Ponadto, Nam i Kim oraz Li i wsp. wykazali, że oprócz zmian poziomu typowych białek zaangażowanych w proces apoptozy (Bcl-2, Bax, kaspazy), kwas oleanolowy powodował istotny wzrost ekspresji białka p21 [Li i in., 2015; Nam, Kim, 2013].

5.3.3. E-kadheryna (CDH1)

Jednym z głównych punktów regulujących nabywanie przez komórki raka zdolności do ruchu, czyli procesu EMT, jest E-kadheryna. Uczestniczy ona także w modulacji wielu szlaków molekularnych związanych z progresją nowotworu. Poddano zatem ocenie wpływ badanych związków na poziom E-kadheryny w komórkach. W większości przypadków nie zaobserwowano znaczących zmian. Jednakże warianty, które w najwyższym stopniu hamowały migrację komórek nowotworowych, wykazały również najsilniejszą promocję E-kadheryny (UA+CPT-11, UA+OA). Samo zwiększenie ekspresji CDH1 nie jest wystarczające, aby odwrócić EMT, jednakże wzrost poziomu tego białka z pewnością wywoła szereg zmian w sygnalingu komórkowym, prowadzących do ograniczenia migracji komórek nowotworowych.

Aktywność kwasów ursolowego i oleanolowego hamującą EMT wykazano w różnych modelach nowotworów. Zademonstrowano aktywność UA indukującą ekspresję E-kadheryny z jednoczesną inhibicją N-kadheryny i wimentyny w modelu raka płuca komórek linii A549. Zjawisko to zależne było od inhibicji białka AEG-1 [Liu i in., 2013]. Kwas ursolowy wykazał podobny potencjał ograniczając ekspresję N-kadheryny, fibronektyny, wimentyny oraz szlaków Twist, Snail i Slug w modelu raka jajnika *in vitro* i wimentyny oraz fibronektyny w modelu *in vivo*. Ponadto, zespół Tang i wsp. wykazał promocję E-kadheryny i PTEN oraz inhibicję EGFR, ERK, integryn i CD44 pod wpływem tego terpenoidu [Zhang Y. i in., 2018; Tang i in., 2016]. Kwas oleanolowy pod tym kątem badany był w modelach glejaka linii U-87 MG i

U-251 MG oraz dwóch linii pierwotnych. Wykazano zdolność OA do promocji CDH1 oraz inhibicji N-kadheryny, wimentyny i szlaku Twist1, co warunkowane było przez wpływ związku na szlaki MAPK, ERK i MEK [Guo i in., 2013].

5.3.4. Białko związane z opornością wielolekową (MRP)

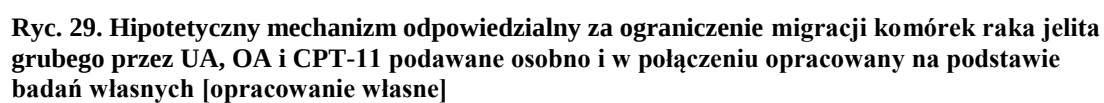
Kwasy ursolowy i oleanolowy wzmacniają aktywność przeciwnowotworową kamptotecyny-11. Postanowiono ocenić, czy wynika to jedynie z synergistycznego lub addytywnego działania związków, czy też dochodzi do ingerencji w szlaki oporności wielolekowej. W tym celu wykonano analizę aktywności UA, OA i CPT-11 na poziom białka MRP. Wykazano, iż w praktycznie wszystkich przypadkach dochodziło do zmniejszenia poziomu tego białka, zarówno w komórkach prawidłowych, jak i nowotworowych. Podanie kwasu ursolowego i/lub oleanolowego w połączeniu z cytostatykiem powodowało obniżenie poziomu MRP, a efekt był silniejszy, niż w przypadku związków podawanych pojedynczo. Ponadto, wariant UA+OA spowodował istotny spadek poziomu białka. Można zatem wnioskować, iż wzmocnienie efektu przeciwnowotworowego cytostatyku przez UA i OA wynika z potencjału antyonkogennego związków, interakcji synergistycznych między kwasami oraz kwasami i kamptotecyną-11, a także z inhibicji systemu zaangażowanego w czynne usuwanie ksenobiotyków z komórki.

Jednym z czynników regulacji białek oporności lekowej jest COX-2. W niniejszych badaniach wykazano, iż warianty UA+CPT-11 i UA+OA najsilniej wpływały na zmniejszenie poziomu zarówno MRP, jak i COX-2 w komórkach linii HT-29 i SW 620. W komórkach prawidłowych takiej zależności nie zaobserwowano.

Liczne badania prowadzone na różnych modelach nowotworów, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*, potwierdzają uzyskane wyniki. Shan i wsp. wykazali zdolność kwasów ursolowego i oleanolowego w modelu raka jelita grubego (SW480 i SW620) do przełamania oporności wielolekowej, zależnej od P-gp, MRP oraz BCRP [Shan i in., 2011]. Wykazali także, iż zahamowanie aktywności P-gp w komórkach linii RKO, SW480 i LoVo przez kwas ursolowy zależne jest od HIF-1 α . Ponadto, UA podawany w połączeniu z 5-fluorouracylem (5-FU) lub cykloheksymidem (CHX) wzmacniał ich aktywność hamującą P-gp, HIF-1 α oraz VEGF, czynników zaangażowanych w lekooporność, proliferację, inhibicję apoptozy, a także progresję nowotworu [Shan i in., 2016b]. Kolejne badania tego zespołu przyniosły dokładniejszy

wgląd w mechanizm działania UA w modelu raka jelita grubego. Naukowcy wykazali, iż związek ten, podawany osobno, jak i w połączeniu z oksaliplatyną (OXL), wzmacniał jej aktywność względem komórek linii RKO, LoVo i SW620, co objawiało się głównie indukcją apoptozy. UA oraz UA+OXL ingerowały także w szereg szlaków molekularnych, przede wszystkim w szlak NF- κ B, MEK/ERK, JNK, p38 czy Akt. Ponadto, połączenie kwasu oleanolowego i oksaliplatyny wzmacniało aktywność obu związków hamującą przebieg szlaków ERK, Akt i NF- κ B w badaniach *in vivo* [Shan i in., 2016a]. Podobną aktywność kwasu ursolowego wykazano w badaniach komórek linii Caco-2. UA powodował zmniejszenie ekspresji genów kodujących P-gp, MRP1, a także enzymów zaangażowanych w inaktywację i usuwanie leków. Ponadto, UA podawany z doksorubicyną lub digitoniną, wzmacniał je na drodze synergizmu [Zhou, Wink, 2018].

Kwasy ursolowy i oleanolowy wykazały efekt wzmocnienia aktywności cytostatyku, kamptotecyny-11. Naukowcy wykazali podobną aktywność w szeregu badań. UA i OA wzmacniały aktywność cis-platyny (rak jajnika, wątroby, przełyku) [Zhang J i in., 2015; Wu i in., 2016; Yamai i in., 2009], 5-fluorouracylu (rak jelita grubego, trzustki, przełyku) [Shan i in., 2016b; Wei i in., 2012; Yamai i in., 2009], oksaliplatyny (rak jelita grubego) [Shan i in., 2016a; Zhang Y. i in., 2018], cykloheksymidu (rak jelita grubego) [Shan i in., 2016b], kapecytabiny (rak jelita grubego) [Prasad i in., 2012], gemcytabiny (rak trzustki) [Prasad i in., 2016] czy kamptotecyny-11 (rak przełyku) [Yamai i in., 2009].



6. Podsumowanie

Kwasy ursolowy i oleanolowy wykazały aktywność przeciwnowotworową. Ich połączenie ze sobą lub z cytostatykiem, kamptotecyną-11, wzmacniało ten efekt. Związki spowodowały spadek proliferacji i migracji komórek nowotworowych oraz wydzielania przez nie cytokin prozapalnych, a także indukcję wydzielania interleukiny przeciwzapalnej. Efekt względem komórek prawidłowych był istotnie słabszy. UA, OA i CPT-11 ingerowały także w szlaki związane z migracją, inwazją i lekoopornością komórek nowotworowych, hamując wytwarzanie metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej i regulującego je szlaku uPA/uPAR, cyklooksygenazy-2, GTP-az Rho oraz białka związanego z opornością wielolekową. Ponadto, promowały one ekspresję E-kadheryny, negatywnego regulatora procesu EMT, prowadzącego do nabycia przez komórki zdolności do ruchu. Wpływ na te białka był słabszy w przypadku komórek prawidłowych. Po podaniu substancji w połączeniu, wykazano także wzmocnienie aktywności względem szlaków związanych z progresją nowotworu, co było wynikiem interakcji synergistycznych. UA i OA działały także ochronnie na komórki prawidłowe przed niekorzystnym wpływem CPT-11. Kwasy ursolowy i oleanolowy posiadają obiecujący potencjał przeciwnowotworowy, w szczególności w zakresie ograniczania migracji komórek. Same kwasy wykazywały właściwości przeciwnowotworowe, a w połączeniu z cytostatykiem wzmacniały jego efekt. Ponadto, ograniczały rolę systemu oporności wielolekowej, który istotnie wpływa na skuteczność stosowanego leczenia.

7. Bibliografia

- [1] <http://www.who.int/cancer/en/> [dostęp: 09/22/2018]
- [2] Adams C., McCarthy H.O., Coulter J.A., Worthington J., Murphy C., Robson T., Hirst D.G. 2009. Nitric oxide synthase gene therapy enhances the toxicity of cisplatin in cancer cells. *The Journal of Gene Medicine*. 11(2): 160–168.
- [3] Affara N.I., Andreu P., Coussens L.M. 2009. Delineating Protease Functions During Cancer Development. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 539: 1–32.
- [4] Agliano A., Calvo A., Box C. 2017. The challenge of targeting cancer stem cells to halt metastasis. *Seminars in Cancer Biology*. 44: 25–42.
- [5] AJCC 2017. AJCC cancer staging manual. 7. Springer International Publishing. New York.
- [6] Ajouz H., Mukherji D., Shamseddine A. 2014. Secondary bile acids: an underrecognized cause of colon cancer. *World Journal of Surgical Oncology*. 12(1): 164.
- [7] Akalay I., Tan T.Z., Kumar P., Janji B., Mami-Chouaib F., Charpy C., Vielh P., Larsen A.K., Thierry J.P., Sabbah M., Chouaib S. 2015. Targeting WNT1-inducible signaling pathway protein 2 alters human breast cancer cell susceptibility to specific lysis through regulation of KLF-4 and miR-7 expression. *Oncogene*. 34(17): 2261–2271.
- [8] Ates G., Vanhaecke T., Rogiers V., Rodrigues R.M. 2017. Assaying Cellular Viability Using the Neutral Red Uptake Assay. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 1601: 19–26.
- [9] Baek S., Lee J., Lee D., Park M., Lee J., Kwok S., Cho M., Park S. 2014. Ursolic acid ameliorates autoimmune arthritis via suppression of Th17 and B cell differentiation. *Acta Pharmacologica Sinica*. 35(9): 1177–1187.
- [10] Barker N., Ridgway R.A., van Es J.H., van de Wetering M., Begthel H., van den Born M., Danenberg E., Clarke A.R., Sansom O.J., Clevers H. 2009. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature*. 457(7229): 608–611.
- [11] Barrett J.C. 1993. Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environmental health perspectives*. 100: 9–20.
- [12] Batson J., Astin J.W., Nobes C.D. 2013. Regulation of contact inhibition of locomotion by Eph-ephrin signalling. *Journal of microscopy*. 251(3): 232–241.
- [13] Benelli R., Venè R., Ferrari N. 2018. Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (cyclooxygenase-2), a complex target for colorectal cancer prevention and therapy. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 196: 42–61.
- [14] Benitah S.A., Valerón P.F., Lacal J.C. 2003. ROCK and Nuclear Factor- κ B-dependent Activation of Cyclooxygenase-2 by Rho GTPases: Effects on Tumor Growth and Therapeutic Consequences. *Molecular Biology of the Cell*. 14(7): 3041–3054.
- [15] Berretta M., Alessandrini L., De Divitiis C., Nasti G., Lleshi A., Di Francia R., Facchini G., Cavaliere C., Buonerba C., Canzonieri V. 2017. Serum and tissue markers in colorectal cancer: State of art. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 111: 103–116.
- [16] Bhullar K.S., Lagarón N.O., McGowan E.M., Parmar I., Jha A., Hubbard B.P., Rupasinghe H.P.V. 2018. Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions. *Molecular Cancer*. 17(1): 48.
- [17] Blagodatski A., Yatsunskaya M., Mikhailova V., Tiasto V., Kagansky A., Katanaev V.L. 2018. Medicinal mushrooms as an attractive new source of natural compounds for future cancer therapy. *Oncotarget*. 9(49): 29259–29274.
- [18] Blazejczyk A., Papiernik D., Porshneva K., Sadowska J., Wietrzyk J. 2015. Endothelium and cancer metastasis: Perspectives for antimetastatic therapy. *Pharmacological Reports*. 67(4): 711–718.
- [19] Borenfreund E., Puerner J.A. 1985. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *Journal of Tissue Culture Methods*. 9(1): 7–9.
- [20] Botelho M.C., Veiga I., Oliveira P.A., Lopes C., Teixeira M., da Costa J.M.C., Machado J.C. 2013. Carcinogenic ability of *Schistosoma haematobium* possibly through oncogenic mutation of KRAS gene. *Advances in cancer: research & treatment*. 2013:
- [21] Bourguignon L.Y.W., Wong G., Earle C., Krueger K., Spevak C.C. 2010. Hyaluronan-CD44 interaction promotes c-Src-mediated twist signaling, microRNA-10b expression, and RhoA/RhoC up-regulation, leading to Rho-kinase-associated cytoskeleton activation and breast tumor cell invasion. *The Journal of biological chemistry*. 285(47): 36721–36735.
- [22] Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 68(6): 394–424.

- [23] Brenner D.R., Scherer D., Muir K., Schildkraut J., Boffetta P., Spitz M.R., Le Marchand L., Chan A.T., Goode E.L., Ulrich C.M., Hung R.J. 2014. A Review of the Application of Inflammatory Biomarkers in Epidemiologic Cancer Research. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 23(9): 1729–1751.
- [24] Brooks S.A., Lomax-Browne H.J., Carter T.M., Kinch C.E., Hall D.M.S. 2010. Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta Histochemica*. 112(1): 3–25.
- [25] Brown J.S., Banerji U. 2017. Maximising the potential of AKT inhibitors as anti-cancer treatments. *Pharmacology & Therapeutics*. 172: 101–115.
- [26] Burridge K., Guilluy C. 2016. Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension. *Experimental Cell Research*. 343(1): 14–20.
- [27] Butera G., Pacchiana R., Donadelli M. 2018. Autocrine mechanisms of cancer chemoresistance. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 78: 3–12.
- [28] Campbell M.J., Trump D.L. 2017. Vitamin D Receptor Signaling and Cancer. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 46(4): 1009–1038.
- [29] Cathcart J., Pulkoski-Gross A., Cao J. 2015. Targeting matrix metalloproteinases in cancer: Bringing new life to old ideas. *Genes & Diseases*. 2(1): 26–34.
- [30] Chapin J.C., Hajjar K.A. 2015. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Reviews*. 29(1): 17–24.
- [31] Chazotte B. 2010. Labeling cytoskeletal F-actin with rhodamine phalloidin or fluorescein phalloidin for imaging. *Cold Spring Harbor protocols*. 2010(5): pdb.prot4947.
- [32] Checker R., Sandur S.K., Sharma D., Patwardhan R.S., Jayakumar S., Kohli V., Sethi G., Aggarwal B.B., Sainis K.B. 2012. Potent anti-inflammatory activity of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, is mediated through suppression of NF- κ B, AP-1 and NF-AT. *PloS one*. 7(2): e31318.
- [33] Chen C., Zhao S., Karnad A., Freeman J.W. 2018. The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. *Journal of Hematology & Oncology*. 11(1): 64.
- [34] Chen J., Pitmon E., Wang K. 2017. Microbiome, inflammation and colorectal cancer. *Seminars in Immunology*. 32: 43–53.
- [35] Chiavenna S.M., Jaworski J.P., Vendrell A. 2017. State of the art in anti-cancer mAbs. *Journal of Biomedical Science*. 24(1): 15.
- [36] Chun J., Lee C., Hwang S.W., Im J.P., Kim J.S. 2014. Ursolic acid inhibits nuclear factor- κ B signaling in intestinal epithelial cells and macrophages, and attenuates experimental colitis in mice. *Life Sciences*. 110(1): 23–34.
- [37] Chung P., Cook T., Liu K., Vodovotz Y., Zamora R., Finkelstein S., Billiar T., Blumberg D. 2003. Overexpression of the human inducible nitric oxide synthase gene enhances radiation-induced apoptosis in colorectal cancer cells via a caspase-dependent mechanism. *Nitric oxide: biology and chemistry*. 8(2): 119–126.
- [38] Ciurea M., Georgescu A., Purcaru S., Artene S.-A., Emami G., Boldeanu M., Tache D., Dricu A. 2014. Cancer Stem Cells: Biological Functions and Therapeutically Targeting. *International Journal of Molecular Sciences*. 15(5): 8169–8185.
- [39] Collier L., Oxford J., Łuczak M., Wróblewska M.M. 2001. *Wirusologia : podręcznik dla studentów medycyny, stomatologii i mikrobiologii*. Wyd. 2 pop. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa.
- [40] Corpet D.E. 2011. Red meat and colon cancer: Should we become vegetarians, or can we make meat safer? *Meat Science*. 89(3): 310–316.
- [41] Croce C.M. 2008. Oncogenes and Cancer. *New England Journal of Medicine*. 358(5): 502–511.
- [42] Croft D.R., Olson M.F. 2011. Transcriptional regulation of Rho GTPase signaling. *Transcription*. 2(5): 211–215.
- [43] Cui N., Hu M., Khalil R.A. 2017. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 147: 1–73.
- [44] Dalla Pozza E., Forciniti S., Palmieri M., Dando I. 2018. Secreted molecules inducing epithelial-to-mesenchymal transition in cancer development. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 78: 62–72.
- [45] Das V., Kalita J., Pal M. 2017. Predictive and prognostic biomarkers in colorectal cancer: A systematic review of recent advances and challenges. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 87: 8–19.
- [46] de Man F.M., Goey A.K.L., van Schaik R.H.N., Mathijssen R.H.J., Bins S. 2018. Individualization of Irinotecan Treatment: A Review of Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Pharmacogenetics. *Clinical Pharmacokinetics*. 57(10): 1229–1254.

- [47] De Silva D.D., Rapior S., Fons F., Bahkali A.H., Hyde K.D. 2012. Medicinal mushrooms in supportive cancer therapies: an approach to anti-cancer effects and putative mechanisms of action. *Fungal Diversity*. 55(1): 1–35.
- [48] do Nascimento P.G.G., Lemos T.L.G., Bizerra A., Arriaga Â., Ferreira D.A., Santiago G.M.P., Braz-Filho R., Costa J.G.M. 2014. Antibacterial and antioxidant activities of ursolic acid and derivatives. *Molecules*. 19(1): 1317–1327.
- [49] Domenichini A., Adamska A., Falasca M. 2019. ABC transporters as cancer drivers: Potential functions in cancer development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1863(1): 52–60.
- [50] Dominguez C., David J.M., Palena C. 2017. Epithelial-mesenchymal transition and inflammation at the site of the primary tumor. *Seminars in Cancer Biology*. 47: 177–184.
- [51] Donaldson J.G. 2015. Immunofluorescence Staining. *Current Protocols in Cell Biology*. 69: 4.3.1-4.3.7.
- [52] Dondajewska E., Suchorska W. 2011. Hypoxia-inducible factor as a transcriptional factor regulating gene expression in cancer cells. *Współczesna Onkologia*. 4(4): 234–239.
- [53] Du Z., Lovly C.M. 2018. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Molecular Cancer*. 17(1): 58.
- [54] ElBakri A., Nelson P.N., Abu Odeh R.O. 2010. The state of antibody therapy. *Human Immunology*. 71(12): 1243–1250.
- [55] Er T.-K., Bujanda L., Rodrigo M., Herreros-Villanueva M. 2015. Pharmacogenomic biomarkers for colorectal cancer treatment. *Cancer Treatment Communications*. 4: 121–127.
- [56] Espinosa E., Zamora P., Feliu J., González Barón M. 2003. Classification of anticancer drugs--a new system based on therapeutic targets. *Cancer treatment reviews*. 29(6): 515–523.
- [57] Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I., Dyba T., Randi G., Bettio M., Gavin A., Visser O., Bray F. 2018. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *European Journal of Cancer*. 103: 356–387.
- [58] Ferrer-Mayorga G., Larriba M.J., Crespo P., Muñoz A. 2019. Mechanisms of action of vitamin D in colon cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 185: 1–6.
- [59] Figueiredo L., Régis W.C.B. 2017. Medicinal mushrooms in adjuvant cancer therapies: an approach to anticancer effects and presumed mechanisms of action. *Nutrire*. 42(1): 28.
- [60] Fletcher J.I., Williams R.T., Henderson M.J., Norris M.D., Haber M. 2016. ABC transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology. *Drug Resistance Updates*. 26: 1–9.
- [61] Fontanay S., Grare M., Mayer J., Finance C., Duval R.E. 2008. Ursolic, oleanolic and betulinic acids: Antibacterial spectra and selectivity indexes. *Journal of Ethnopharmacology*. 120(2): 272–276.
- [62] Fougère B., Boulanger E., Nourhashémi F., Guyonnet S., Cesari M. 2016. Chronic Inflammation: Accelerator of Biological Aging. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 72(9): glw240.
- [63] Franken N.A.P., Rodermond H.M., Stap J., Haveman J., van Bree C. 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*. 1(5): 2315–2319.
- [64] Friedl P., Alexander S. 2011. Cancer Invasion and the Microenvironment: Plasticity and Reciprocity. *Cell*. 147(5): 992–1009.
- [65] Fu J., Zou Y., Huang Z., Yan C., Zhou Q., Zhang H., Lai Y., Peng S., Zhang Y. 2015. Identification of nitric oxide-releasing derivatives of oleanolic acid as potential anti-colon cancer agents. *RSC Advances*. 5(25): 19445–19454.
- [66] Fuxe J., Karlsson M.C.I. 2012. TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition: A link between cancer and inflammation. *Seminars in Cancer Biology*. 22(5–6): 455–461.
- [67] Gaffney J., Solomonov I., Zehorai E., Sagi I. 2015. Multilevel regulation of matrix metalloproteinases in tissue homeostasis indicates their molecular specificity in vivo. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 44–46: 191–199.
- [68] Gai W.-T., Yu D.-P., Wang X.-S., Wang P.-T. 2016. Anti-cancer effect of ursolic acid activates apoptosis through ROCK/PTEN mediated mitochondrial translocation of cofilin-1 in prostate cancer. *Oncology Letters*. 12(4): 2880–2885.
- [69] Geiger T.R., Peeper D.S. 2009. Metastasis mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 1796(2): 293–308.
- [70] Gialeli C., Theocharis A.D., Karamanos N.K. 2011. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS Journal*. 278(1): 16–27.
- [71] Gołąb J., Jakóbsiak M., Lasek W., Stokłosa T. 2015. *Immunologia*. 6 ed. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa.

- [72] Gong L., Thorn C.F., Bertagnolli M.M., Grosser T., Altman R.B., Klein T.E. 2012. Celecoxib pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenetics and genomics*. 22(4): 310–318.
- [73] Gould C.M., Courtneidge S.A. 2014. Regulation of invadopodia by the tumor microenvironment. *Cell Adhesion and Migration*. 8(3): 226–235.
- [74] Greenhough A., Smartt H.J.M., Moore A.E., Roberts H.R., Williams A.C., Paraskeva C., Kaidi A. 2009. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*. 30(3): 377–386.
- [75] Guan X. 2015. Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 5(5): 402–418.
- [76] Guerra F., Arbini A.A., Moro L. 2017. Mitochondria and cancer chemoresistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1858(8): 686–699.
- [77] Guicciardi M.E., Gores G.J. 2009. Life and death by death receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 23(6): 1625–1637.
- [78] Guo G., Yao W., Zhang Q., Bo Y. 2013. Oleanolic Acid Suppresses Migration and Invasion of Malignant Glioma Cells by Inactivating MAPK/ERK Signaling Pathway. *PLoS ONE*. 8(8): e72079.
- [79] Guo Y., Han B., Luo K., Ren Z., Cai L., Sun L. 2017. NOX2-ROS-HIF-1 α signaling is critical for the inhibitory effect of oleanolic acid on rectal cancer cell proliferation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 85: 733–739.
- [80] Gustavsson B., Carlsson G., Machover D., Petrelli N., Roth A., Schmoll H.-J., Tveit K.-M., Gibson F. 2015. A review of the evolution of systemic chemotherapy in the management of colorectal cancer. *Clinical colorectal cancer*. 14(1): 1–10.
- [81] Gutiérrez-Rebolledo G.A., Siordia-Reyes A.G., Meckes-Fischer M., Jiménez-Arellanes A. 2016. Hepatoprotective properties of oleanolic and ursolic acids in antitubercular drug-induced liver damage. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 9(7): 644–651.
- [82] Hadler-Olsen E., Winberg J.-O., Uhlin-Hansen L. 2013. Matrix metalloproteinases in cancer: their value as diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets. *Tumor Biology*. 34(4): 2041–2051.
- [83] Hagggar F., Boushey R. 2009. Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*. 22(4): 191–197.
- [84] Han N., Bakovic M. 2015. Biologically active triterpenoids and their cardioprotective and anti-inflammatory effects. *J Bioanal Biomed S*. 12(5): 1945–1948.
- [85] Hanahan D., Weinberg R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144(5): 646–674.
- [86] Hanna S., El-Sibai M. 2013. Signaling networks of Rho GTPases in cell motility. *Cellular Signalling*. 25(10): 1955–1961.
- [87] Helmus D.S., Thompson C.L., Zelenskiy S., Tucker T.C., Li L. 2013. Red Meat-Derived Heterocyclic Amines Increase Risk of Colon Cancer: A Population-Based Case-Control Study. *Nutrition and Cancer*. 65(8): 1141–1150.
- [88] Herszényi L., Hritz I., Lakatos G., Varga M.Z., Tulassay Z. 2012. The behavior of matrix metalloproteinases and their inhibitors in colorectal cancer. *International journal of molecular sciences*. 13(10): 13240–13263.
- [89] Hoesel B., Schmid J.A. 2013. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Molecular Cancer*. 12(1): 86.
- [90] Houthuijzen J.M., Daenen L.G.M., Roodhart J.M.L., Oosterom I., van Jaarsveld M.T.M., Govaert K.M., Smith M.E., Sadatmand S.J., Rosing H., Kruse F., Helms B.J., van Rooijen N., Beijnen J.H., Haribabu B., van de Lest C.H.A., Voest E.E. 2014. Lysophospholipids secreted by splenic macrophages induce chemotherapy resistance via interference with the DNA damage response. *Nature Communications*. 5(1): 5275.
- [91] Hu T., Li Z., Gao C.-Y., Cho C.H. 2016. Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies. *World journal of gastroenterology*. 22(30): 6876–6889.
- [92] Hu X., Beeton C. 2010. Detection of Functional Matrix Metalloproteinases by Zymography. *Journal of Visualized Experiments*. (45):
- [93] Hulkower K.I., Herber R.L. 2011. Cell Migration and Invasion Assays as Tools for Drug Discovery. *Pharmaceutics*. 3(1): 107.
- [94] Ikeda Y., Murakami A., Fujimura Y., Tachibana H., Yamada K., Masuda D., Hirano K., Yamashita S., Ohigashi H. 2007. Aggregated Ursolic Acid, a Natural Triterpenoid, Induces IL-

- 1 β Release from Murine Peritoneal Macrophages: Role of CD36. *The Journal of Immunology*. 178(8): 4854–4864.
- [95] Iqbal W., Alkarim S., AlHejin A., Mukhtar H., Saini K.S. 2016. Targeting signal transduction pathways of cancer stem cells for therapeutic opportunities of metastasis. *Oncotarget*. 7(46): 76337–76353.
- [96] Isaacson K.J., Martin Jensen M., Subrahmanyam N.B., Ghandehari H. 2017. Matrix-metalloproteinases as targets for controlled delivery in cancer: An analysis of upregulation and expression. *Journal of Controlled Release*. 259: 62–75.
- [97] Ishikawa T., dos Santos Donatini R., Diaz I.E.C., Yoshida M., Bacchi E.M., Kato E.T.M. 2008. Evaluation of gastroprotective activity of *Plinia edulis* (Vell.) Sobral (Myrtaceae) leaves in rats. *Journal of ethnopharmacology*. 118(3): 527–529.
- [98] Jaiswal R.K., Varshney A.K., Yadava P.K. 2018. Diversity and functional evolution of the plasminogen activator system. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 98: 886–898.
- [99] Jang S.-E., Jeong J.-J., Hyam S.R., Han M.J., Kim D.-H. 2014. Ursolic Acid Isolated from the Seed of *Cornus officinalis* Ameliorates Colitis in Mice by Inhibiting the Binding of Lipopolysaccharide to Toll-like Receptor 4 on Macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62(40): 9711–9721.
- [100] Jang S.-M., Yee S.-T., Choi J., Choi M.-S., Do G.-M., Jeon S.-M., Yeo J., Kim M.-J., Seo K.-I., Lee M.-K. 2009. Ursolic acid enhances the cellular immune system and pancreatic β -cell function in streptozotocin-induced diabetic mice fed a high-fat diet. *International immunopharmacology*. 9(1): 113–119.
- [101] Jansen S., Gosens R., Wieland T., Schmidt M. 2018. Paving the Rho in cancer metastasis: Rho GTPases and beyond. *Pharmacology & Therapeutics*. 183: 1–21.
- [102] Jedinák A., Mucková M., Kost'álová D., Maliar T., Masterova I. 2006. Antiprotease and antimetastatic activity of ursolic acid isolated from *Salvia officinalis*. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences*. 61(11–12): 777–782.
- [103] Jiang W.G., Sanders A.J., Katoh M., Ungefroren H., Gieseler F., Prince M., Thompson S.K., Zollo M., Spano D., Dhawan P., Sliva D., Subbarayan P.R., Sarkar M., Honoki K., Fujii H., Georgakilas A.G., Amedei A., Niccolai E., Amin A., Ashraf S.S., Ye L., Helferich W.G., Yang X., Boosani C.S., Guha G., Ciriolo M.R., Aquilano K., Chen S., Azmi A.S., Keith W.N., Bilslund A., Bhakta D., Halicka D., Nowsheen S., Pantano F., Santini D. 2015. Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. *Seminars in Cancer Biology*. 35: S244–S275.
- [104] Jonkman J.E.N., Cathcart J.A., Xu F., Bartolini M.E., Amon J.E., Stevens K.M., Colarusso P. 2014. An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell Adhesion & Migration*. 8(5): 440–451.
- [105] Jung T.-Y., Pham T.N.N., Umeyama A., Shoji N., Hashimoto T., Lee J.-J., Takei M. 2010. Ursolic acid isolated from *Uncaria rhynchophylla* activates human dendritic cells via TLR2 and/or TLR4 and induces the production of IFN- γ by CD4⁺ naïve T cells. *European journal of pharmacology*. 643(2): 297–303.
- [106] Kaleta-Richter M., Kawczyk-Krupka A., Aebischer D., Bartusik-Aebischer D., Czuba Z., Cieślak G. 2019. The capability and potential of new forms of personalized colon cancer treatment: Immunotherapy and Photodynamic Therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 25: 253–258.
- [107] Karlsson R., Pedersen E.D., Wang Z., Brakebusch C. 2009. Rho GTPase function in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 1796(2): 91–98.
- [108] Kato Y., Ozawa S., Miyamoto C., Maehata Y., Suzuki A., Maeda T., Yuh B. 2013. Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell International*. 13: 89.
- [109] Kessenbrock K., Plaks V., Werb Z. 2010. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 141(1): 52–67.
- [110] Kessenbrock K., Wang C.-Y., Werb Z. 2015. Matrix metalloproteinases in stem cell regulation and cancer. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 44–46: 184–190.
- [111] Kheirlesei E.A.H., Miller N., Kerin M.J. 2013. Molecular biology of colorectal cancer: Review of the literature. *American Journal of Molecular Biology*. 3(2): 72–80.
- [112] Kim E.-S., Moon A. 2015. Ursolic acid inhibits the invasive phenotype of SNU-484 human gastric cancer cells. *Oncology letters*. 9(2): 897–902.
- [113] Kim S.-M., Jeong I.H., Yim M.S., Chae M.K., Kim H.N., Kim D.K., Kang C.M., Choe Y.S., Lee C., Ryu E.K. 2014. Characterization of oleanolic acid derivative for colon cancer targeting with positron emission tomography. *Journal of Drug Targeting*. 22(3): 191–199.

- [114] Klimaszewska A., Stenzel A., Nowak J.M., Grzanka A. 2011. Białka Rho – kluczowe regulatory cytoszkieletu w przebiegu mitozy i cytokinezy. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 65: 704–713.
- [115] Kong L., Li S., Liao Q., Zhang Y., Sun R., Zhu X., Zhang Q., Wang J., Wu X., Fang X., others 2013. Oleanolic acid and ursolic acid: novel hepatitis C virus antivirals that inhibit NS5B activity. *Antiviral research*. 98(1): 44–53.
- [116] Kordek R., Jassem J., Jeziorski A., Kornafel J., Krzakowski M., Pawłęga J. 2007. *Onkologia : podręcznik dla studentów i lekarzy*. 3 ed. Via Medica. Gdańsk.
- [117] Korzyńska A., Zychowicz M. 2008. A Method of Estimation of the Cell Doubling Time on Basis of the Cell Culture Monitoring Data. *Biocybernetics and Biomedical Engineering*. 28(4): 75–82.
- [118] Krstic J., Santibanez J.F. 2014. Transforming growth factor-beta and matrix metalloproteinases: Functional Interactions in Tumor Stroma-Infiltrating Myeloid Cells. *The Scientific World Journal*. 2014: 1–14.
- [119] Kryczka J., Boncela J. 2018. Cell Migration Related to MDR—Another Impediment to Effective Chemotherapy? *Molecules*. 23(2): 331.
- [120] Kudo-Saito C., Shirako H., Takeuchi T., Kawakami Y. 2009. Cancer Metastasis Is Accelerated through Immunosuppression during Snail-Induced EMT of Cancer Cells. *Cancer Cell*. 15: 195–206.
- [121] Kuipers E.J., Grady W.M., Lieberman D., Seufferlein T., Sung J.J., Boelens P.G., van de Velde C.J.H., Watanabe T. 2015. Colorectal cancer. *Nature Reviews Disease Primers*. 1: 15065.
- [122] Kumar S., Kashyap P. 2015. Antiproliferative activity and nitric oxide production of a methanolic extract of *Fraxinus micrantha* on Michigan Cancer Foundation-7 mammalian breast carcinoma cell line. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*. 4(2): 109.
- [123] Kunkel S.D., Elmore C.J., Bongers K.S., Ebert S.M., Fox D.K., Dyle M.C., Bullard S.A., Adams C.M. 2012. Ursolic acid increases skeletal muscle and brown fat and decreases diet-induced obesity, glucose intolerance and fatty liver disease. *PloS one*. 7(6): e39332.
- [124] Kupai K., Szucs G., Cseh S., Hajdu I., Csonka C., Csont T., Ferdinandy P. 2010. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 61(2): 205–209.
- [125] Kurek A., Nadkowska P., Pliszka S., Wolska K.I. 2012. Modulation of antibiotic resistance in bacterial pathogens by oleanolic acid and ursolic acid. *Phytomedicine*. 19(6): 515–519.
- [126] Kurien B., Scofield R. 2006. Western blotting. *Methods*. 38(4): 283–293.
- [127] Labuschagne C.F., Zani F., Vousden K.H. 2018. Control of metabolism by p53-Cancer and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 1870: 32–42.
- [128] Lang S., Busch H., Boerries M., Brummer T., Timme S., Lassmann S., Aktories K., Schmidt G. 2017. Specific role of RhoC in tumor invasion and metastasis. *Oncotarget*. 8(50): 87364–87378.
- [129] Lathia J.D., Liu H. 2017. Overview of Cancer Stem Cells and Stemness for Community Oncologists. *Targeted Oncology*. 12(4): 387–399.
- [130] Li F., Jiang T., Li Q., Ling X. 2017. Camptothecin (CPT) and its derivatives are known to target topoisomerase I (Top1) as their mechanism of action: did we miss something in CPT analogue molecular targets for treating human disease such as cancer? *American journal of cancer research*. 7(12): 2350–2394.
- [131] Li L., Li W. 2015. Epithelial–mesenchymal transition in human cancer: Comprehensive reprogramming of metabolism, epigenetics, and differentiation. *Pharmacology & Therapeutics*. 150: 33–46.
- [132] Li L., Wei L., Shen A., Chu J., Lin J., Peng J. 2015. Oleanolic acid modulates multiple intracellular targets to inhibit colorectal cancer growth. *International journal of oncology*. 47(6): 2247–2254.
- [133] Li R., Wang X., Zhang X.-H., Chen H.-H., Liu Y.-D. 2014. Ursolic acid promotes apoptosis of SGC-7901 gastric cancer cells through ROCK/PTEN mediated mitochondrial translocation of cofilin-1. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 15(22): 9593–9597.
- [134] Li S., Wei X., He J., Tian X., Yuan S., Sun L. 2018. Plasminogen activator inhibitor-1 in cancer research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 105: 83–94.
- [135] Li W., Zhang H., Assaraf Y.G., Zhao K., Xu X., Xie J., Yang D.-H., Chen Z.-S. 2016. Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: Molecular mechanisms and novel therapeutic drug strategies. *Drug Resistance Updates*. 27: 14–29.

- [136] Lin J., Chen Y., Wei L., Shen A., Sferra T.J., Hong Z., Peng J. 2013. Ursolic acid promotes colorectal cancer cell apoptosis and inhibits cell proliferation via modulation of multiple signaling pathways. *International journal of oncology*. 43(4): 1235–1243.
- [137] Liu B., Qu L., Yan S. 2015. Cyclooxygenase-2 promotes tumor growth and suppresses tumor immunity. *Cancer Cell International*. 15(1): 106.
- [138] Liu K., Guo L., Miao L., Bao W., Yang J., Li X., Xi T., Zhao W. 2013. Ursolic acid inhibits epithelial–mesenchymal transition by suppressing the expression of astrocyte-elevated gene-1 in human nonsmall cell lung cancer A549 cells. *Anti-Cancer Drugs*. 24(5): 494–503.
- [139] Liu Y., Sun H., Hu M., Zhang Y., Chen S., Tighe S., Zhu Y. 2017. The Role of Cyclooxygenase-2 in Colorectal Carcinogenesis. *Clinical colorectal cancer*. 16(3): 165–172.
- [140] Lőrincz A., Mihály J., Németh C., Wacha A., Bóta A. 2015. Effects of ursolic acid on the structural and morphological behaviours of dipalmitoyl lecithin vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1848(5): 1092–1098.
- [141] Lu J., Zheng Y.-L., Wu D.-M., Luo L., Sun D.-X., Shan Q. 2007. Ursolic acid ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage in the brain of senescent mice induced by D-galactose. *Biochemical pharmacology*. 74(7): 1078–1090.
- [142] Lynch C.C., Vargo-Gogola T., Matrisian L.M., Fingleton B. 2010. Cleavage of E-Cadherin by Matrix Metalloproteinase-7 Promotes Cellular Proliferation in Nontransformed Cell Lines via Activation of RhoA. *Journal of oncology*. 2010: 530745.
- [143] Machado D.G., Neis V.B., Balen G.O., Colla A., Cunha M.P., Dalmarco J.B., Pizzolatti M.G., Prediger R.D., Rodrigues A.L.S. 2012. Antidepressant-like effect of ursolic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. in mice: evidence for the involvement of the dopaminergic system. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 103(2): 204–211.
- [144] Maeng H.-J., Lee W.-J., Jin Q.-R., Chang J.-E., Shim W.-S. 2014. Upregulation of COX-2 in the lung cancer promotes overexpression of multidrug resistance protein 4 (MRP4) via PGE2-dependent pathway. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 62: 189–196.
- [145] Maheraly Z., Smith J.R., An Q., Pilkington G.J. 2012. Receptors for Hyaluronic Acid and Poliovirus: A Combinatorial Role in Glioma Invasion? *PLoS ONE*. 7(2): e30691.
- [146] Mahmood T., Yang P.-C. 2012. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*. 4(9): 429–434.
- [147] Malhotra V., Perry M.C. 2003. Classical Chemotherapy: Mechanisms, Toxicities and the Therapeutic Window. *Cancer Biology & Therapy*. 2(sup1): 1–3.
- [148] Malinova T.S., Huveneers S. 2018. Sensing of Cytoskeletal Forces by Asymmetric Adherens Junctions. *Trends in cell biology*. 28(4): 328–341.
- [149] Malvezzi M., Carioli G., Bertuccio P., Boffetta P., Levi F., La Vecchia C., Negri E. 2017. European cancer mortality predictions for the year 2017, with focus on lung cancer. *Annals of Oncology*. 28(5): 1117–1123.
- [150] Markowitz S.D., Bertagnolli M.M. 2009. Molecular Basis of Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*. 361(25): 2449–2460.
- [151] Martino E., Della Volpe S., Terribile E., Benetti E., Sakaj M., Centamore A., Sala A., Collina S. 2017. The long story of camptothecin: From traditional medicine to drugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 27(4): 701–707.
- [152] Mason S.D., Joyce J.A. 2011. Proteolytic networks in cancer. *Trends in cell biology*. 21(4): 228–237.
- [153] Masson N., Ratcliffe P.J. 2014. Hypoxia signaling pathways in cancer metabolism: the importance of co-selecting interconnected physiological pathways. *Cancer & Metabolism*. 2: 3.
- [154] Mathijssen R.H., van Alphen R.J., Verweij J., Loos W.J., Nooter K., Stoter G., Sparreboom A. 2001. Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 7(8): 2182–2194.
- [155] Melzer C., Yang Y., Hass R. 2016. Interaction of MSC with tumor cells. *Cell Communication and Signaling*. 14: 20.
- [156] Mokhtari R.B., Homayouni T.S., Baluch N., Morgatskaya E., Kumar S., Das B., Yeger H. 2017. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*. 8(23): 38022–38043.
- [157] Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 65(1–2): 55–63.
- [158] Mustafa M., Menon J., Muniandy R.K., Illzam E.L., Shah M.J., Sharifa A.M. 2016. Colorectal Cancer: Pathogenesis, Management and Prevention. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences (IOSR-JDMS) e-ISSN*. 15(5): 94–100.

- [159] Muz B., De La Puente P., Azab F., Azab A.K. 2015. Hypoxia Dovepress The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy.
- [160] Na H.-K., Lee J.Y. 2017. Molecular Basis of Alcohol-Related Gastric and Colon Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(6): 1116.
- [161] Naci D., Vuori K., Aoudjit F. 2015. Alpha2beta1 integrin in cancer development and chemoresistance. *Seminars in Cancer Biology*. 35: 145–153.
- [162] Nam H., Kim M.-M. 2013. Ursolic acid induces apoptosis of SW480 cells via p53 activation. *Food and chemical toxicology*. 62: 579–583.
- [163] Namee N.M., O'Driscoll L. 2018. Extracellular vesicles and anti-cancer drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 1870(2): 123–136.
- [164] Noman M.Z., Hasmim M., Messai Y., Terry S., Kieda C., Janji B., Chouaib S. 2015. Hypoxia: a key player in antitumor immune response. A Review in the Theme: Cellular Responses to Hypoxia. *American journal of physiology. Cell physiology*. 309(9): C569-79.
- [165] O'Neill A.M., Burrington C.M., Gillaspie E.A., Lynch D.T., Horsman M.J., Greene M.W. 2016. High-fat Western diet-induced obesity contributes to increased tumor growth in mouse models of human colon cancer. *Nutrition Research*. 36(12): 1325–1334.
- [166] Ogino S., Kirkner G.J., Nosho K., Irahara N., Kure S., Shima K., Hazra A., Chan A.T., Dehari R., Giovannucci E.L., Fuchs C.S. 2008. Cyclooxygenase-2 Expression Is an Independent Predictor of Poor Prognosis in Colon Cancer. *Clinical Cancer Research*. 14(24): 8221–8227.
- [167] Oostindjer M., Alexander J., Amdam G. V., Andersen G., Bryan N.S., Chen D., Corpet D.E., De Smet S., Dragsted L.O., Haug A., Karlsson A.H., Kleter G., de Kok T.M., Kulseng B., Milkowski A.L., Martin R.J., Pajari A.-M., Paulsen J.E., Pickova J., Rudi K., Sødning M., Weed D.L., Egeland B. 2014. The role of red and processed meat in colorectal cancer development: a perspective. *Meat Science*. 97(4): 583–596.
- [168] Oprean C., Mioc M., Csányi E., Ambrus R., Bojin F., Tatu C., Cristea M., Ivan A., Danciu C., Dehelean C., Paunescu V., Soica C. 2016. Improvement of ursolic and oleanolic acids' antitumor activity by complexation with hydrophilic cyclodextrins. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 83: 1095–1104.
- [169] Orgaz J.L., Pandya P., Dalmeida R., Karagiannis P., Sanchez-Laorden B., Viros A., Albregues J., Nestle F.O., Ridley A.J., Gaggioli C., Marais R., Karagiannis S.N., Sanz-Moreno V. 2014. Diverse matrix metalloproteinase functions regulate cancer amoeboid migration. *Nature Communications*. 5(1): 4255.
- [170] Otrock Z.K., Hatoum H.A., Awada A.H., Ishak R.S., Shamseddine A.I. 2009. Hypoxia-inducible factor in cancer angiogenesis: Structure, regulation and clinical perspectives. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 70: 93–102.
- [171] Parmar S.P., Sharma T., Airao V., Bhatt R., Aghara R., Chavda S., Rabadiya S., Gangwal A. 2013. Neuropharmacological effects of triterpenoids. *Phytopharmacology*. 4(2): 354–372.
- [172] Pathania S., Bhatia R., Baldi A., Singh R., Rawal R.K. 2018. Drug metabolizing enzymes and their inhibitors' role in cancer resistance. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 105: 53–65.
- [173] Pellegrin S., Mellor H. 2007. Actin stress fibres. *Journal of Cell Science*. 120(20): 3491–3499.
- [174] Phung C.D., Nguyen H.T., Tran T.H., Choi H.-G., Yong C.S., Kim J.O. 2019. Rational combination immunotherapeutic approaches for effective cancer treatment. *Journal of Controlled Release*. 294: 114–130.
- [175] Plaks V., Kong N., Werb Z. 2015. The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell stem cell*. 16(3): 225–238.
- [176] Podolak I., Galanty A., Sobolewska D. 2010. Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochemistry Reviews*. 9(3): 425–474.
- [177] Poggi A., Giuliani M. 2016. Mesenchymal Stromal Cells Can Regulate the Immune Response in the Tumor Microenvironment. *Vaccines*. 4(4): 41.
- [178] Pollier J., Goossens A. 2012. Oleanolic acid. *Phytochemistry*. 77: 10–15.
- [179] Prasad S., Yadav V.R., Sung B., Gupta S.C., Tyagi A.K., Aggarwal B.B. 2016. Ursolic acid inhibits the growth of human pancreatic cancer and enhances the antitumor potential of gemcitabine in an orthotopic mouse model through suppression of the inflammatory microenvironment. *Oncotarget*. 7(11): 13182.
- [180] Prasad S., Yadav V.R., Sung B., Reuter S., Kannappan R., Deorukhkar A., Diagaradjane P., Wei C., Baladandayuthapani V., Krishnan S., Guha S., Aggarwal B.B. 2012. Ursolic acid inhibits growth and metastasis of human colorectal cancer in an orthotopic nude mouse model by targeting multiple cell signaling pathways: chemosensitization with capecitabine. *Clinical cancer research*. 18(18): 4942–4953.

- [181] Qian B.-Z. 2017. Inflammation fires up cancer metastasis. *Seminars in Cancer Biology*. 47: 170–176.
- [182] Ramesh S., Wildey G.M., Howe P.H. 2009. Transforming growth factor β (TGF β)-induced apoptosis: The rise & fall of Bim. *Cell Cycle*. 8(1): 11–17.
- [183] Ren Z., Chen J., Khalil R.A. 2017. Zymography as a Research Tool in the Study of Matrix Metalloproteinase Inhibitors. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 1626: 79–102.
- [184] Ridley A.J. 2015. Rho GTPase signalling in cell migration. *Current Opinion in Cell Biology*. 36: 103–112.
- [185] Robey R.B., Weisz J., Kuemmerle N.B., Salzberg A.C., Berg A., Brown D.G., Kubik L., Palorini R., Al-Mulla F., Al-Temaimi R., Colacci A.M., Mondello C., Raju J., Woodrick J., Scovassi A.I., Singh N., Vaccari M., Roy R., Forte S., Memeo L., Salem H.K., Amedei A., Hamid R.A., Williams G.P., Lowe L., Meyer J., Martin F.L., Bisson W.H., Chiaradonna F., Ryan E.P. 2015. Metabolic reprogramming and dysregulated metabolism: cause, consequence and/or enabler of environmental carcinogenesis? *Carcinogenesis*. 36(Suppl 1): S203–S231.
- [186] Robey R.W., Pluchino K.M., Hall M.D., Fojo A.T., Bates S.E., Gottesman M.M. 2018. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nature Reviews Cancer*. 18(7): 452–464.
- [187] Ronnekleiv-Kelly S.M., Burkhart R.A., Pawlik T.M. 2016. Molecular markers of prognosis and therapeutic targets in metastatic colorectal cancer. *Surgical Oncology*. 25(3): 190–199.
- [188] Saikawa Y., Sugiura T., Toriumi F., Kubota T., Suganuma K., Isshiki S., Otani Y., Kumai K., Kitajima M. 2004. Cyclooxygenase-2 gene induction causes CDDP resistance in colon cancer cell line, HCT-15. *Anticancer research*. 24(5A): 2723–2728.
- [189] Sakamoto S., Kyprianou N. 2010. Targeting anoikis resistance in prostate cancer metastasis. *Molecular Aspects of Medicine*. 31(2): 205–214.
- [190] Sakthivel K.M., Hariharan S. 2017. Regulatory players of DNA damage repair mechanisms: Role in Cancer Chemoresistance. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 93: 1238–1245.
- [191] Salehifar E., Hosseinimehr S.J. 2016. The use of cyclooxygenase-2 inhibitors for improvement of efficacy of radiotherapy in cancers. *Drug Discovery Today*. 21(4): 654–662.
- [192] Salvador J.A.R., Leal A.S., Alho D.P.S., Gonçalves B.M.F., Valdeira A.S., Mendes V.I.S., Jing Y. 2014. Highlights of Pentacyclic Triterpenoids in the Cancer Settings-Chapter 2. *Studies in Natural Products Chemistry*. 41: 33–73.
- [193] Samadi A.K., Bilsland A., Georgakilas A.G., Amedei A., Amin A., Bishayee A., Azmi A.S., Lokeshwar B.L., Grue B., Panis C., Boosani C.S., Poudyal D., Stafforini D.M., Bhakta D., Niccolai E., Guha G., Vasantha Rupasinghe H.P., Fujii H., Honoki K., Mehta K., Aquilano K., Lowe L., Hofseth L.J., Ricciardiello L., Ciriolo M.R., Singh N., Whelan R.L., Chaturvedi R., Ashraf S.S., Shantha Kumara H.M.C., Nowsheen S., Mohammed S.I., Keith W.N., Helferich W.G., Yang X. 2015. A multi-targeted approach to suppress tumor-promoting inflammation. *Seminars in cancer biology*. 35 Suppl: S151–S184.
- [194] Saravanan R., Viswanathan P., Pugalendi K.V. 2006. Protective effect of ursolic acid on ethanol-mediated experimental liver damage in rats. *Life sciences*. 78(7): 713–718.
- [195] Scharping N.E., Delgoffe G.M. 2016. Tumor Microenvironment Metabolism: A New Checkpoint for Anti-Tumor Immunity. *Vaccines*. 4(4): 46.
- [196] Schetter A.J., Heegaard N.H.H., Harris C.C. 2010. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis*. 31(1): 37–49.
- [197] Schulenburg A., Blatt K., Cerny-Reiterer S., Sadovnik I., Herrmann H., Marian B., Grunt T.W., Zielinski C.C., Valent P. 2015. Cancer stem cells in basic science and in translational oncology: can we translate into clinical application? *Journal of Hematology & Oncology*. 8(1): 16.
- [198] Schulenburg A., Brämwig K., Herrmann H., Karlic H., Mirkina I., Hubmann R., Laffer S., Marian B., Shehata M., Krepler C., Pehamberger H., Grunt T., Jäger U., Zielinski C.C., Valent P. 2010. Neoplastic stem cells: Current concepts and clinical perspectives. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 76(2): 79–98.
- [199] Senthedane A.D., Rowe A., Thomford N.E., Shipanga H., Munro D., Mazeedi M.A. Al, Almazyadi H.A.M., Kallmeyer K., Dandara C., Pepper M.S., Parker M.I., Dzobo K. 2017. The Role of Tumor Microenvironment in Chemoresistance: To Survive, Keep Your Enemies Closer. *International journal of molecular sciences*. 18(7): 1586.
- [200] Shan J., Xuan Y., Ruan S., Sun M. 2011. Proliferation-inhibiting and apoptosis-inducing effects of ursolic acid and oleanolic acid on multi-drug resistance cancer cells in vitro. *Chinese Journal of Integrative Medicine*. 17(8): 607–611.

- [201] Shan J., Xuan Y., Zhang Q., Zhu C., Liu Z., Zhang S. 2016a. Ursolic acid synergistically enhances the therapeutic effects of oxaliplatin in colorectal cancer. *Protein & Cell*. 7(8): 571–585.
- [202] Shan J., Xuan Y., Zhang Q., Huang J. 2016b. Ursolic acid sensitized colon cancer cells to chemotherapy under hypoxia by inhibiting MDR1 through HIF-1 α . *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*. 17(9): 672–682.
- [203] Shan J., Xuan Y., Zheng S., Dong Q., Zhang S. 2009. Ursolic acid inhibits proliferation and induces apoptosis of HT-29 colon cancer cells by inhibiting the EGFR/MAPK pathway. *Journal of Zhejiang University Science B*. 10(9): 668–674.
- [204] Shanmugam M.K., Dai X., Kumar A.P., Tan B.K.H., Sethi G., Bishayee A. 2014. Oleanolic acid and its synthetic derivatives for the prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical evidence. *Cancer letters*. 346(2): 206–216.
- [205] Shanmugam M.K., Dai X., Kumar A.P., Tan B.K.H., Sethi G., Bishayee A. 2013. Ursolic acid in cancer prevention and treatment: molecular targets, pharmacokinetics and clinical studies. *Biochemical pharmacology*. 85(11): 1579–1587.
- [206] Shaw E., Warkentin M.T., McGregor S.E., Town S., Hilsden R.J., Brenner D.R. 2017. Intake of dietary fibre and lifetime non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) use and the incidence of colorectal polyps in a population screened for colorectal cancer. *Journal of epidemiology and community health*. 71(10): 961–969.
- [207] Shenkman B., Livnat T., Budnik I., Tamarin I., Einav Y., Martinowitz U. 2012. Plasma tissue-type plasminogen activator increases fibrinolytic activity of exogenous urokinase-type plasminogen activator. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 23(8): 729–733.
- [208] Shuman Moss L.A., Jensen-Taubman S., Stetler-Stevenson W.G. 2012. Matrix metalloproteinases: changing roles in tumor progression and metastasis. *The American journal of pathology*. 181(6): 1895–1899.
- [209] Siddiqui I.A., Sanna V., Ahmad N., Sechi M., Mukhtar H. 2015. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1348(1): 20–31.
- [210] Simabuco F.M., Morale M.G., Pavan I.C.B., Morelli A.P., Silva F.R., Tamura R.E. 2018. p53 and metabolism: from mechanism to therapeutics. *Oncotarget*. 9(34): 23780–23823.
- [211] Simiczjew A., Konopnicka A., Nowak D. 2018. Ruch ameboidalny komórek nowotworowych Ameboid movement of cancer cells. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 72: 21–34.
- [212] Singel K.L., Segal B.H. 2016. Neutrophils in the tumor microenvironment: trying to heal the wound that cannot heal. *Immunological Reviews*. 273(1): 329–343.
- [213] Singh M., Yelle N., Venugopal C., Singh S.K. 2018. EMT: Mechanisms and therapeutic implications. *Pharmacology & Therapeutics*. 182: 80–94.
- [214] Sobolewski C., Cerella C., Dicato M., Ghibelli L., Diederich M. 2010. The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. *International journal of cell biology*. 2010: 215158.
- [215] Soiffer R., Hodi F.S., Haluska F., Jung K., Gillesen S., Singer S., Tanabe K., Duda R., Mentzer S., Jaklitsch M., Bueno R., Clift S., Hardy S., Neuberg D., Mulligan R., Webb I., Mihm M., Dranoff G. 2003. Vaccination With Irradiated, Autologous Melanoma Cells Engineered to Secrete Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor by Adenoviral-Mediated Gene Transfer Augments Antitumor Immunity in Patients With Metastatic Melanoma. *Journal of Clinical Oncology*. 21(17): 3343–3350.
- [216] Sotiropoulou G., Pampalakis G., Diamandis E.P. 2009. Functional roles of human kallikrein-related peptidases. *The Journal of biological chemistry*. 284(48): 32989–32994.
- [217] Stockert J.C., Horobin R.W., Colombo L.L., Blázquez-Castro A. 2018. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochemica*. 120(3): 159–167.
- [218] Strickertsson J.A.B., Desler C., Rasmussen L.J. 2017. Bacterial infection increases risk of carcinogenesis by targeting mitochondria. *Seminars in Cancer Biology*. 47: 95–100.
- [219] Su C.-W., Zhang Y., Zhu Y.-T. 2016. Stromal COX-2 signaling are correlated with colorectal cancer: A review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 107: 33–38.
- [220] Suarez-Carmona M., Lesage J., Cataldo D., Gilles C. 2017. EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. *Molecular Oncology*. 11(7): 805–823.
- [221] Sun J., Kato I. 2016. Gut microbiota, inflammation and colorectal cancer. *Genes & Diseases*. 3(2): 130–143.
- [222] Surowiak P., Pawełczyk K., Maciejczyk A., Pudełko M., Kołodziej J., Zabel M., Murawa D., Drag M., Gansukh T., Dietel M., Lage H. 2008. Positive correlation between cyclooxygenase 2

- and the expression of ABC transporters in non-small cell lung cancer. *Anticancer research*. 28(5B): 2967–2974.
- [223] Swann J.B., Smyth M.J. 2007. Immune surveillance of tumors. *The Journal of Clinical Investigation*. 117: 1137–1146.
 - [224] Śliwińska-Hill U., Trocha J. 2011. Najnowsze terapie przeciwnowotworowe. *Postępy Farmacji*. 1: 14.
 - [225] Świeboda-Sadlej A. 2011. Skojarzone leczenie nowotworów — współpraca chirurga i onkologa klinicznego w zakresie leczenia raka piersi, jelita grubego i płuca. *Chirurgia Polska*. 13(1): 59–68.
 - [226] Tam W.L., Weinberg R.A. 2013. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat Med*. 19(11): 1438–1449.
 - [227] Tan C.W., Hirokawa Y., Burgess A.W. 2015. Analysis of Wnt signalling dynamics during colon crypt development in 3D culture. *Scientific Reports*. 5(1): 11036.
 - [228] Tan H.-Y., Wang N., Lam W., Guo W., Feng Y., Cheng Y.-C. 2018. Targeting tumour microenvironment by tyrosine kinase inhibitor. *Molecular Cancer*. 17(1): 43.
 - [229] Tang L., Han X. 2013. The urokinase plasminogen activator system in breast cancer invasion and metastasis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 67(2): 179–182.
 - [230] Tang Q., Liu Y., Li T., Yang X., Zheng G., Chen H., Jia L., Shao J. 2016. A novel co-drug of aspirin and ursolic acid interrupts adhesion, invasion and migration of cancer cells to vascular endothelium via regulating EMT and EGFR-mediated signaling pathways: multiple targets for cancer metastasis prevention and treatment. *Oncotarget*. 7(45): 73114–73129.
 - [231] Tarasiuk A., Mosińska P., Fichna J. 2018. The mechanisms linking obesity to colon cancer: An overview. *Obesity Research & Clinical Practice*. 12(3): 251–259.
 - [232] Tarpey M.M., Wink D.A., Grisham M.B. 2004. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 286(3): R431–R444.
 - [233] Taylor W.F., Jabbarzadeh E. 2017. The use of natural products to target cancer stem cells. *American journal of cancer research*. 7(7): 1588–1605.
 - [234] Teixeira A.C.T., Fernandes A.C., Garcia A.R., Ilharco L.M., Brogueira P., Gonçalves da Silva A.M.P.S. 2007. Microdomains in mixed monolayers of oleanolic and stearic acids: thermodynamic study and BAM observation at the air–water interface and AFM and FTIR analysis of LB monolayers. *Chemistry and Physics of Lipids*. 149(1–2): 1–13.
 - [235] Terry S., Savagner P., Ortiz-Cuaran S., Mahjoubi L., Saintigny P., Thierry J.-P., Chouaib S. 2017. New insights into the role of EMT in tumor immune escape. *Molecular Oncology*. 11: 824–846.
 - [236] Testa U., Pelosi E., Castelli G. 2018. Colorectal Cancer: Genetic Abnormalities, Tumor Progression, Tumor Heterogeneity, Clonal Evolution and Tumor-Initiating Cells. *Medical Sciences*. 6(2): 31.
 - [237] Thompson P.A., Khatami M., Bagloli C.J., Sun J., Harris S.A., Moon E.-Y., Al-Mulla F., Al-Temaimi R., Brown D.G., Colacci A., Mondello C., Raju J., Ryan E.P., Woodrick J., Scovassi A.I., Singh N., Vaccari M., Roy R., Forte S., Memeo L., Salem H.K., Amedei A., Hamid R.A., Lowe L., Guarnieri T., Bisson W.H. 2015. Environmental immune disruptors, inflammation and cancer risk. *Carcinogenesis*. 36 Suppl 1(Suppl 1): S232–53.
 - [238] Tomar A., Schlaepfer D.D. 2009. Focal adhesion kinase: switching between GAPs and GEFs in the regulation of cell motility. *Current Opinion in Cell Biology*. 21(5): 676–683.
 - [239] Torre C., Wang S.J., Xia W., Bourguignon L.Y.W. 2010. Reduction of Hyaluronan-CD44–Mediated Growth, Migration, and Cisplatin Resistance in Head and Neck Cancer Due to Inhibition of Rho Kinase and PI-3 Kinase Signaling. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*. 136(5): 493.
 - [240] Tsuji Y., Sugihara K. 2016. Adjuvant chemotherapy for colon cancer: the difference between Japanese and western strategies. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 17(6): 783–790.
 - [241] Ulisse S., Baldini E., Sorrenti S., D’Armiento M. 2009. The Urokinase Plasminogen Activator System: A Target for Anti-Cancer Therapy. *Current Cancer Drug Targets*. 9(1): 32–71.
 - [242] van Tong H., Brindley P.J., Meyer C.G., Velavan T.P. 2017. Parasite Infection, Carcinogenesis and Human Malignancy. *EBioMedicine*. 15: 12–23.
 - [243] van Zijl F., Krupitza G., Mikulits W. 2011. Initial steps of metastasis: Cell invasion and endothelial transmigration. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 728(1–2): 23–34.
 - [244] Vanharanta S., Massagué J. 2013. Origins of metastatic traits. *Cancer cell*. 24(4): 410–421.

- [245] Vannini F., Kashfi K., Nath N. 2015. The dual role of iNOS in cancer. *Redox biology*. 6: 334–343.
- [246] Vega F.M., Ridley A.J. 2018. The RhoB small GTPase in physiology and disease. *Small GTPases*. 9(5): 384–393.
- [247] Velaei K., Samadi N., Barazvan B., Soleimani Rad J. 2016. Tumor microenvironment-mediated chemoresistance in breast cancer. *Breast (Edinburgh, Scotland)*. 30: 92–100.
- [248] Voet D., Voet J., Pratt C. 2008. *Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level*. 3. John Wiley and Sons, Inc.
- [249] Vogel A., Hofheinz R.D., Kubicka S., Arnold D. 2017. Treatment decisions in metastatic colorectal cancer - Beyond first and second line combination therapies. *Cancer treatment reviews*. 59: 54–60.
- [250] Wang H., Khor T.O., Shu L., Su Z.-Y., Fuentes F., Lee J.-H., Kong A.-N.T. 2012. Plants vs. cancer: a review on natural phytochemicals in preventing and treating cancers and their druggability. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 12(10): 1281–1305.
- [251] Wang J., Liu L., Qiu H., Zhang X., Guo W., Chen W., Tian Y., Fu L., Shi D., Cheng J., others 2013. Ursolic acid simultaneously targets multiple signaling pathways to suppress proliferation and induce apoptosis in colon cancer cells. *PloS one*. 8(5): e63872.
- [252] Wang L., Wang J., Cao Y., Li W., Wang Y., Xu J., Xu G. 2019. Molecular evidence for better efficacy of hypocrellin A and oleanolic acid combination in suppression of HCC growth. *European Journal of Pharmacology*. 842: 281–290.
- [253] Wang W., Quan Y., Fu Q., Liu Y., Liang Y., Wu J., Yang G., Luo C., Ouyang Q., Wang Y. 2014. Dynamics between Cancer Cell Subpopulations Reveals a Model Coordinating with Both Hierarchical and Stochastic Concepts. *PLoS ONE*. 9(1): e84654.
- [254] Wang X., Yang Y., Huycke M.M. 2017. Microbiome-driven carcinogenesis in colorectal cancer: Models and mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*. 105: 3–15.
- [255] Warner H., Wilson B.J., Caswell P.T. 2019. Control of adhesion and protrusion in cell migration by Rho GTPases. *Current Opinion in Cell Biology*. 56: 64–70.
- [256] Ween M.P., Armstrong M.A., Oehler M.K., Ricciardelli C. 2015. The role of ABC transporters in ovarian cancer progression and chemoresistance. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 96(2): 220–256.
- [257] Wei J., Liu H., Liu M., Wu N., Zhao J., Xiao L., Han L., Chu E., Lin X. 2012. Oleanolic acid potentiates the antitumor activity of 5-fluorouracil in pancreatic cancer cells. *Oncology reports*. 28(4): 1339–1345.
- [258] Wertheimer E., Gutierrez-Uzquiza A., Rosembliit C., Lopez-Haber C., Sosa M.S., Kazanietz M.G. 2012. Rac signaling in breast cancer: A tale of GEFs and GAPs. *Cellular Signalling*. 24(2): 353–362.
- [259] Wolny R., Lasek W. 2010. Szczepionki przeciwnowotworowe wydzielające GM-CSF. *Postępy Biologii Komórki*. 4: 747–764.
- [260] Wright N.A. 2000. Epithelial stem cell repertoire in the gut: clues to the origin of cell lineages, proliferative units and cancer. *International journal of experimental pathology*. 81(2): 117–143.
- [261] Wu S., Zhang T., Du J. 2016. Ursolic acid sensitizes cisplatin-resistant HepG2/DDP cells to cisplatin via inhibiting Nrf2/ARE pathway. *Drug Design, Development and Therapy*. Volume 10: 3471–3481.
- [262] Wulf E., Deboben A., Bautz F.A., Faulstich H., Wieland T. 1979. Fluorescent phalloxin, a tool for the visualization of cellular actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 76(9): 4498–4502.
- [263] Xiang L., Chi T., Tang Q., Yang X., Ou M., Chen X., Yu X., Chen J., Ho R.J.Y., Shao J., Jia L. 2015. A pentacyclic triterpene natural product, ursolic acid and its prodrug US597 inhibit targets within cell adhesion pathway and prevent cancer metastasis. *Oncotarget*. 6(11): 9295–9312.
- [264] Yamai H., Sawada N., Yoshida T., Seike J., Takizawa H., Kenzaki K., Miyoshi T., Kondo K., Bando Y., Ohnishi Y., Tangoku A. 2009. Triterpenes augment the inhibitory effects of anticancer drugs on growth of human esophageal carcinoma cells in vitro and suppress experimental metastasis in vivo. *International Journal of Cancer*. 125(4): 952–960.
- [265] Yang L., Liu X., Lu Z., Chan J.Y.-W., Zhou L., Fung K.-P., Wu P., Wu S. 2010. Ursolic acid induces doxorubicin-resistant HepG2 cell death via the release of apoptosis-inducing factor. *Cancer letters*. 298(1): 128–138.
- [266] Yang Y., Laval S. 2014. Chemical synthesis of saponins. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem*. 71: 137–226.

- [267] Ye X., Weinberg R.A. 2015. Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. *Trends in cell biology*. 25(11): 675–686.
- [268] Yeh C.-T., Wu C.-H., Yen G.-C. 2010. Ursolic acid, a naturally occurring triterpenoid, suppresses migration and invasion of human breast cancer cells by modulating c-Jun N-terminal kinase, Akt and mammalian target of rapamycin signaling. *Molecular Nutrition & Food Research*. 54(9): 1285–1295.
- [269] Zeisberg M., Neilson E.G. 2009. Review series personal perspective Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *The Journal of Clinical Investigation*. 119:
- [270] Zelenay S., van der Veen A.G., Böttcher J.P., Snelgrove K.J., Rogers N., Acton S.E., Chakravarty P., Girotti M.R., Marais R., Quezada S.A., Sahai E., Reis e Sousa C. 2015. Cyclooxygenase-Dependent Tumor Growth through Evasion of Immunity. *Cell*. 162(6): 1257–1270.
- [271] Zhang B., Xing Y., Wen C., Yu X., Sun W., Xiu Z., Dong Y. 2017. Pentacyclic triterpenes as α -glucosidase and α -amylase inhibitors: Structure-activity relationships and the synergism with acarbose. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 27(22): 5065–5070.
- [272] Zhang D., Feng F., Liu R., Zhu W., Yao L. 2018. Mechanochemistry in cancer cell metastasis. *Chinese Chemical Letters*.
- [273] Zhang J., Wang W., Qian L., Zhang Q., Lai D., Qi C. 2015. Ursolic acid inhibits the proliferation of human ovarian cancer stem-like cells through epithelial-mesenchymal transition. *Oncology Reports*. 34(5): 2375–2384.
- [274] Zhang W., Hong D., Zhou Y., Zhang Y., Shen Q., Li J., Hu L., Li J. 2006. Ursolic acid and its derivative inhibit protein tyrosine phosphatase 1B, enhancing insulin receptor phosphorylation and stimulating glucose uptake. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1760(10): 1505–1512.
- [275] Zhang Y., Huang L., Shi H., Chen H., Tao J., Shen R., Wang T. 2018. Ursolic acid enhances the therapeutic effects of oxaliplatin in colorectal cancer by inhibition of drug resistance. *Cancer science*. 109(1): 94–102.
- [276] Zhang Y.-K., Wang Y.-J., Gupta P., Chen Z.-S. 2015. Multidrug Resistance Proteins (MRPs) and Cancer Therapy. *The AAPS Journal*. 17(4): 802–812.
- [277] Zhou J.-X., Wink M. 2018. Reversal of Multidrug Resistance in Human Colon Cancer and Human Leukemia Cells by Three Plant Extracts and Their Major Secondary Metabolites. *Medicines*. 5(4): 123.
- [278] Zimmers T.A., Fishel M.L., Bonetto A. 2016. STAT3 in the systemic inflammation of cancer cachexia. *Seminars in cell & developmental biology*. 54: 28–41.

Spis rysunków

Ryc. 1. Cechy komórek nowotworowych	15
Ryc. 2. Porównanie terapii standardowej oraz celującej w CSCs	16
Ryc. 3. Składniki mikrośrodowiska nowotworu i ich udział w kancerogenezie	18
Ryc. 4. Regulacja aktywności HIF-1 w warunkach normoksji i hipoksji	20
Ryc. 5. Molekularny mechanizm kancerogenezy indukowany chronicznym stanem zapalnym	22
Ryc. 6. Mechanizm kancerogenezy i przerzutowania	25
Ryc. 7. Mechanizm aktywności białka p53	27
Ryc. 8. Przejście epithelialno-mezenchymalne	30
Ryc. 9. Molekularny mechanizm regulacji EMT	32
Ryc. 10. Regulacja unikania przez komórki nowotworowe anoikis	34
Ryc. 11. Mechanizm mezenchymalnego ruchu komórki	35
Ryc. 12. Transcelomiczny mechanizm przerzutowania	37
Ryc. 13. Schemat klasycznego szlaku tworzenia przerzutu	38
Ryc. 14. Aktywacja MMPs	42
Ryc. 15. Udział MMPs w kancerogenezie	44
Ryc. 16. Regulacja aktywności białek podrodziny Rho i ich efektorów w procesie przekształcania aktyny	50
Ryc. 17. Udział COX-2/PGE2 wydzielanych przez komórki nowotworowe oraz mikrośrodowiska w immunomodulacji i stanie zapalnym	54
Ryc. 18. Udział COX-2/PGE2 w kancerogenezie	55
Ryc. 19. Struktura białek MDR podrodziny ABCC (MRPs) oraz mechanizm transportu za ich pośrednictwem	58
Ryc. 20. Udział MMPs, białek Rho, COX-2 oraz MRPs w kancerogenezie oraz ich wzajemna regulacja	61
Ryc. 21. Stadia rozwoju raka jelita grubego	64
Ryc. 22. Mechanizm aktywności wybranych czynników etiologicznych i profilaktycznych w rozwoju lub hamowaniu raka jelita grubego	67
Ryc. 23. Mechanizm aktywności głównych grup chemioterapeutyków	69

Ryc. 24. Porównanie struktury kamptotecyny (CPT), topotekanu i kamptotecyny-11 (CPT-11, irynotekanu); metabolizm i mechanizm aktywności irynotekanu (CPT-11)	70
Ryc. 25. Struktura kwasów ursolowego i oleanolowego	74
Ryc. 26. Schemat kultur wykorzystywanych w badaniach	78
Ryc. 27. Schemat zakładania kokultur komórkowych	79
Ryc. 28. Mechanizm odpowiedzialny za aktywność fibrynolityczną	89
Ryc. 29. Hipotetyczny mechanizm odpowiedzialny za ograniczenie migracji komórek raka jelita grubego przez UA, OA i CPT-11 podawane osobno i w połączeniu opracowany na podstawie badań własnych	149
 Wyk. 1. Efekt cytotoksyczny UA, OA i CPT-11 po 24 h inkubacji względem komórek linii CCD 841 CoTr, HT-29 i SW 620 mierzony metodami NR i MTT	 95
Wyk. 2. Efekt cytotoksyczny UA, OA i CPT-11 po 48 h inkubacji względem komórek linii CCD 841 CoTr, HT-29 i SW 620 mierzony metodami NR i MTT	96
Wyk. 3. Efekt cytotoksyczny UA, OA i CPT-11 po 72 h inkubacji względem komórek linii CCD 841 CoTr, HT-29 i SW 620 mierzony metodami NR i MTT	97
Wyk. 4. Efekt cytotoksyczny badanych związków względem linii CCD 841 CoTr, HT-29 oraz SW 620 oznaczony metodami NR oraz MTT	98
Wyk. 5. Zahamowanie proliferacji komórek linii CCD 841 CoTr, HT-29 oraz SW 620 przez badane związki oznaczone metodą MTT oraz metodą opartą na zdolności do klonalności (tworzenia kolonii)	100
Wyk. 6. Stężenie tlenku azotu (NO) wydzielanego przez komórki linii CCD 841 CoTr, HT-29 i SW 620 poddanych działaniu badanych substancji oznaczona metodą Griess'a	102
Wyk. 7. Poziom cytokin: IL-1 β , IL-6 i IL-10 wydzielanych przez hodowle płaskie komórek linii CCD 841 CoTr, HT-29 oraz SW 620 poddane działaniu badanych związków oznaczony metodą ELISA	103
Wyk. 8. Poziom cytokin: IL-1 β , IL-6 i IL-10 wydzielanych przez hodowle płaskie komórek linii CCD 841 CoTr, kokultury komórek prawidłowych i sferoidów utworzonych z komórek linii HT-29 i	

ub SW 620 oraz same sferoidy komórek nowotworowych, poddanych działaniu badanych związków oznaczony metodą ELISA	106
Wyk. 9. Wpływ badanych substancji na migrację komórek linii CCD 841 CoTr, HT-29 oraz SW 620 oznaczony metodą rysy oraz metodą migracji przez porowatą membranę (Transwell)	109
Wyk. 10. Wpływ UA, OA i CPT-11 podawanych pojedynczo i w połączeniu na MMP-2	112
Wyk. 11. Wpływ UA, OA i CPT-11 podawanych pojedynczo i w połączeniu na MMP-9	114
Wyk. 12. Wpływ UA, OA i CPT-11 podawanych pojedynczo i w połączeniu na uPA i uPAR	118
Wyk. 13. Aktywność fibrynolityczna badanych wariantów	121
Wyk. 14. Lokalizacja białek Rho w komórce oraz wpływ badanych substancji na strukturę cytoszkieletu aktynowego i związanych z nim białek Rho – zdjęcia z mikroskopii fluorescencyjnej	124
Wyk. 15. Wpływ badanych związków na poziom białka RhoA w komórkach linii CCD 841 CoTr, HT-29 oraz SW 620 określony metodą immunofluorescencji oraz Western Blotting	125
Wyk. 16. Wpływ badanych związków na poziom białka RhoC w komórkach linii CCD 841 CoTr, HT-29 oraz SW 620 określony metodą immunofluorescencji oraz Western Blotting	126
Wyk. 17. Wpływ badanych związków na poziom białka RhoB w komórkach linii CCD 841 CoTr, HT-29 oraz SW 620 określony metodą immunofluorescencji oraz Western Blotting	127
Wyk. 18. Wpływ badanych związków na poziom białka COX-2 w komórkach linii CCD 841 CoTr, HT-29 oraz SW 620 określony metodą immunofluorescencji oraz Western Blotting	129
Wyk. 19. Wpływ badanych związków na poziom E-kadheryny w komórkach linii CCD 841 CoTr, HT-29 oraz SW 620 określony metodą Western Blotting	130
Wyk. 20. Wpływ badanych związków na poziom białka MRP w komórkach linii CCD 841 CoTr, HT-29 oraz SW 620 określony metodą immunofluorescencji oraz Western Blotting	132

Zdj. 1. Przedstawienie wpływu badanych substancji na migrację komórek linii CCD 841 CoTr, HT-29 oraz SW 620 oznaczony metodą rysy	108
Tablica 1. Wpływ badanych substancji na lokalizację i poziom MMP-2 w komórkach linii CCD 841 CoTr, HT-29 oraz SW 620	172
Tablica 2. Wpływ badanych substancji na lokalizację i poziom MMP-9 w komórkach linii CCD 841 CoTr, HT-29 oraz SW 620	173
Tablica 3. Wpływ badanych substancji na lokalizację i poziom uPAR w komórkach linii CCD 841 CoTr, HT-29 oraz SW 620	174
Tablica 4. Wpływ badanych substancji na lokalizację i poziom białek RhoA oraz na cytoszkielet aktynowy komórek linii CCD 841 CoTr	175
Tablica 5. Wpływ badanych substancji na lokalizację i poziom białek RhoA oraz na cytoszkielet aktynowy komórek linii HT-29	176
Tablica 6. Wpływ badanych substancji na lokalizację i poziom białek RhoA oraz na cytoszkielet aktynowy komórek linii SW 620	177
Tablica 7. Wpływ badanych substancji na lokalizację i poziom białek RhoC oraz na cytoszkielet aktynowy komórek linii CCD 841 CoTr	178
Tablica 8. Wpływ badanych substancji na lokalizację i poziom białek RhoC oraz na cytoszkielet aktynowy komórek linii HT-29	179
Tablica 9. Wpływ badanych substancji na lokalizację i poziom białek RhoC oraz na cytoszkielet aktynowy komórek linii SW 620	180
Tablica 10. Wpływ badanych substancji na lokalizację i poziom białek RhoB w komórkach linii CCD 841 CoTr, HT-29 oraz SW 620	181
Tablica 11. Wpływ badanych substancji na lokalizację i poziom COX-2 w komórkach linii CCD 841 CoTr, HT-29 oraz SW 620	182
Tablica 12. Wpływ badanych substancji na lokalizację i poziom MRP w komórkach linii CCD 841 CoTr, HT-29 oraz SW 620	183

Spis tabel

Tabela 1. Podział oraz specyfika aktywności metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej	40
Tabela 2. Szacowana zachorowalność i umieralność na raka jelita grubego (w tysiącach) w Polsce, Europie i na świecie	63
Tabela 3. Wybrane (wyznaczone empirycznie) stężenia badanych substancji	80
Tabela 4. Warianty badawcze	80
Tabela 5. Określenie zależności między badanymi substancjami podawanymi w połączeniu – ocena efektu cytotoksyczności	99
Tabela 6. Wpływ badanych substancji na czas podwojenia generacji (DT) komórek linii CCD 841 CoTr, HT-29 oraz SW 620 po 24-godzinnej inkubacji	101
Tabela 7. Określenie zależności między badanymi substancjami podawanymi w połączeniu – ocena efektu zahamowania proliferacji	102
Tabela 8. Określenie zależności między badanymi substancjami podawanymi w połączeniu – ocena właściwości immunomodulacyjnych i przeciwzapalnych	107
Tabela 9. Określenie zależności między badanymi substancjami podawanymi w połączeniu – ocena zahamowania migracji	110
Tabela 10. Określenie zależności między badanymi substancjami podawanymi w połączeniu – ocena wpływu na metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej	116
Tabela 11. Określenie zależności między badanymi substancjami podawanymi w połączeniu – ocena wpływu na urokinazowy aktywator plazminogenu i jego receptor	120
Tabela 12. Porównanie wyników uzyskanych z analizy aktywności fibrynolitycznej oraz oceny wpływu badanych związków na białka zaangażowane w szlak metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP-2, MMP-9, uPA, uPAR)	121
Tabela 13. Określenie zależności między badanymi substancjami podawanymi w połączeniu – ocena wpływu na białka RhoA, RhoC i RhoB	128

Tabela 14. Określenie zależności między badanymi substancjami podawanymi w połączeniu – ocena wpływu na cyklooksygenazę-2	130
Tabela 15. Określenie zależności między badanymi substancjami podawanymi w połączeniu – ocena wpływu na E-kadherynę	131
Tabela 16. Określenie zależności między badanymi substancjami podawanymi w połączeniu – ocena wpływu na białko związane z opornością wielolekową	133

Streszczenie

Rak jelita grubego (CRC) jest jedną z najczęściej występujących i śmiertelnych chorób nowotworowych. Często diagnozowany jest w późnym stadium, co istotnie zmniejsza szanse przeżycia pacjentów. Związane jest to z przerzutowaniem nowotworu, tj. uwolnieniem komórek z guza pierwotnego i ich adhezji w miejscu wtórnym, czemu towarzyszy zwiększona ekspresja czynników zaangażowanych w oporność wielolekową. Mimo, iż opracowano strategie terapeutyczne przeciwko nowotworom przerzutującym, często ich skuteczność nie jest zadowalająca. Nowoczesnym podejściem jest zatem terapia adiuwantowa lub skoniugowana, w której oprócz chemioterapeutyku podaje się dodatkowe substancje czynne, mające na celu wzmocnienie działania leku czy ingerencję w molekularne szlaki komórek nowotworowych. Doskonałym przykładem substancji, które mogą być wykorzystane w takiej terapii, są kwasy ursolowy (UA) i oleanolowy (OA), pentacykliczne triterpenoidy pochodzenia roślinnego, które znane są ze swoich właściwości prozdrowotnych czy przeciwnowotworowych. W niniejszych badaniach dokonano oceny właściwości przeciwnowotworowych UA i OA, podawanych osobno, jak i w połączeniu ze sobą oraz cytostatykiem stosowanym rutynowo w terapii CRC, kamptotecyną-11 (CPT-11). W przeprowadzonych badaniach skupiono się szczególnie na ocenie redukcji zdolności migracyjnych komórek nowotworowych pod wpływem badanych czynników. Jako model zastosowano komórki wczesnego stadium ludzkiego raka jelita grubego (linii HT-29) oraz komórki wyizolowane z przerzutu (linii SW 620). Jako model kontrolny wykorzystano prawidłowe ludzkie komórki nabłonka jelita grubego linii (CCD 841 CoTr). Ocenie poddano wpływ UA, OA oraz CPT-11, podawanych osobno i w połączeniu, na proliferację komórek, indukcję stanu zapalnego oraz ich migrację. Dokonano także analizy wpływu badanych związków na szlaki i czynniki zaangażowane w migrację i przerzutowanie, tj. metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs), urokinazowy aktywator plazminogenu (uPA) i jego receptor (uPAR), białka podrodziny Rho, cyklooksygenazę-2 (COX-2) oraz białko związane z opornością wielolekową (MRP). Badane związki, szczególnie w wariantach w połączeniu, istotnie obniżały proliferację i migrację komórek nowotworowych, a także poziom lub aktywność białek zaangażowanych w progresję nowotworu. Jednocześnie charakteryzowały się niską

aktywnością w stosunku do komórek prawidłowych. Ponadto, UA i OA działały ochronnie na komórki prawidłowe poddane działaniu cytostatyku.

Abstract

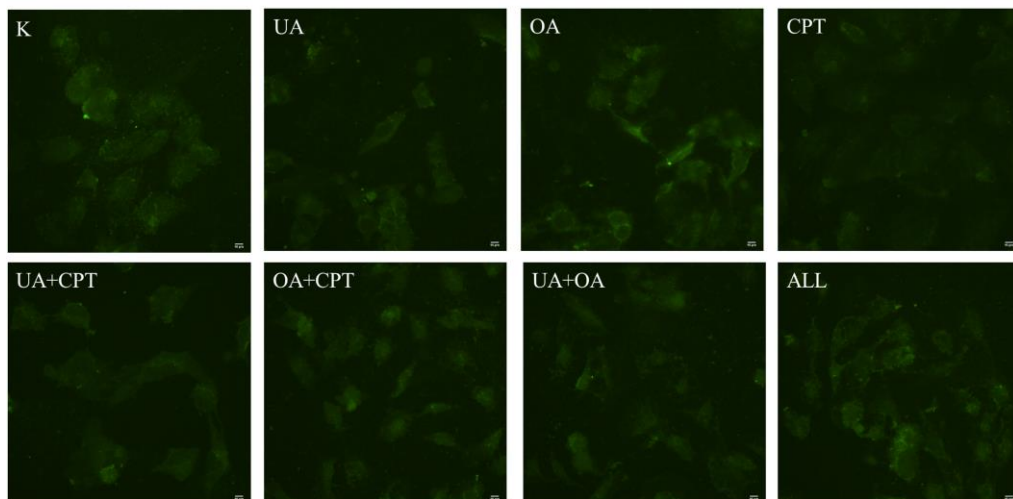
Colorectal cancer (CRC) is one of the most common and lethal neoplasms and is often diagnosed at late stage. It results in poor prognosis and decreased survival, what is related to cancer metastasis, i.e. a process of releasing cells from primary tumour and their invasion of secondary niche. Process of metastasis is also accompanied by increased expression of factors involved in multidrug resistance.

Many therapeutic strategies for metastatic cancers were developed, nevertheless their effectivity is often not enough. A modern approach is therefore adjuvant or conjugated therapy, in which, the chemotherapeutic agent is combined with additional active substances to strengthen the action of the drug or interfere with the molecular pathways in cancer cells. An example of such compounds are ursolic acid (UA) and oleanolic acid (OA), plant-derived pentacyclic triterpenoids, known for their pro-health and anticancer properties. In the present study, antitumorigenic activity of UA and OA, administered individually or in combination with themselves or cytostatic drug, camptothecin-11 (CPT-11), were analyzed. The conducted research has focused particularly on the assessment of the cancer cells migratory capacity reduction under the influence of the examined factors. The research was held on two human colon cancer cells lines: derived from early stage, HT-29, and from metastatic site, SW 620. As a control, human normal colon epithelial cells were used (CCD 841 CoTr). Effect of UA, OA and CPT-11, administered individually or in combination, on cancer cells proliferation, migration and inflammation was evaluated. The mechanism underlying anti-metastatic potential, based on matrix metalloproteinases (MMPs), urokinase plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR), Rho subfamily proteins, cyclooxygenase-2 (COX-2) and multidrug resistance-associated protein (MRP), was also assessed. The studied compounds, especially administered in combination, significantly decreased cancer cells proliferation and migration, as well as the level or activity of proteins involved in tumour progression. At the same time, they were characterized by low activity in relation to normal cells. Furthermore, UA and OA protected normal cells from harmful effect of the cytostatic drug.

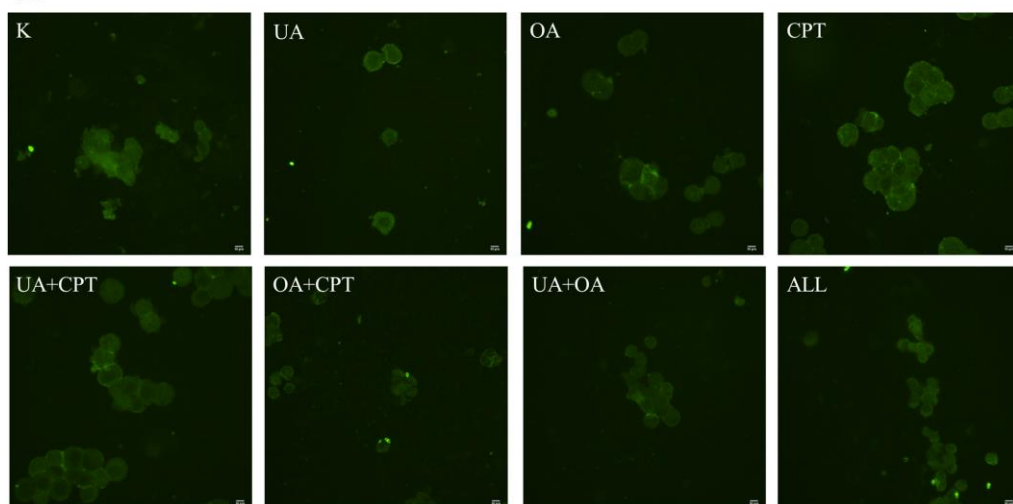
Tablice

Tablica 1. Wpływ badanych substancji na lokalizację i poziom MMP-2 w komórkach linii CCD 841 CoTr (A), HT-29 (B) oraz SW 620 (C)

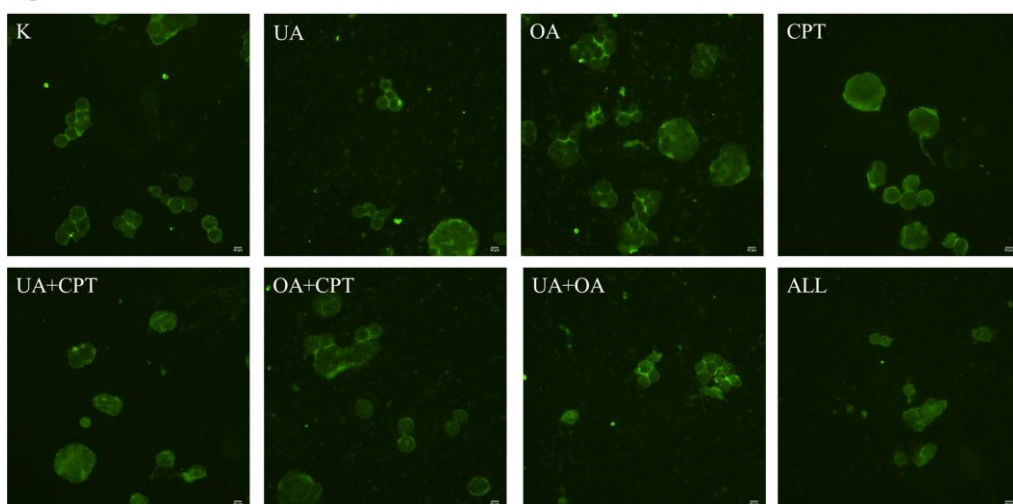
A



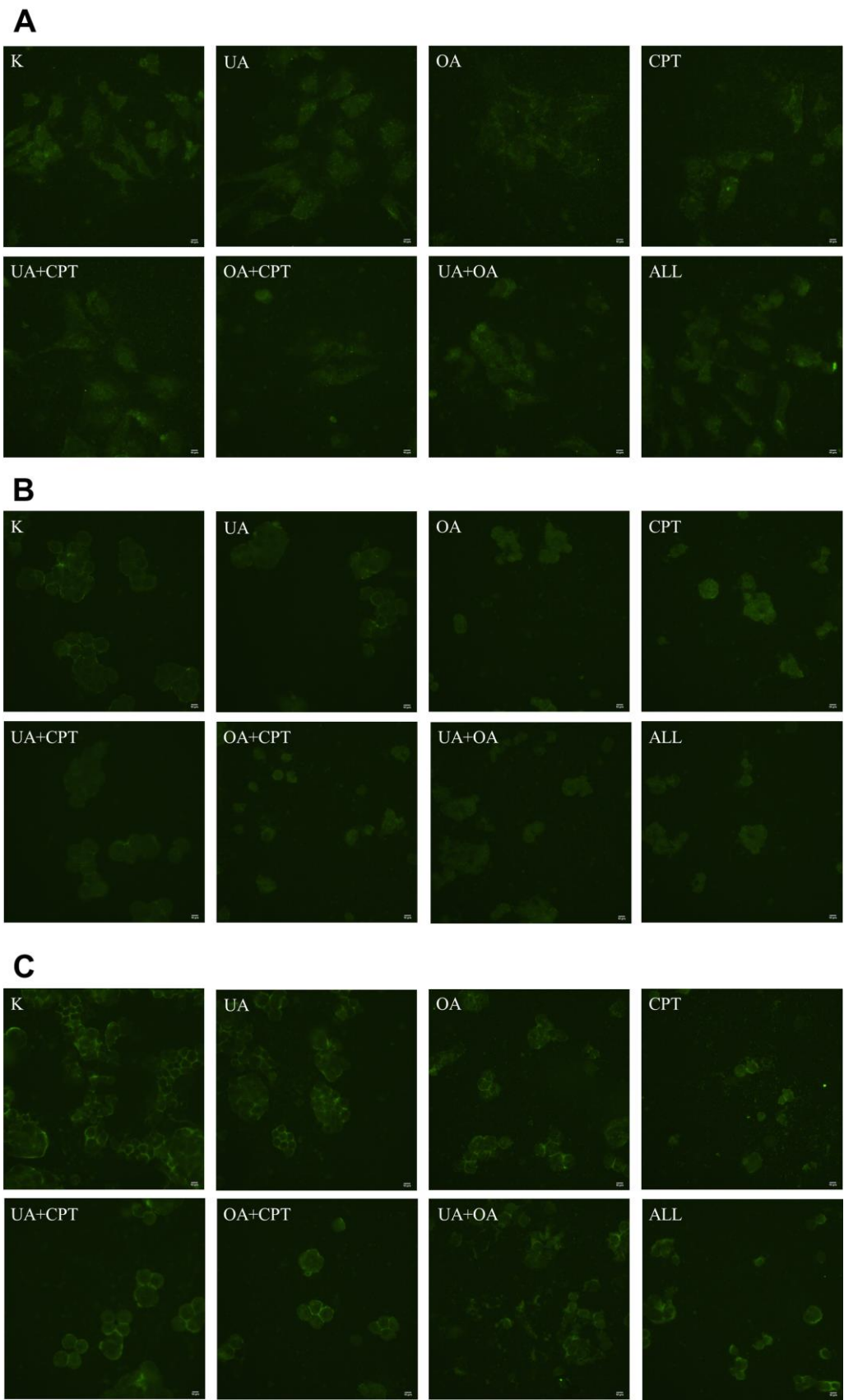
B



C

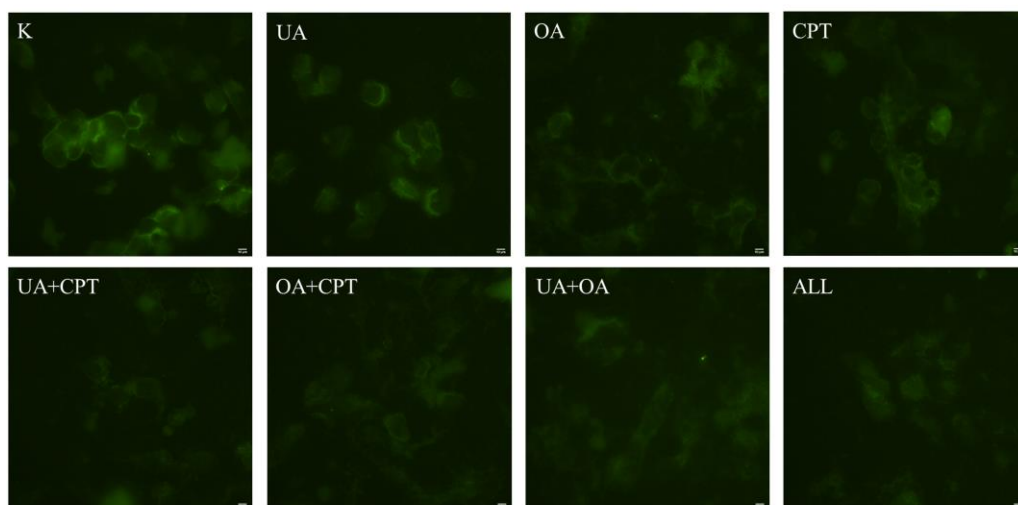


Tablica 2. Wpływ badanych substancji na lokalizację i poziom MMP-9 w komórkach linii CCD 841 CoTr (A), HT-29 (B) oraz SW 620 (C)

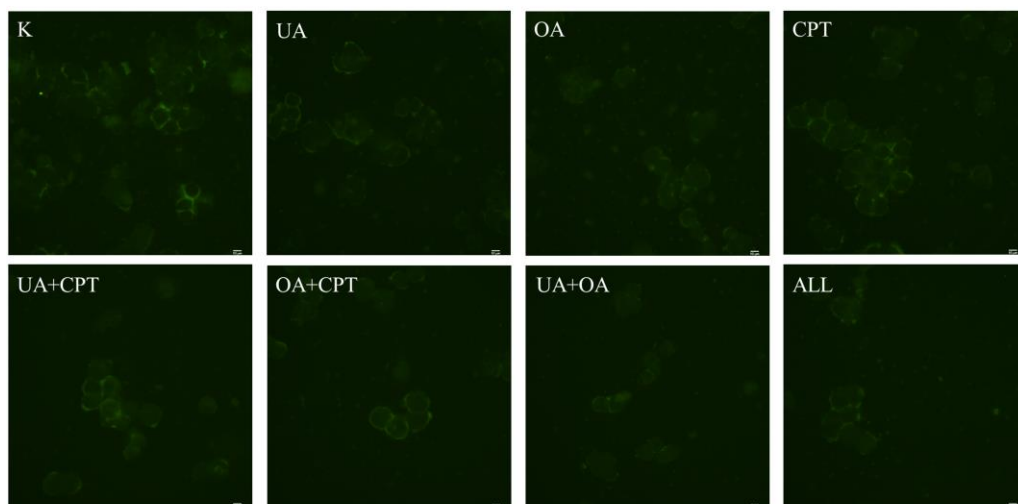


Tablica 3. Wpływ badanych substancji na lokalizację i poziom uPAR w komórkach linii CCD 841 CoTr (A), HT-29 (B) oraz SW 620 (C)

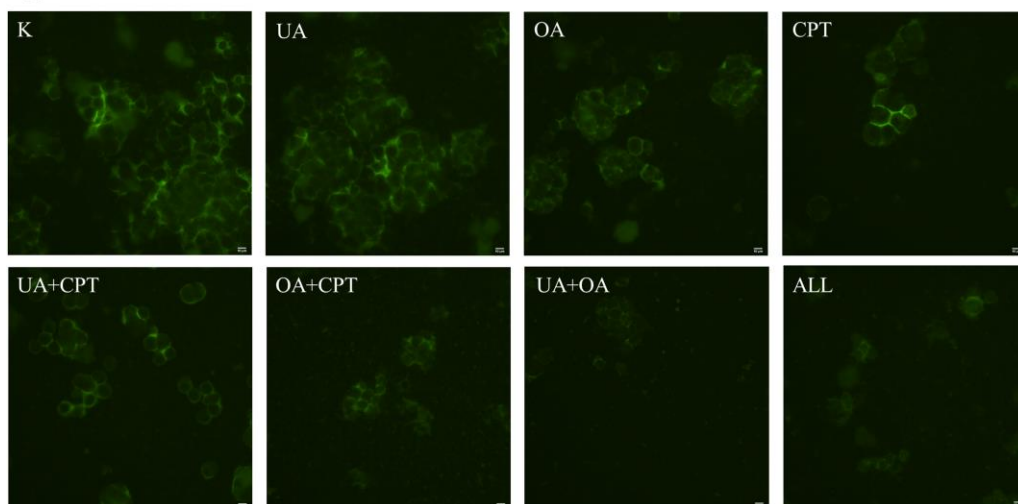
A



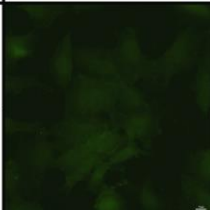
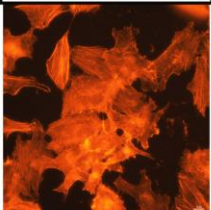
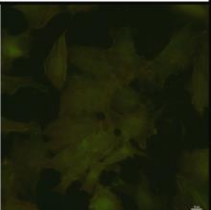
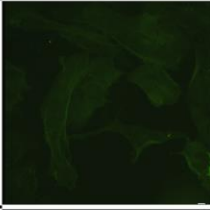
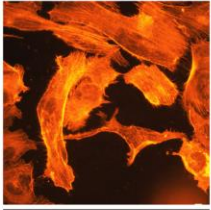
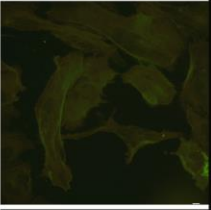
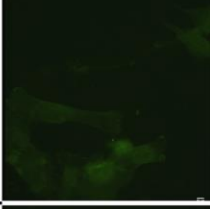
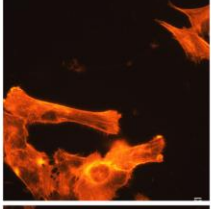
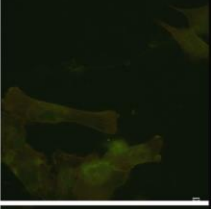
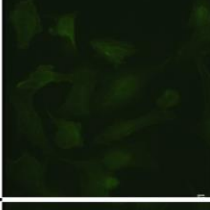
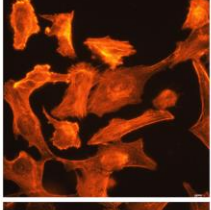
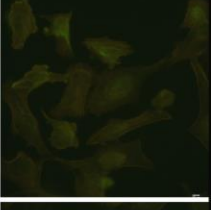
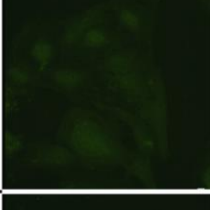
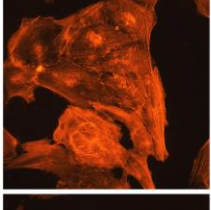
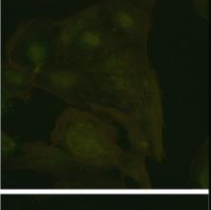
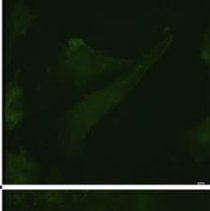
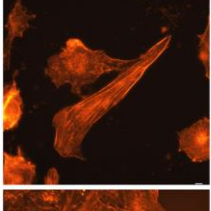
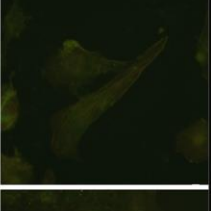
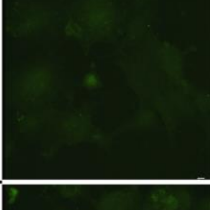
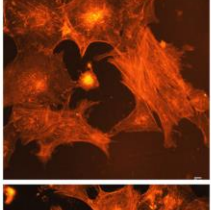
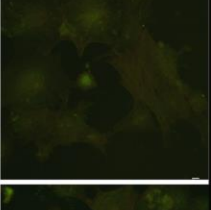
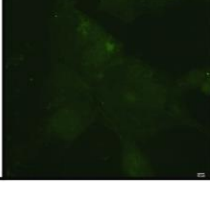
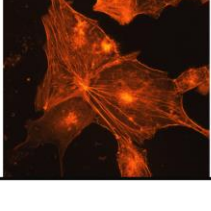
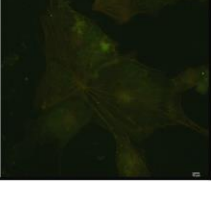
B



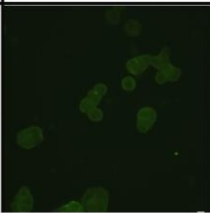
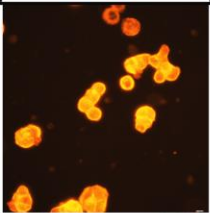
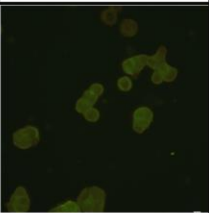
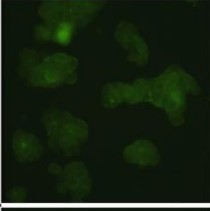
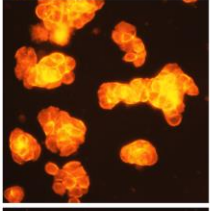
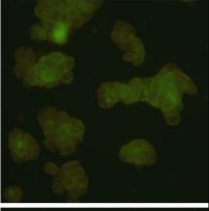
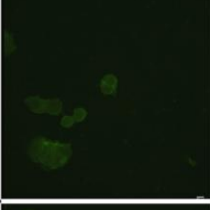
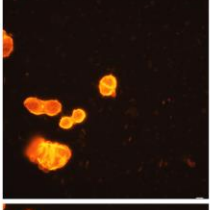
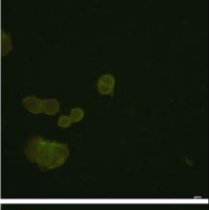
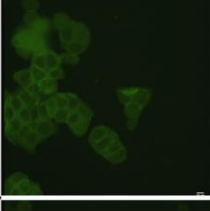
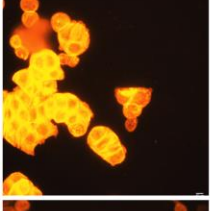
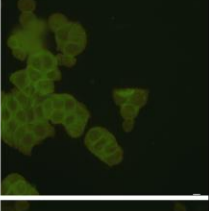
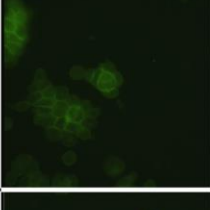
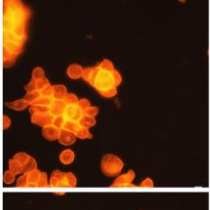
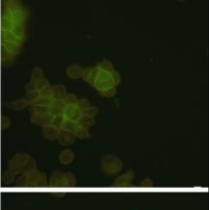
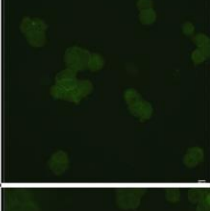
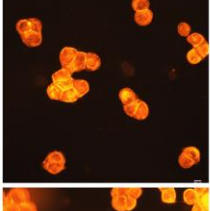
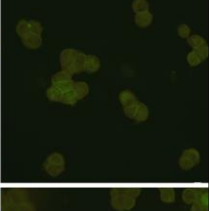
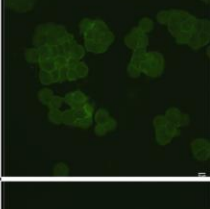
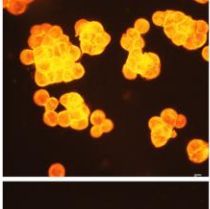
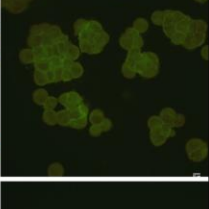
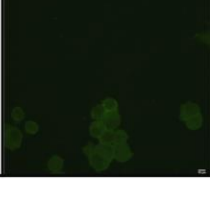
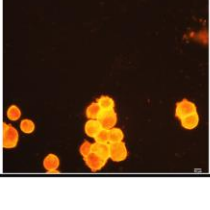
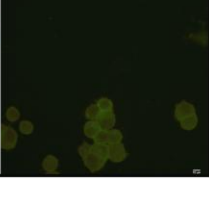
C



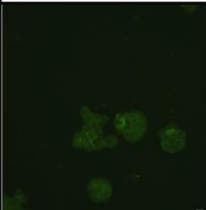
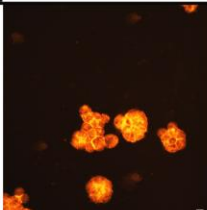
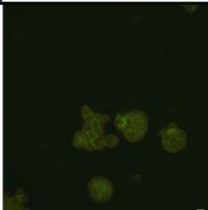
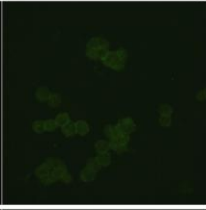
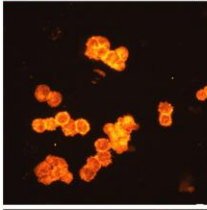
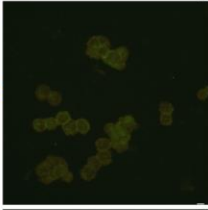
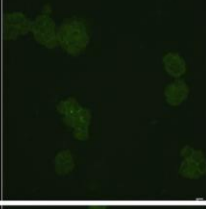
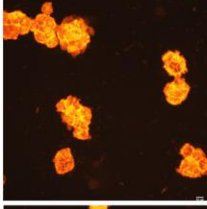
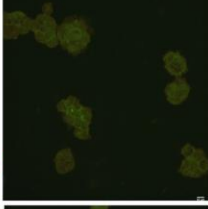
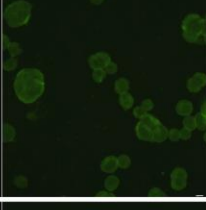
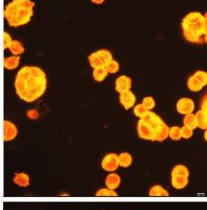
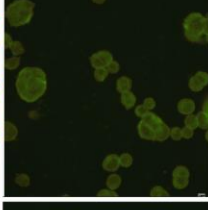
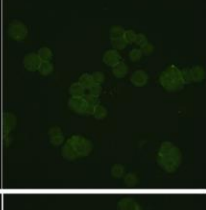
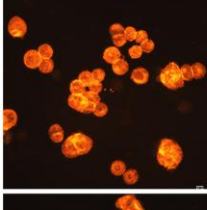
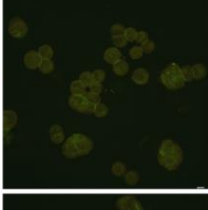
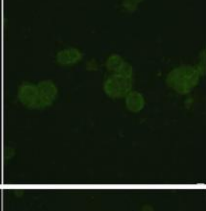
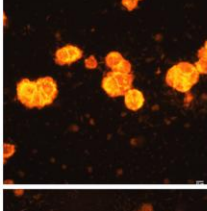
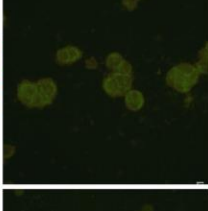
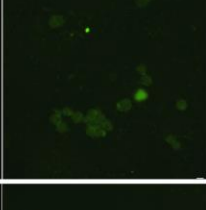
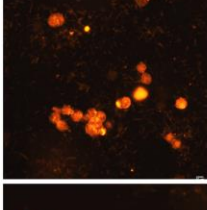
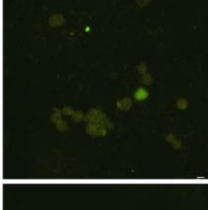
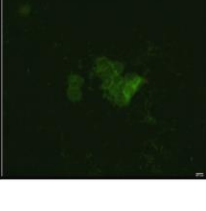
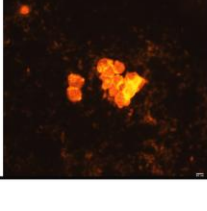
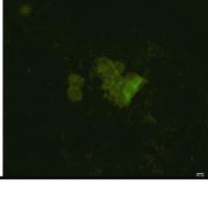
Tablica 4. Wpływ badanych substancji na lokalizację i poziom białek RhoA oraz na cytoszkielet aktynowy komórek linii CCD 841 CoTr

	RhoA	Cytoszkielet	Nalozone
Kontrola			
UA			
OA			
CPT-11			
UA + CPT-11			
OA + CPT-11			
UA + OA			
ALL			

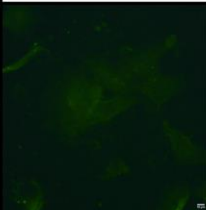
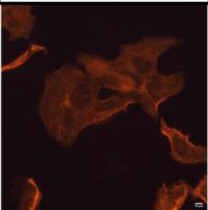
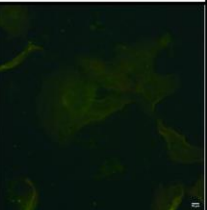
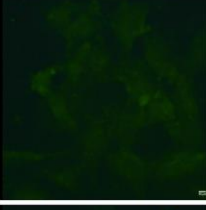
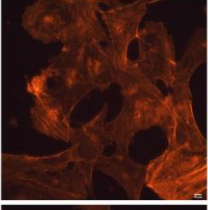
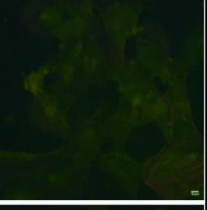
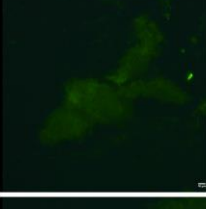
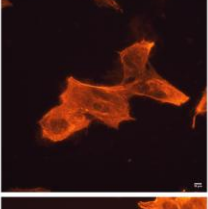
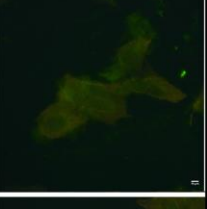
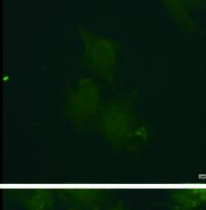
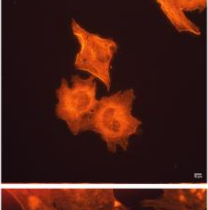
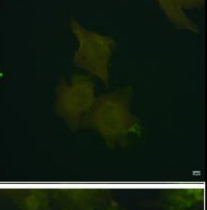
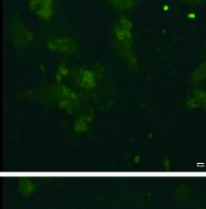
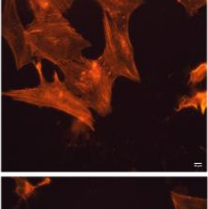
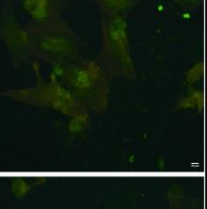
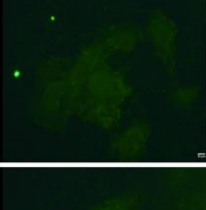
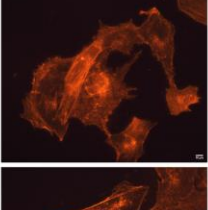
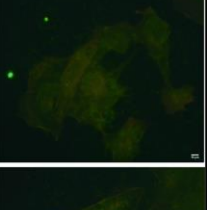
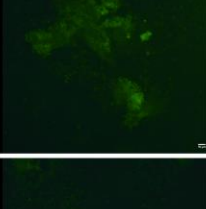
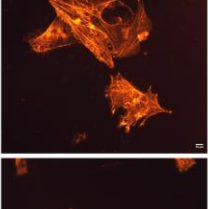
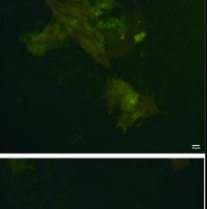
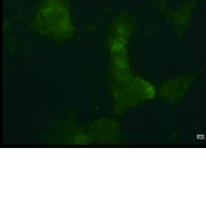
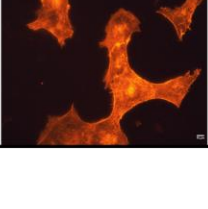
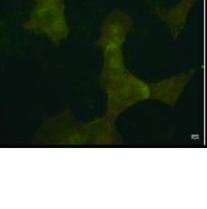
Tablica 5. Wpływ badanych substancji na lokalizację i poziom białek RhoA oraz na cytoszkielet aktynowy komórek linii HT-29

	RhoA	Cytoszkielet	Nalożone
Kontrola			
UA			
OA			
CPT-11			
UA + CPT-11			
OA + CPT-11			
UA + OA			
ALL			

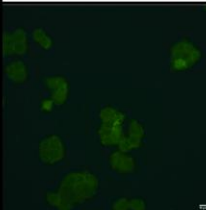
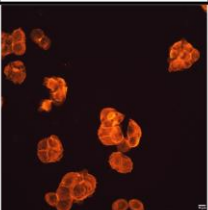
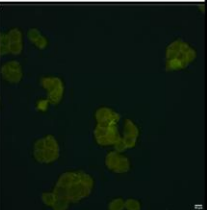
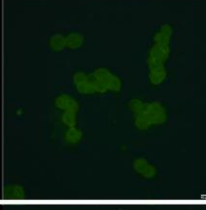
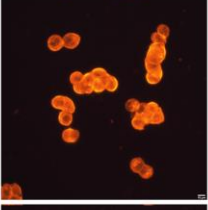
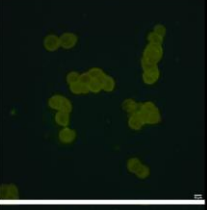
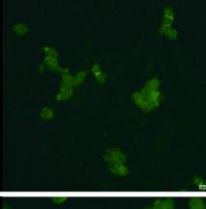
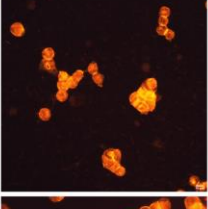
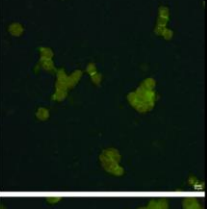
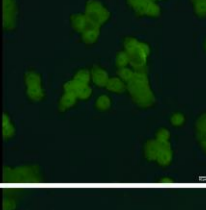
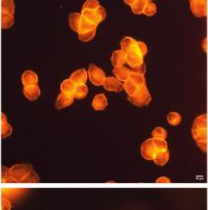
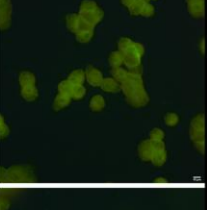
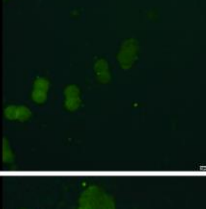
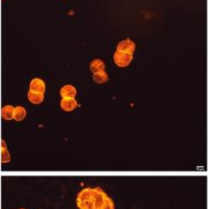
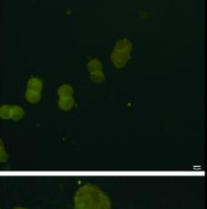
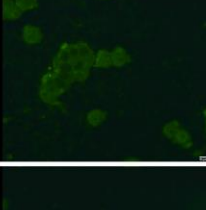
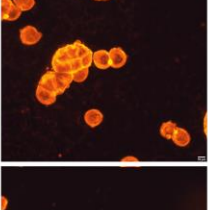
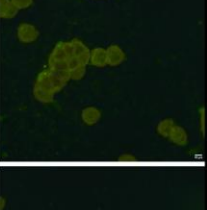
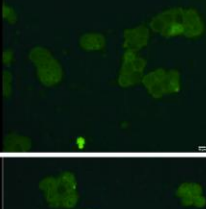
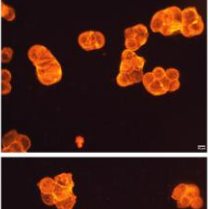
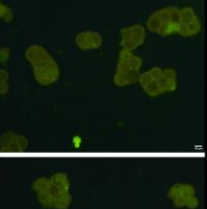
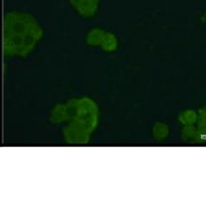
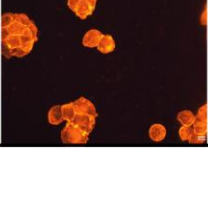
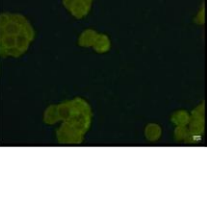
Tablica 6. Wpływ badanych substancji na lokalizację i poziom białek RhoA oraz na cytoszkielet aktynowy komórek linii SW 620

	RhoA	Cytoszkielet	Nalożone
Kontrola			
UA			
OA			
CPT-11			
UA + CPT-11			
OA + CPT-11			
UA + OA			
ALL			

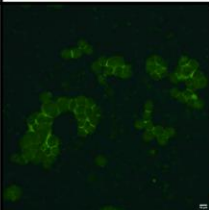
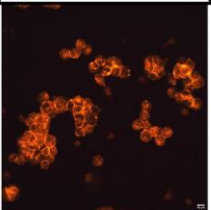
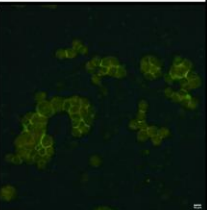
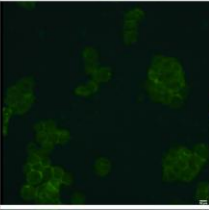
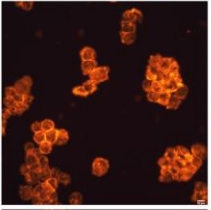
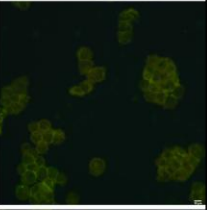
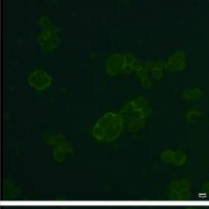
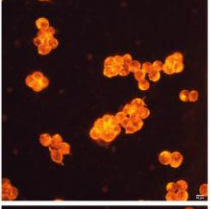
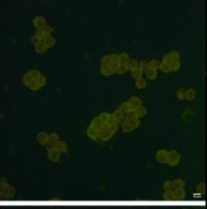
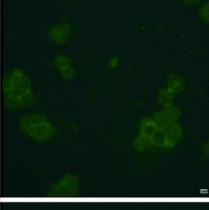
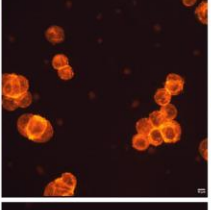
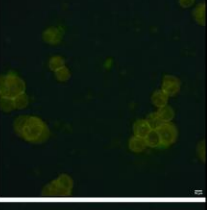
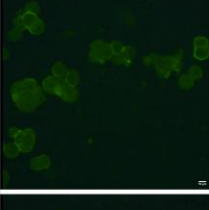
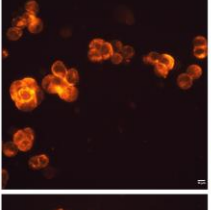
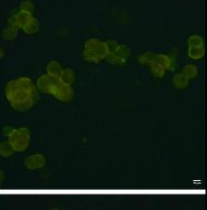
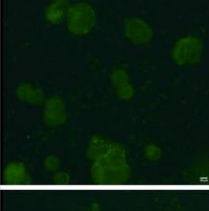
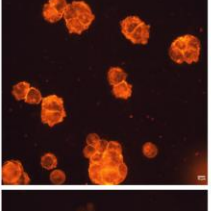
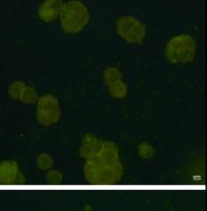
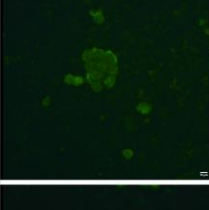
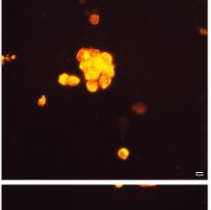
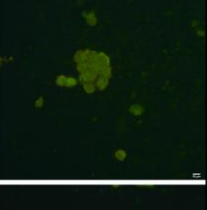
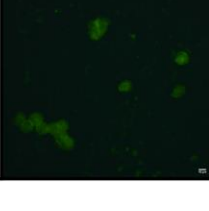
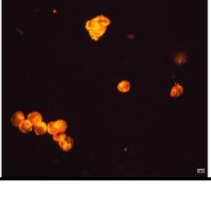
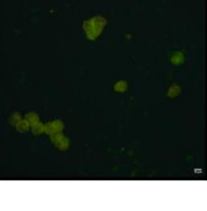
Tablica 7. Wpływ badanych substancji na lokalizację i poziom białek RhoC oraz na cytoszkielet aktynowy komórek linii CCD 841 CoTr

	RhoC	Cytoszkielet	Nalóżone
Kontrola			
UA			
OA			
CPT-11			
UA + CPT-11			
OA + CPT-11			
UA + OA			
ALL			

Tablica 8. Wpływ badanych substancji na lokalizację i poziom białek RhoC oraz na cytoszkielet aktynowy komórek linii HT-29

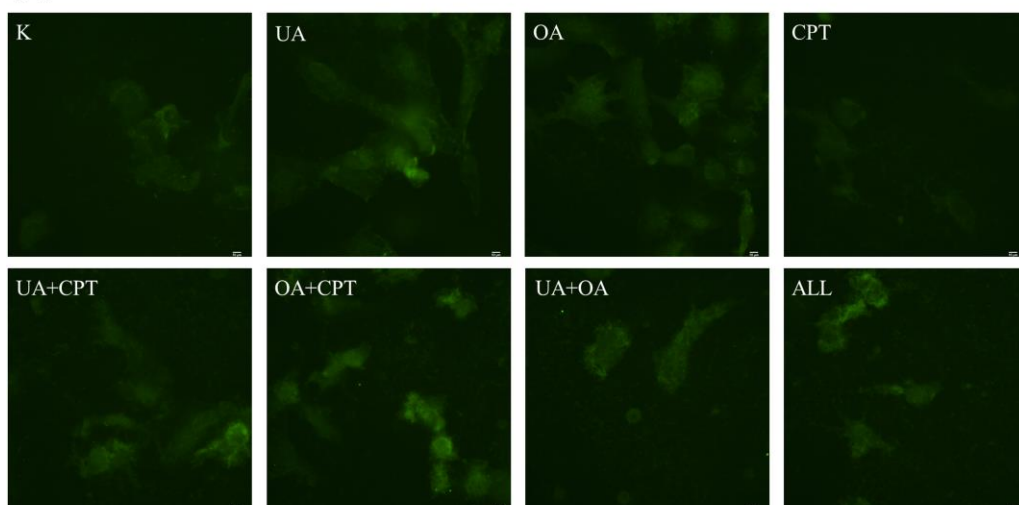
	RhoC	Cytoszkielet	Nalożone
Kontrola			
UA			
OA			
CPT-11			
UA + CPT-11			
OA + CPT-11			
UA + OA			
ALL			

Tablica 9. Wpływ badanych substancji na lokalizację i poziom białek RhoC oraz na cytoszkielet aktynowy komórek linii SW 620

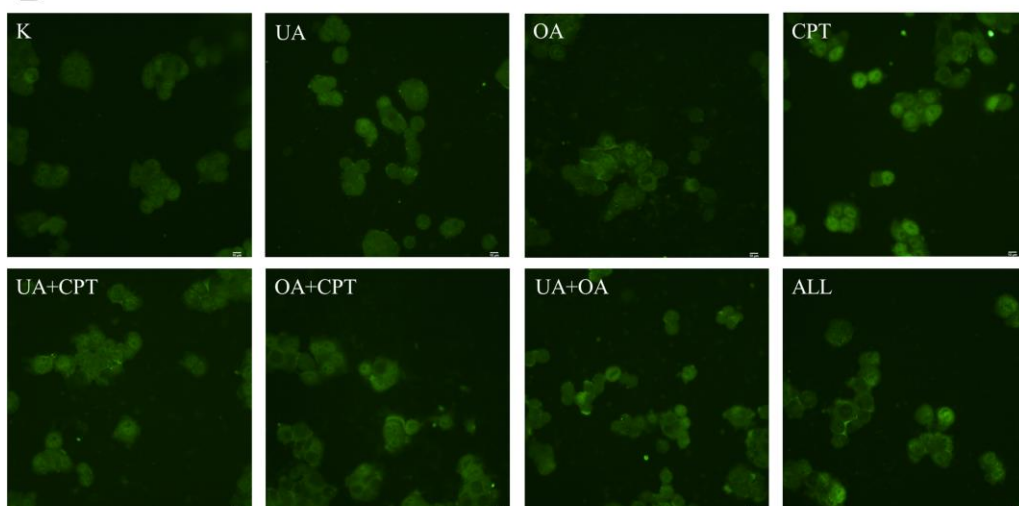
	RhoC	Cytoszkielet	Nalożone
Kontrola			
UA			
OA			
CPT-11			
UA + CPT-11			
OA + CPT-11			
UA + OA			
ALL			

Tablica 10. Wpływ badanych substancji na lokalizację i poziom białek RhoB w komórkach linii CCD 841 CoTr (A), HT-29 (B) oraz SW 620 (C)

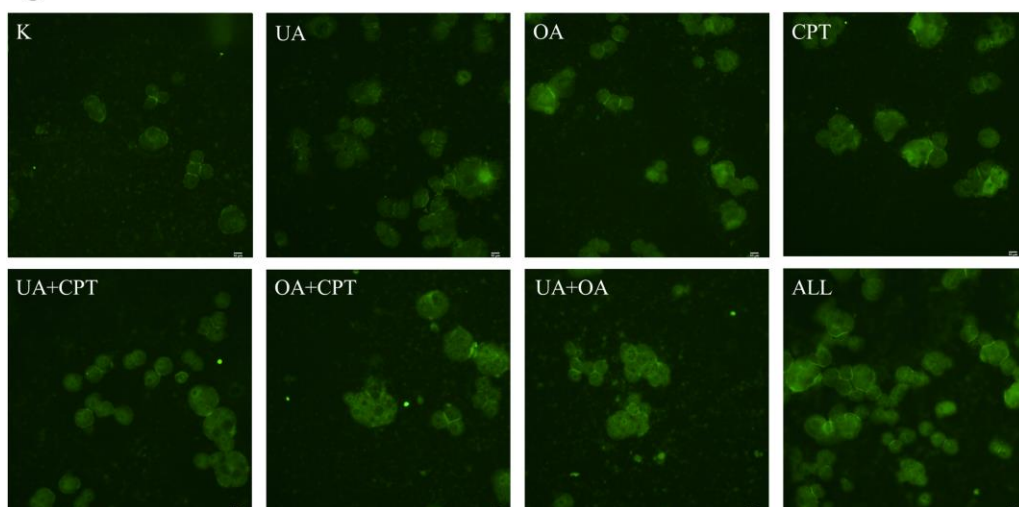
A



B

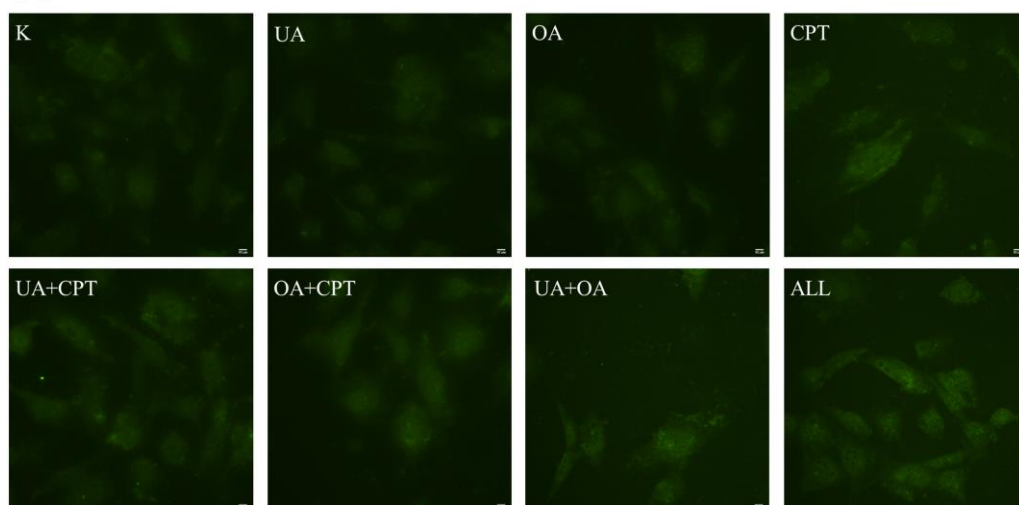


C

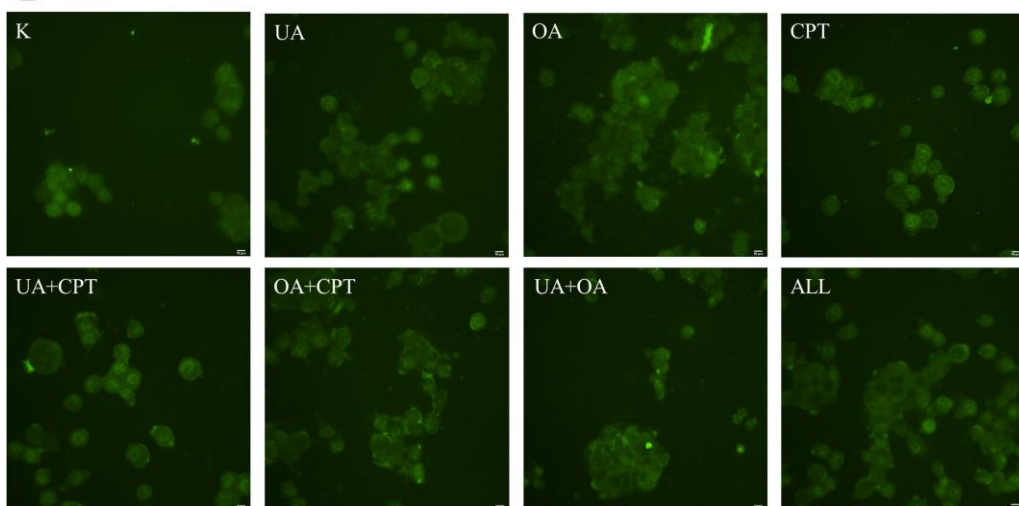


Tablica 11. Wpływ badanych substancji na lokalizację i poziom COX-2 w komórkach linii CCD 841 CoTr (A), HT-29 (B) oraz SW 620 (C)

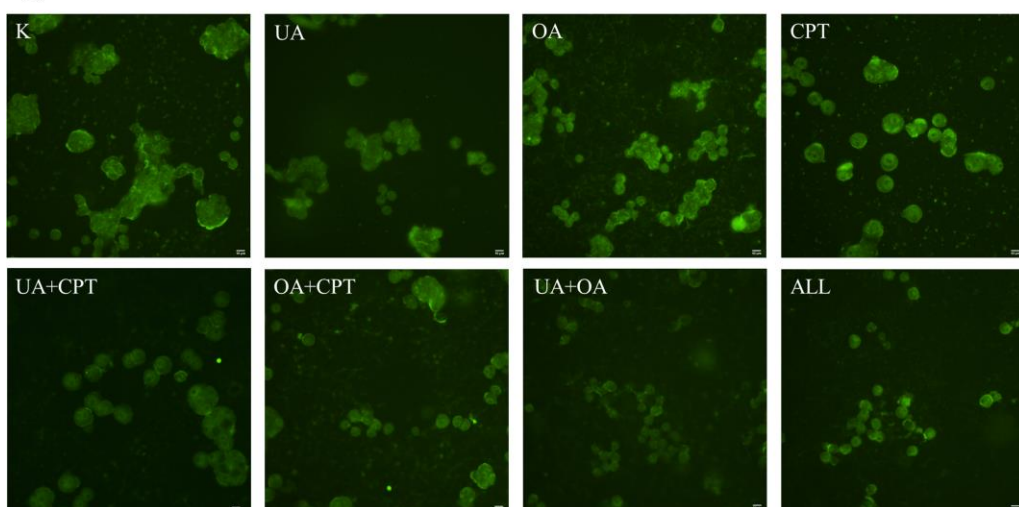
A



B

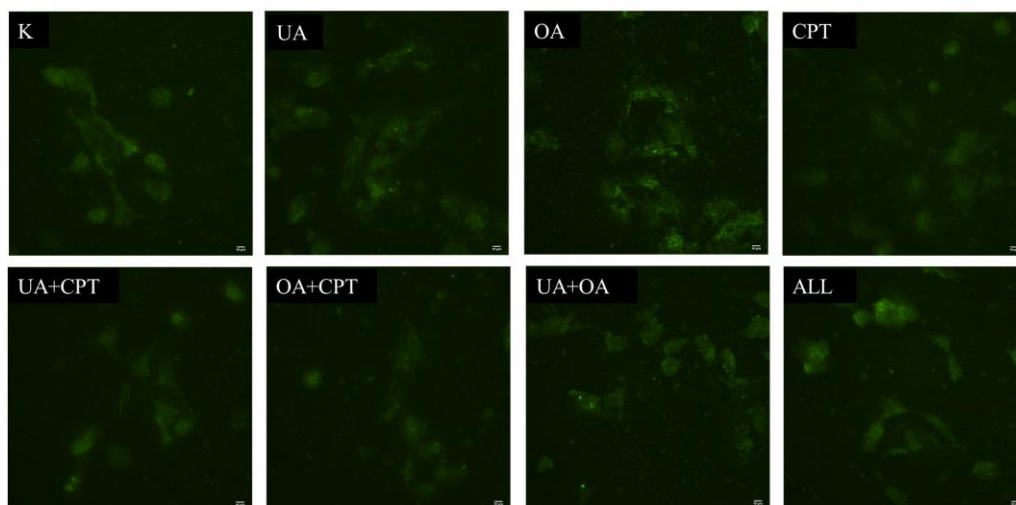


C

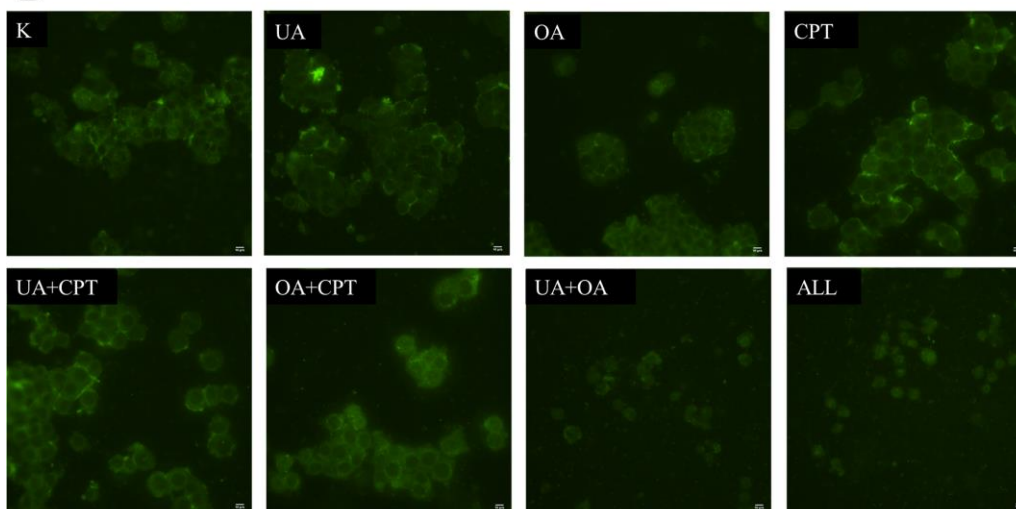


Tablica 12. Wpływ badanych substancji na lokalizację i poziom MRP w komórkach linii CCD 841 CoTr (A), HT-29 (B) oraz SW 620 (C)

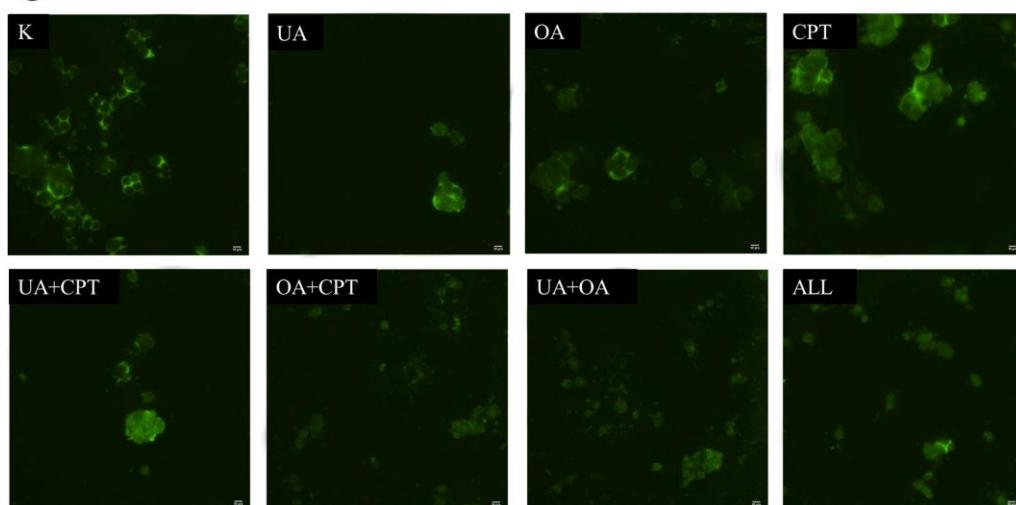
A



B



C



Podziękowania

Pragnę bardzo serdecznie podziękować:

Panu prof. Romanowi Paduchowi za ogromną życzliwość i cierpliwość, nieocenioną opiekę promotorską, cenne uwagi, naukowe i życiowe, a także 7 lat wspólnej, owocnej pracy

Arkadiuszowi Czerwonce, Katarzynie Kaławaj, Adriannie Dudek, Maćkowi Frantowi, Aleksandrze Żurek oraz pozostałym doktorantom i pracownikom Zakładu Wirusologii i Immunologii za pomoc w prowadzeniu badań, działalności naukowej i organizacyjnej oraz codzienną życzliwość i wsparcie

Dr Jackowi Pietrusiewiczowi i pracownikom Zakładu Anatomii i Cytologii Roślin za udostępnienie mikroskopu fluorescencyjnego oraz cenne uwagi dotyczące technik fluorescencji

Prof. Magdalenie Jaszek, dr hab. Annie Matuszewskiej, mgr Dawidowi Stefaniukowi, mgr Marcie Ruminowicz-Stefaniuk oraz pozostałym pracownikom Zakładu Biochemii za współpracę naukową, życzliwość oraz dysputy naukowo-życiowe

Prof. Wiesławowi Gruszeckiemu, prof. Rafałowi Luchowskiemu, dr Wojciechowi Grudzińskiemu, mgr Ewie Greli oraz pozostałym doktorantom i pracownikom Zakładu Biofizyki, Wydziału Matematyki, Fizyki i Informatyki, za współpracę naukową, otwarcie horyzontów na nowe techniki laboratoryjne oraz pokazanie nauki od innej strony

Mojej Natalii, za ciepło, nieograniczone wsparcie oraz uczynienie mnie lepszym naukowcem, dydaktykiem, człowiekiem

Rodzicom i bratu, za lata troski i wsparcia niezależnie od podejmowanych przeze mnie decyzji

Przyjaciółom, w szczególności Adrianowi, Michałowi i Patrykowi, za wiele lat wspólnie spędzonych oraz za to, że zawsze mogłem na nich liczyć, nawet jeśli oni nie mogli na mnie

Oraz pozostałym, niewymienionym.