



**UNIwersYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**

Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Bydgoszcz, 2023



**UNIwersytet
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**

Wydział Lekarski
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Aleksandra Maria Opacka

**Ekspresja cykliny Y w wybranych liniach
nowotworowych po indukcji śmierci komórki**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor:

dr hab. n. med. Agnieszka Żuryń, prof. UMK

Promotor pomocniczy:

dr n. med. Adrian Krajewski

Bydgoszcz, 2023

Spis treści

Wykaz najważniejszych skrótów i terminów	6
Wprowadzenie.....	10
1. Wstęp.....	11
1.1. Rak płuca	11
1.1.1. Linia niedrobnokomórkowego raka płuca A549	14
1.1.2. Linia niedrobnokomórkowego raka płuca H1299	15
1.2. Cykl komórkowy.....	15
1.2.1. Regulacja i regulatory cyklu komórkowego	17
1.3. Cyklina Y	19
1.3.1. Cyklina Y w szlaku sygnałowym Wnt/ β -katenina.....	20
1.3.2. Cyklina Y w procesie autofagii.....	22
1.3.3. Cyklina Y w funkcji neuronalnej	24
1.3.4. Cyklina Y w procesie spermatogenezy	24
1.3.5. Cyklina Y w procesie adipogenezy i produkcji lipidów.....	25
1.3.6. Cyklina Y w innych procesach	26
1.3.7. Cyklina Y w procesie kancerogenezy.....	26
1.4. Rodzaje śmierci komórki.....	29
1.5. Cisplatyna.....	34
1.6. Ikarytyna	36
2. Założenia i cele pracy.....	39
3. Materiały i metody	41
3.1. Hodowla i traktowanie komórek	41
3.2. Analiza przeżycia komórek w teście MTT	41
3.3. Analiza morfologii komórek metodą barwienia hematoksyliną wg Mayera.....	42
3.4. Analiza cyklu komórkowego	42
3.5. Analiza testu tworzenia kolonii.....	43
3.6. Analiza migracji komórek.....	43
3.7. Analiza tempa migracji komórek	44
3.8. Analiza rodzaju indukowanej śmierci komórek	44
3.9. Analiza ekspresji cykliny Y, białka RRM2 oraz β -kateniny przy użyciu cytometru przepływowego.....	45

3.10. Analiza ekspresji cykliny Y przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego	46
3.11. Analiza statystyczna	47
4. Wyniki	48
4.1. Ocena przeżycia komórek	48
4.1.1. Komórki linii A549 traktowane cisplatyną i ikarytyną.....	51
4.1.2. Komórki linii H1299 traktowane cisplatyną i ikarytyną	53
4.2. Ocena morfologii komórek	55
4.2.1. Komórki linii A549 traktowane cisplatyną i ikarytyną.....	55
4.2.2. Komórki linii H1299 traktowane cisplatyną i ikarytyną	61
4.3. Ocena cyklu komórkowego.....	67
4.3.1. Komórki linii A549	67
4.3.2. Komórki linii H1299	70
4.4. Ocena potencjału migracyjnego komórek.....	73
4.4.1. Ocena testu tworzenia kolonii	73
4.4.1.1. Komórki linii A549	73
4.4.1.2. Komórki linii H1299	75
4.4.2. Ocena migracji komórek	77
4.4.2.1. Komórki linii A549	78
4.4.2.2. Komórki linii H1299	79
4.4.3. Ocena tempa migracji komórek.....	81
4.4.3.1. Komórki linii A549	82
4.4.3.2. Komórki linii H1299	85
4.5. Ocena rodzaju indukowanej śmierci komórek	89
4.5.1. Komórki linii A549	89
4.5.2. Komórki linii H1299	92
4.6. Ocena ekspresji cykliny Y	97
4.6.1. Ocena ekspresji cykliny Y przy użyciu cytometrii przepływowej	97
4.6.1.1. Komórki linii A549	97
4.6.1.2. Komórki linii H1299	99
4.6.2. Ocena ekspresji cykliny Y przy użyciu metody fluorescencyjnego znakowania białek.....	100
4.6.2.1. Komórki linii A549	100

4.6.2.2. Komórki linii H1299	112
4.7. Ocena ekspresji białka RRM2 oraz β -kateniny przy użyciu metody cytometrii przepływowej.....	122
4.7.1. Ocena ekspresji RRM2.....	123
4.7.1.1. Komórki linii A549	123
4.7.1.2. Komórki linii H1299	125
4.7.2. Ocena ekspresji β -kateniny	127
4.7.2.1. Komórki linii A549	127
4.7.2.2. Komórki linii H1299	129
4.8. Kryształy ikarytyny	131
5. Dyskusja	151
6. Wnioski	164
7. Streszczenie	165
8. Summary.....	167
9. Piśmiennictwo	169
10. Załączniki	183
10.1. Zgoda Komisji Bioetycznej na przeprowadzenie badań	183

Wykaz najważniejszych skrótów i terminów

A549, komórki – linia komórkowa niedrobnokomórkowego raka płuca (*ang. Non-Small Cell Lung Cancer Cell Line*)

AC – gruczolakorak (*ang. Adenocarcinoma*)

ACD – przypadkowa śmierć komórki (*ang. Accidental Cell Death*)

ADP – adenozyndifosforan (*ang. Adenosine Diphosphate*)

AIFM1 – czynnik indukujący apoptozę związany z mitochondriami (*ang. Apoptosis Inducing Factor Mitochondria Associated 1*)

AMPA – receptor kwasu α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowego (*ang. α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid Receptor*)

AMPK – kinaza białkowa aktywowana AMP (*ang. AMP-activated Protein Kinase*)

ATCC – Amerykańska Kolekcja Kultur Komórkowych (*ang. American Type Culture Collection*)

ATP – adenozynotrifosforan (*ang. Adenosine Triphosphate*)

ATR – ataksja teleangiektazja związana z Rad3, (*ang. Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related*)

BC – rak piersi (*ang. Breast Cancer*)

BSA – albumina surowicy bydłowej (*ang. Bovine Serum Albumin*)

CCNY – cyklina Y (*ang. Cyclin Y*)

CCNYc – izoforma cytoplazmatyczna cykliny Y (*ang. cytoplasmic isoform of CCNY*)

CCNYm – izoforma błonowej cykliny Y (*ang. membrane distribution isoform of CCNY*)

CCNYL1 – cyklina Y podobna 1 (*ang. Cyclin Y-Like 1*)

CDC25 – fosfataza cyklu 25, (*ang. Cell Division Cycle 25*)

CDK – kinaza cyklinozależna (*ang. Cyclin-Dependent Kinases*)

Chk – kinaza punktu kontrolnego (*ang. Checkpoint kinase*)

CDKIs – inhibitory kinaz zależnych od cyklina (*ang. Cyclin-Dependent Kinases Inhibitor*)

C-myc – Protoonkogen MYC (*ang. MYC Proto-Oncogene*)

Cp – cisplatyna (*ang. Cisplatin*)

CYPD – cyklofilina D (*ang. Cyclophilin D*)

DAPI – 4',6-diaminoino-2-fenylindol (*ang. 4',6-Diamidino-2-Phenylindole*)

DAMP – struktury molekularne związane z uszkodzeniem (*ang. Damage Associated*)

Molecular Patterns)

DMEM – zmodyfikowane płynne podłoże wzrostowe (*ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DRP – drobnokomórkowy rak płuca (*ang. SCLC: Small Cell Lung Cancer*)

Dvl2 – (*ang. Dishevelled Segment Polarity Protein 2*)

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

E2F – rodzina genów kodujących czynniki transkrypcyjne (*ang. a group of genes that encodes a family of transcription factors (TF)*)

F-aktyna – włóknkowa postać aktyny, która powstała w wyniku polimeryzacji jej formy globularnej (G-aktyny) (*ang. F-actin*)

FBS – płodowa surowica bydlęca (*ang. Fetal Bovine Serum*)

FDA – Federalny Urząd Żywności i Leków (*ang. Food and Drug Administration*)

G – przerwa (*ang. Gap*)

GSDMD – gazdermina D (*ang. Gasdermin D*)

H1299, komórki – linia przerzutu niedrobnokomórkowego raka płuca do węzłów chłonnych (*ang. Non-Small Cell Lung Carcinoma Cell Line Derived From The Lymph Node Cell Line*)

HCC – rak wątrobowokomórkowy (*ang. Hepatocellular Carcinoma*)

HepG2, komórki – linia komórkowa raka wątroby (*ang. Hepatocellular Carcinoma Cell Line*)

HIF-1 α – czynnik indukowany hipoksją – 1 α (*ang. Hypoxia-Inducible Factor 1 α*)

IBD – nieswoiste zapalenie jelit (*ang. Inflammatory Bowel Disease*)

IC – stężenie hamujące wzrost komórek (*ang. Inhibitory Concentration*)

Ica – ikarytyna (*ang. Icaritin*)

IEC – komórki nabłonka jelit (*ang. Intestinal Epithelium Cells*)

Int – strona integracji MMTV (*ang. MMTV integration site*)

IL1 β – interleukina 1 β (*ang. interleukin 1 β*)

kaseta cykliny – *ang. cyclin box*

LCC – rak wielkokomórkowy (*ang. Large-Cell Carcinoma*)

LNM – przerzut do węzłów chłonnych (*ang. Metastasis to Lymph Nodes*)

LTP – długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (*ang. Long-Term Potentiation*)

LRP6 – białko związane z receptorem lipoprotein o niskiej gęstości 6 (*ang. Low-Density*

Lipoprotein Receptor-Related Protein 6)

MAP1LC3B-I – białko związane z mikrotubulami 1 z łańcuchem lekkim 3 Beta (*ang. Microtubule Associated Protein 1 Light Chain 3 Beta*)

Microtubule Associated Protein 1 Light Chain 3 Beta)

MLKL – mieszana linii domeny kinazy, takiej jak pseudokinaza (*ang. Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase*)

MOMP – przepuszczalność zewnętrznej błony mitochondrialnej (*ang. Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*)

MPF – czynnik promujący mitozę (*ang. M-phase Promoting Factor*)

NAD – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (*ang. Nicotinamide Adenine Dinucleotide*)

NCCD – Komitet do Spraw Nazewnictwa Śmierci komórkowej (*ang. Nomenclature Committee on Cell Death*)

NDRP – niedrobnokomórkowy rak płuca (*ang. NSCLC: Non-Small Cell Lung Cancer*)

PARP – inhibitory polimerazy poli (ADP-rybozy) (*ang. Poly (ADP-Ribose) Polymerase*)

PBS – roztwór soli w buforze fosforanowym (*ang. Phosphate Buffered Saline*)

PFA – paraformaldehyd (*ang. Paraformaldehyde*)

PIP3 – trifosforan fosfatydyloinozytolu (*ang. Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*)

PI3K – (kinaza 3-fosfatydyloinozytoly, *ang. Phosphoinositide 3-kinases*)

PPAR γ – receptor gamma aktywowany przez proliferatory peroksysomów (*ang. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma*)

pRb – białko glejaka siatkówki (*ang. Retinoblastoma protein*)

PTEN – fosfataza i homolog tensyny, (*ang. Phosphatase And Tensin Homolog*)

p53 – czynnik transkrypcyjny o własnościach supresora nowotworowego (*ang. tumor protein p53*)

R – punkt kontrolny (*ang. check point*)

RCC – rak nerkowokomórkowy (*ang. Renal Cell Carcinoma*)

RCD – regulowana śmierć komórki (*ang. Regulated Cell Death*)

RIPK – kinaza białkowa oddziałująca z receptorem (*ang. Receptor Interacting Protein Kinase*)

RPMI 1640 – płynne medium wzrostowe (*ang. Roswell Park Memorial Institute 1640*)

RRM2 – podjednostka reduktazy rybonukleotydowo-difosforanowej M2 (*ang. Ribonucleotide Reductase Regulatory Subunit M2*)

SCC – rak płaskonabłonkowy (*ang. Squamous Cell Carcinoma*)

shRNA – krótki fragment RNA o strukturze spinki do włosów (*ang. short hairpin RNA*)

TCF – czynnik transkrypcyjny (*ang. The transcription factor*)

tj. – zależnie od występowania: „to jest” lub „taki(e) jak”

TNBC – potrójnie ujemny rak piersi (*ang. Triple-Negative Breast Cancer*)

TP53 – gen kodujący białko p53, (*ang. Tumor Suppressor Genes*)

TRAIL – ligand indukujący apoptozę związany z czynnikiem martwicy nowotworu (*ang. Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand*)

ULK1 – kinaza serynowo-treoninowa (*ang. Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1*)

WEE – kinaza WEE (*ang. WEE kinase*)

WG – gen Wingless (*ang. Wingless Gene*)

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (*ang. World Health Organization*)

qRT-PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (*ang. Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR*)

Wprowadzenie

Choroby nowotworowe stanowią poważny problem zdrowia publicznego oraz jedną z głównych przyczyn zgonów na całym świecie [1]. Kancerogeneza jest procesem wieloetapowym, w którym zachodzi niekontrolowany podział komórek prowadzący do zaburzeń pracy pojedynczych narządów i (lub) układów, a ostatecznie do śmierci. Komórki już w początkowych fazach procesu nowotworzenia przestają reagować na czynniki hamujące pochodzące z wewnątrz (niedotlenienie, niedobór substancji odżywczych) i zewnątrz (niedobór czynników wzrostu, zahamowanie kontaktowe) [2]. Wieloletnie badania sugerują, że nasilona proliferacja nowotworowa związana jest z nieodwracalnymi zmianami w genomie komórki, które prowadzą do zaburzenia mechanizmów regulatorowych i naprawczych. Jedną z głównych cech komórek nowotworowych jest niekontrolowana proliferacja, dlatego też nowotwory ze względu na występujące w nich aberracje często nazywane są „chorobami cyklu komórkowego” [3]. Cykl komórkowy regulowany jest przez szereg białek oraz punktów kontrolnych mających za zadanie monitorowanie przebiegu poszczególnych faz cyklu komórkowego oraz decydujących o warunkowym przejściu do kolejnych jego etapów. Do głównej grupy regulatorów cyklu komórkowego należą cykliny i kinazy cyklinozależne (CDKs, *ang. Cyclin-Dependent Kinases*). Cykliny i CDKs tworzą aktywne kompleksy, w których cyklina pełni rolę podjednostki regulatorowej, natomiast kinaza cyklinozależna pełni funkcję podjednostki katalitycznej. Rodzaj kinazy i cykliny decyduje o możliwości formowania różnych typów kompleksów mających zdolność aktywacji wielu białek odpowiadających za przejście między fazami cyklu komórkowego [4]. Deregulacja ekspresji białek cyklu podziałowego staje się obecnie przedmiotem intensywnych badań, ponieważ zaburzenia w ich ekspresji i regulacji mogą przyczyniać się do procesu kancerogenezy. Nieprawidłowa ekspresja cyklin została wykazana w wielu rodzajach nowotworów złośliwych, gdzie nadmierna proliferacja komórek nowotworowych, zdolność do przerzutowania, a także zaburzone procesy śmierci komórkowej, czy lekooporność związane były z ich nadekspresją. Zasadne jest zatem dokładne poznanie mechanizmów działania białek regulatorowych cyklu życiowego komórki w aspekcie ich znaczenia w prewencji, diagnostyce i leczeniu chorób nowotworowych [5].

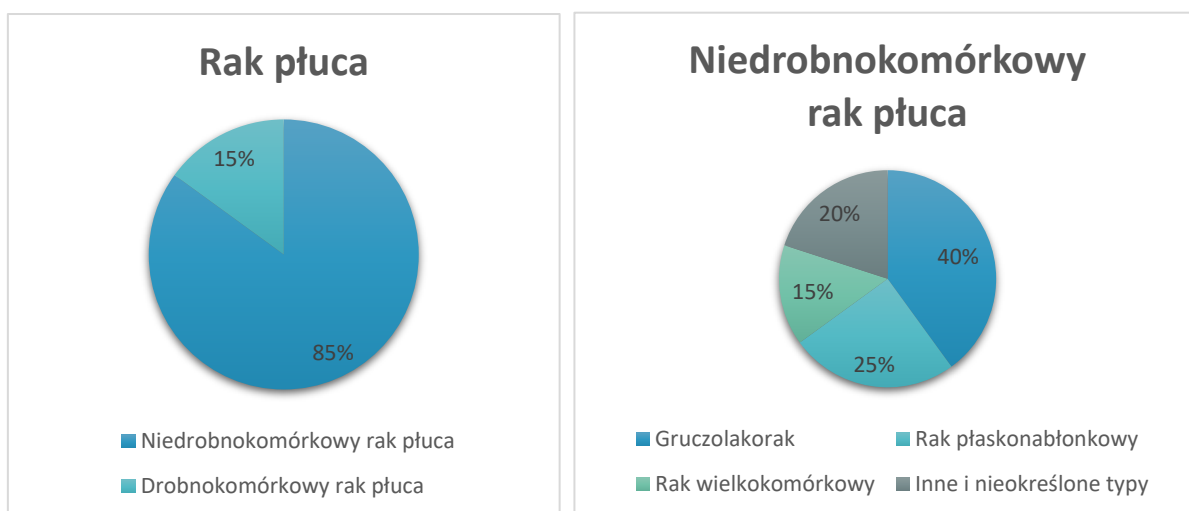
1. Wstęp

1.1. Rak płuca

Według statystyk Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *ang. World Health Organization*) nowotwory odpowiadają za około 19.4 milionów zachorowań rocznie (dane na rok 2020), a do najczęstszych pod względem zdiagnozowanych nowych przypadków należą: rak piersi (BC, *ang. Breast Cancer*) (około 2,26 miliona), rak płuca (2,21 miliona), rak okrężnicy i odbytnicy (1,93 miliona) oraz rak prostaty (1,41 miliona). Śmiertelność wywołana chorobami nowotworowymi kształtuje się na poziomie około 10 milionów osób rocznie, a do najczęstszych przyczyn zgonów w roku 2020 zalicza się rak płuca (1,8 miliona zgonów), rak okrężnicy i odbytnicy (około 916 tysięcy zgonów) oraz rak wątroby (około 800 tysięcy zgonów) [6,7]. Dla porównania według danych GLOBOCAN szacowana liczba nowych przypadków nowotworów w roku 2040 może wynosić nawet 28,9 miliona, natomiast śmierć wywołaną chorobą może ponieść 16,2 miliona osób [8]. Nowotwór powstaje w wyniku transformacji normalnych komórek w komórki nowotworowe w wieloetapowym procesie, który na ogół przechodzi od zmiany przedrakowej do nowotworu złośliwego [9]. Za kluczowe czynniki odpowiadające za transformację nowotworową uważa się między innymi czynniki fizyczne (promieniowanie jonizujące i ultrafioletowe), biologiczne (infekcje wywołane przez wirusy, bakterie i grzyby) oraz chemiczne (składniki dymu papierosowego, azbest, zanieczyszczenia żywności, a także nadmierne spożywanie alkoholu) [10]. Zwiększenie ryzyka zachorowania na nowotwory złośliwe wiąże się również ze zbyt szybkim wzrostem i starzeniem się społeczeństwa, a także z nadwagą i otyłością, która uznawana jest za plagę XXI wieku [11]. W walce z chorobami nowotworowymi od lat wykorzystywało się konwencjonalne sposoby leczenia w zależności od rodzaju nowotworu, stopnia zaawansowania choroby, a także umiejscowienia guza. Należą do nich między innymi chemioterapia, radioterapia czy zabiegi chirurgiczne. Niektórzy pacjenci otrzymują monoterapię, ale w większości przypadków stosuje się jednak leczenie skojarzone (na przykład chirurgia z chemioterapią, czy chemioterapia z radioterapią). Z biegiem lat poczyniono znaczne postępy i wprowadzono nowe metody leczenia pacjentów onkologicznych, takie jak terapia komórkami macierzystymi, terapia celowana, stosowanie naturalnych przeciwutleniaczy, terapia hemodynamiczna, a nawet terapia ablacyjna kojarzona najczęściej z zabiegami kardiologicznymi [12,13]. Poszukiwanie

nowych metod leczenia spowodowane jest nie tylko rozwojem medycyny, ale również opornością wielu rodzajów nowotworów na konwencjonalne metody leczenia, a także próbą ograniczenia skutków ubocznych przeprowadzonej terapii [14].

Rak płuca należący do grupy najczęściej występujących nowotworów złośliwych, dzielony jest na kilka typów i podtypów histologicznych, które charakteryzują się zróżnicowaniem fenotypowym, niejednorodną etiologią, lokalizacją w płucach, a także sposobem powstawania przerzutów czy rokowaniem [15]. Około 80-85% wszystkich przypadków raka płuca należy do grupy niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP, ang. NSCLC: *Non-Small Cell Lung Cancer*), natomiast pozostałe 15-20% rozpoznanych nowotworów płuca należy do typu drobnokomórkowego raka płuca (DRP ang. SCLC: *Small Cell Lung Cancer*) [12].

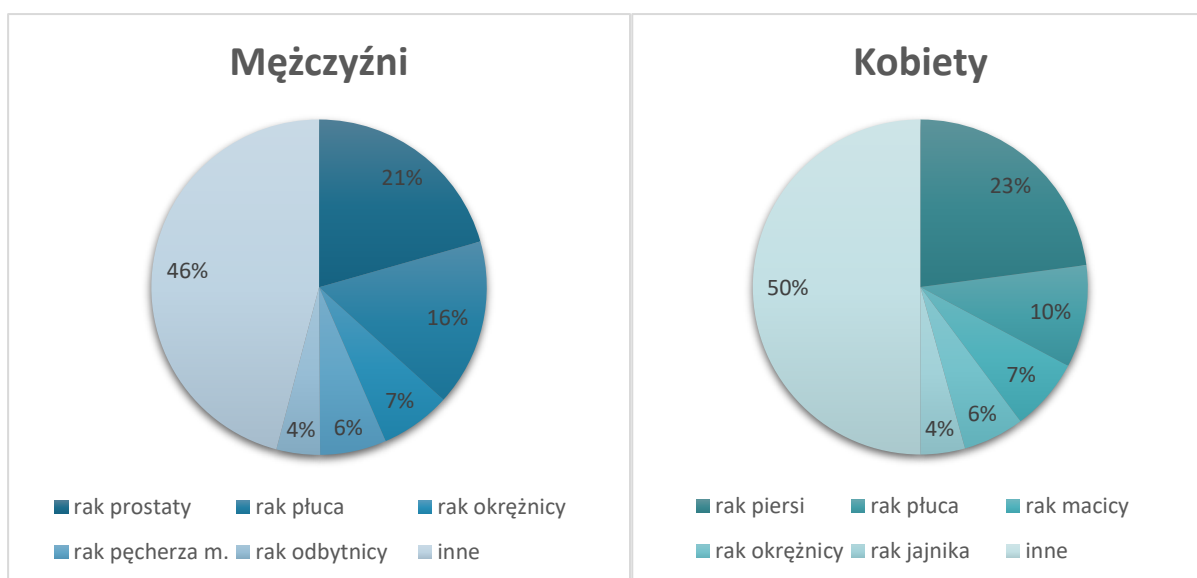


Ryc. 1. Podział histologiczny nowotworów płuca [Opracowano na podstawie Schabath (2019) [12]].

Dane wskazują, że najczęściej diagnozowanymi podtypami histologicznym niedrobnokomórkowego raka płuca są gruczolakorak (około 40% wszystkich przypadków), rak płaskonabłonkowy (około 25%) oraz rak wielkokomórkowy (około 15%). Pozostałe 20% zdiagnozowanych przypadków niedrobnokomórkowego raka płuca to inne i nieokreślone typy nowotworu, do których zaliczany jest między innymi mięsak [16].

Rak płuca uważany jest za jeden z najbardziej złośliwych typów nowotworu ze względu na częste występowanie, wysoką ilość zgonów pacjentów wywołanych chorobą, ciężki przebieg choroby oraz złe rokowanie. W Polsce Krajowy Rejestr Nowotworów w roku 2019,

otrzymał informacje o 171 tysiącach nowych przypadków zachorowania na nowotwory, a rak płuca znajdował się na 2 miejscu najczęściej występujących nowotworów zarówno u kobiet (10%), jak i u mężczyzn (16%). Śmierć spowodowaną chorobami nowotworowymi poniosło około 100 tysięcy osób, a nowotwory płuca okazały się najczęstszą przyczyną zgonów bez względu na płeć [17]. Do głównych przyczyn tak wysokiej liczby zgonów pacjentów, zalicza się między innymi bezobjawowy przebieg choroby we wczesnych stadiach oraz oporność na standardowe leki cytostatyczne. Skuteczne leczenie nowotworów płuca uniemożliwia również wiek chorych (często zaawansowany) i wiążące się z nim choroby współistniejące. Prowadzi to do faktu, iż 5-letnie przeżycie chorych dotyczy około 15% pacjentów [18,19].



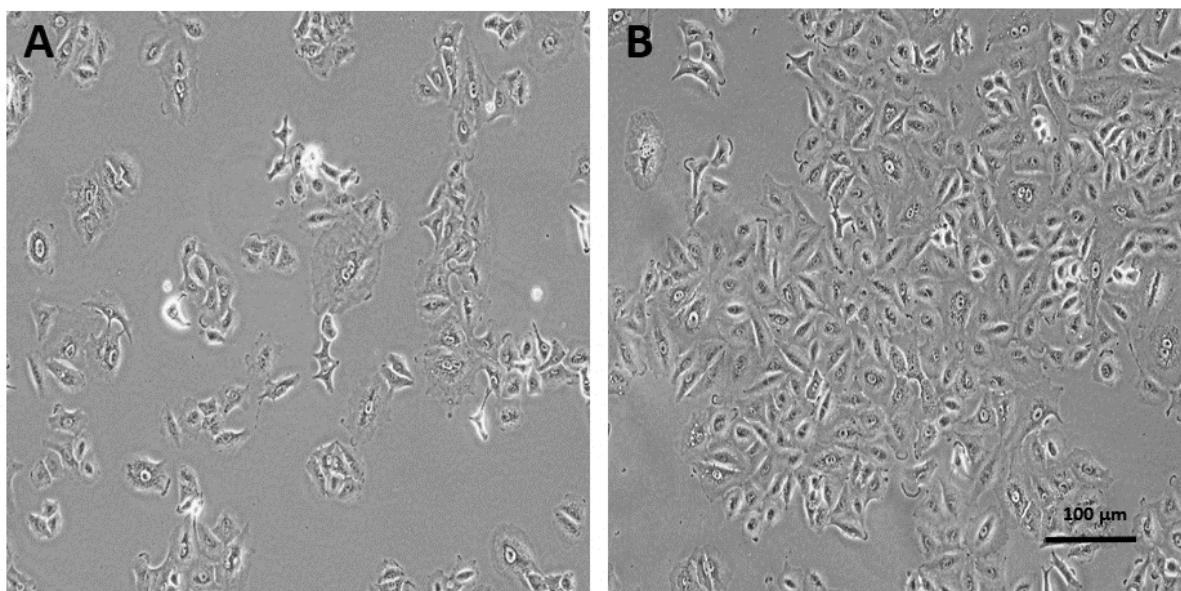
Ryc. 2. Częstość występowania różnych rodzajów nowotworów w Polsce w roku 2019. [Opracowano na podstawie Didkowska i wsp. (2022) [13]].

Najczęstszym czynnikiem ryzyka wpływającym na zachorowanie na ten typ nowotworu złośliwego jest nikotynizm, któremu przypisuje się około 90% przypadków zachorowania na nowotwór płuca u osób palących i co trzeci przypadek u osób palących biernie. W XX wieku nastąpił drastyczny wzrost palenia tytoniu, co w konsekwencji spowodowało również wzrost liczby zachorowań na raka płuca. Podczas spalania wyrobów tytoniowych uwalnianych jest około 60 różnych substancji kancerogennych, które mają bezpośredni wpływ na proces nowotworzenia. Do najbardziej szkodliwych należą między innymi benzopiren (organiczny związek chemiczny z grupy węglowodorów aromatycznych),

nitrozoaminy, a także azotany [20]. Z drugiej strony palacze, którzy pracowali w obecności azbestu, są od 50 do 90 razy bardziej narażeni na zachorowanie niż ci, którzy nigdy nie byli narażeni na kontakt z azbestem lub dymem tytoniowym. Do innych czynników ryzyka zachorowania na raka płuca należą również nieodpowiednia dieta, zaawansowany wiek, nawracające stany zapalne, a także zanieczyszczone powietrze [21].

1.1.1. Linia niedrobnokomórkowego raka płuca A549

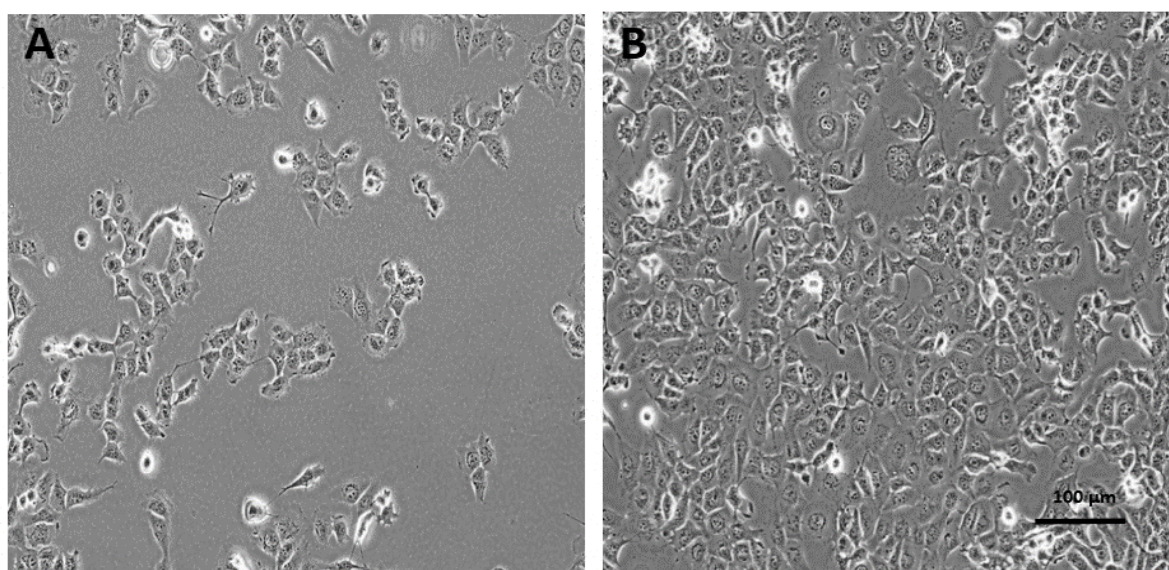
Linia A549 to komórki niedrobnokomórkowego raka płuca. Komórki te są gruczolakorakiem nabłonka pęcherzyków płuc. W 1972 roku linia A549 została wyizolowana przez D.J. Giard poprzez usunięcie i hodowlę rakowej tkanki płucnej pobranej od 58-letniego mężczyzny rasy białej [22]. W warunkach *in vivo* komórki te są płaskonabłonkowe i odpowiadają za dyfuzję niektórych substancji (np. wody i elektrolitów) w pęcherzykach płucnych. Natomiast *in vitro* rosną one adherentnie jako monowarstwy. Barwią się pozytywnie dla keratyny, a także zdolne są do syntezy lecytyny dzięki szlakom cytydyny i dwufosfocholinyl. Dodatkowo mają wysoki poziom nienasyconych kwasów tłuszczowych, które są istotne dla utrzymania odpowiedniego stopnia fosfolipidów w błonie komórkowej [23].



Ryc. 3. Komórki linii A549. A – Zdjęcie po 24 godzinach hodowli. B – Zdjęcie po 48 godzinach hodowli. Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu świetlnego z kamerą OLYMPUS oraz aplikacji EPview™ (badania własne).

1.1.2. Linia niedrobnokomórkowego raka płuca H1299

Linia komórkowa H1299 została wyizolowana przez A.F. Gazdar i J.D. Minna z materiału pobranego od 43-letniego białego mężczyzny, który otrzymywał wcześniej radioterapię. Jest to przerzut niedrobnokomórkowego raka płuca do węzłów chłonnych (*ang. non-small cell lung carcinoma cell line derived from the lymph node*) [24]. Komórki linii H1299 są komórkami podobnymi do nabłonka, mają homozygotyczną częściową delecję genu TP53 (gen kodujący białko p53, *ang. tumor suppressor genes*), a w rezultacie brak ekspresji białka p53 (czynnik transkrypcyjny o własnościach supresora nowotworowego, *ang. tumor protein p53*) [25]. Komórki linii H1299 tak samo jak komórki linii A549 rosną adherentnie w monowarstwach w warunkach laboratoryjnych i barwią się pozytywnie dla keratyny. Dodatkowo komórki linii H1299 wydzielają hormon peptydowy neuromedynę B, ale nie peptyd uwalniający gastrynę [24].



Ryc. 4. Komórki linii H1299. A – Zdjęcie po 24 godzinach hodowli. B – Zdjęcie po 48 godzinach hodowli. Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu świetlnego z kamerą OLYMPUS oraz aplikacji EPview™ (badania własne).

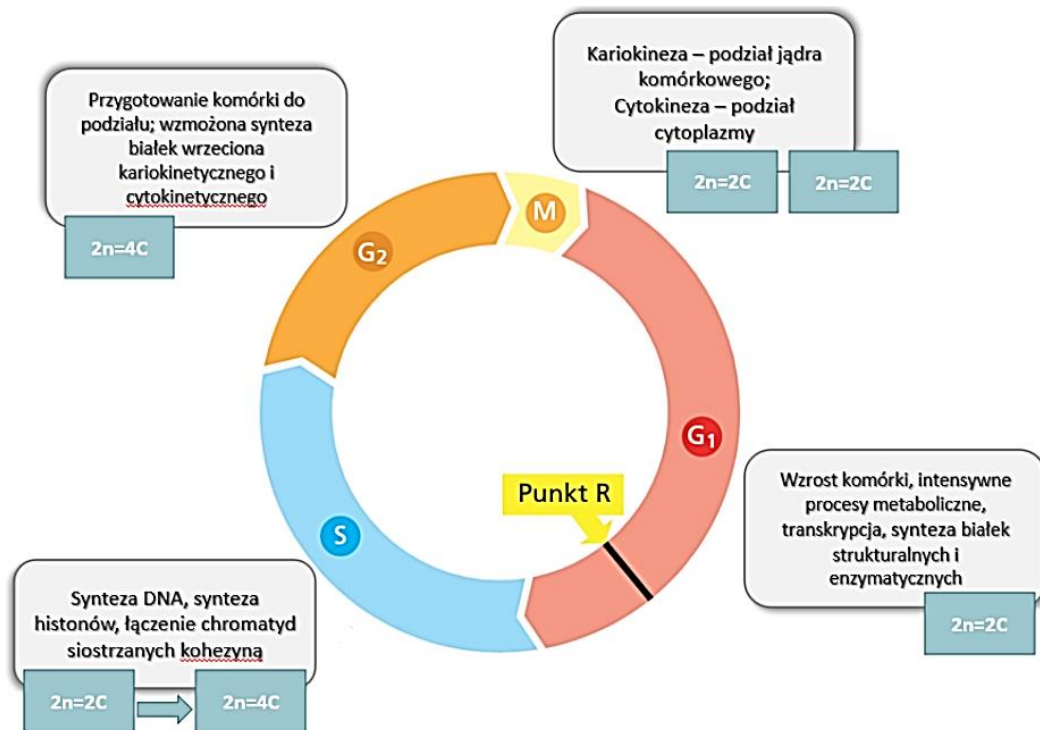
1.2. Cykl komórkowy

Jak najdokładniejsze poznanie podłoża molekularnego procesu nowotworzenia oraz znalezienie markerów ułatwiających wczesną diagnostykę ma coraz większe znaczenie dla skuteczności terapii przeciwnowotworowej. Transformacja nowotworowa zostaje

zapoczątkowana w wyniku mutacji powstałych podczas proliferacji i różnicowania komórek, syntezy i naprawy DNA, a także na drodze regulacji procesu apoptozy. Niezmieniony przebieg wymienionych procesów wyznaczany jest przez poprawny przebieg cyklu życiowego komórki, który jest bardzo uporządkowanym i ściśle regulowanym procesem obejmującym wiele punktów kontrolnych. Rozregulowanie delikatnej sieci cyklu komórkowego leży u podstaw procesu nowotworzenia [3,9,26].

Cykl komórkowy (cykl podziałowy, cykl mitotyczny) składa się interfazy, czyli faz: G1, S i G2 oraz mitozy - fazy M, których następstwem jest powstanie dwóch komórek potomnych o identycznym materiale genetycznym jaki zawiera komórka macierzysta. Do najważniejszych faz należy faza S (w czasie której następuje replikacja materiału genetycznego) oraz faza M (podczas której następuje podział jądra komórkowego oraz cytoplazmy). Jak wspomniano wcześniej w cyklu życiowym komórki wyróżnia się również fazy G1 i G2, które potocznie nazywane są przerwami (G, *ang.* *Gap*). Pierwsza przerwa (G1), w czasie której następuje odbudowa komórki po podziale znajduje się po fazie M. W tym czasie komórka staje się wrażliwa na sygnały wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe, a także przeprowadza intensywną syntezę białek regulatorowych, enzymów oraz RNA. Następnie komórka może przejść do fazy S, gdzie zsyntetyzowane enzymy wykorzystywane są do replikacji DNA i odpowiadają za napędzanie cyklu albo do fazy spoczynkowej G0. W fazie G0 komórka jest nadal funkcjonalna, ale nie ulega już dalszym podziałom. W stanie spoczynku komórka może przebywać przez dłuższy czas, a następnie pod wpływem czynników fizycznych lub chemicznych powrócić do kontynuacji cyklu komórkowego. Przykładem takich komórek są limfocyty, które ponowne wejście do cyklu mogą uzyskać pod wpływem odpowiedniego antygeny. Jednakże istnieją komórki, które w fazie G0 różnicują się terminalnie przez co nie mogą powrócić do cyklu komórkowego (na przykład komórki nerwowe) lub takie, które w stan spoczynkowy nie wchodzi w ogóle i nieskończenie powtarzają cykl komórkowy (na przykład komórki nowotworowe). Z fazy G0 komórka może ponownie wejść do fazy G1 i po przekroczeniu punktu restrykcyjnego kontynuować cykl komórkowy przechodząc w fazę S cyklu życiowego komórki lub obumrzeć. Po fazie S komórka przechodzi do fazy G2, gdzie przygotowuje się do wejścia w mitozę. W tej części cyklu komórka nadal rośnie, syntetyzuje białka i enzymy oraz

reorganizuje swoje wnętrze przygotowując się do mitozy. Na tym etapie możliwe są jeszcze naprawy uszkodzeń powstałych we wcześniejszych etapach cyklu komórkowego [27–30].



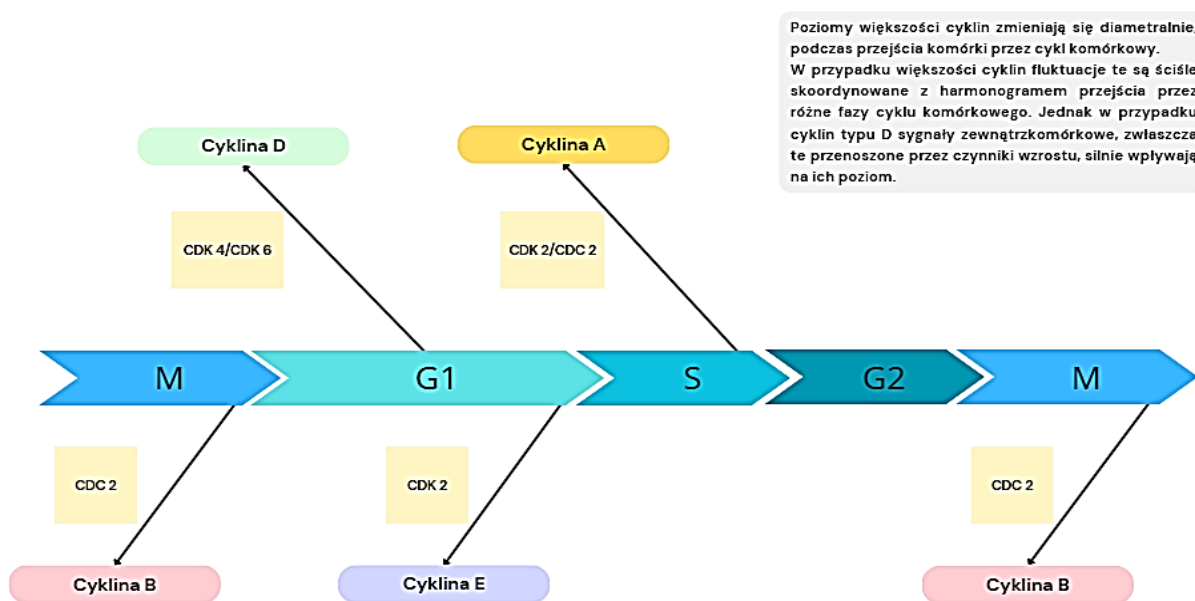
Ryc. 5. Przebieg cyklu komórkowego. Procesy zachodzące w poszczególnych fazach cyklu wraz ze zmianą ilości materiału genetycznego w komórce.

1.2.1. Regulacja i regulatory cyklu komórkowego

Cykl życiowy komórki jest procesem bardzo złożonym. Jest to szereg zmian fizycznych, chemicznych i strukturalnych komórki, który kontrolowany jest przez białka cyklu komórkowego oraz punkty kontrolne.

Po ukończeniu podziału mitotycznego komórki potomne wchodzi w fazę G₁. W tej części cyklu komórka musi przejść między innymi przez punkt kontrolny (R), który odpowiada za monitorowanie poprawności struktury materiału genetycznego. Na tym etapie następuje również wzmożona synteza białek regulatorowych, takich jak cykliny oraz kinazy cyklinozależne (CDKs), które są enzymami napędzającymi cykl komórkowy, a także inhibitory kinaz zależnych od cyklin (CDKI, *ang. Cyclin-Dependent Kinases Inhibitor*), które hamują aktywność CDKs. Kinazy zależne od cyklin stają się aktywne dopiero w momencie utworzenia kompleksu z odpowiednią cyklina. Za poprawne przejście komórki przez fazę G₁ cyklu

podziałowego odpowiadają kompleksy cykliny D1 z CDK4, cykliny D2 również z CDK4 oraz cykliny D3 z CDK6. Kompleksy cyklin D/CDK4 lub cyklin D/CDK6 fosforylują i inaktywują pRB (białko Retinoblastoma, *ang. Retinoblastoma protein*), w wyniku czego następuje aktywacja czynnika transkrypcyjnego E2F (rodzina genów kodujących czynniki transkrypcyjne, *ang. a group of genes that encodes a family of transcription factors (TF)*) oraz transkrypcja cykliny A i cykliny E. Po ukończeniu wszystkich procesów głównie dzięki kompleksowi cyklina E/CDK2 komórka przechodzi do fazy S cyklu komórkowego. W tym czasie następuje transport cyklin fazy S (cyklina A, E/CDK2) do jądra komórkowego, programowana synteza DNA oraz podwojenie genomu. W razie uszkodzenia DNA następuje gwałtowne zahamowanie cyklu komórkowego przez białko p53, w punkcie kontrolnym fazy S. Cykl zostaje zahamowany do momentu naprawienia uszkodzeń DNA.



Ryc. 6. Ekspresja cyklin w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Miejsce łączenia cykliny z cyklem komórkowym odpowiada najwyższej ekspresji cykliny.

Po ukończeniu poprawnej replikacji DNA rozpoczyna się faza G2 cyklu podziałowego. Jest to okres, w którym syntetyzowane są białka enzymatyczne i regulatorowe, a za przejście przez fazę G2 oraz G2/M odpowiada cyklina B w kompleksie z CDK1. Kompleks cykliny B/CDK1 nazywany jest także MPF (czynnik promujący mitozę, *ang. M-phase promoting factor*) i współpracuje on z kinazą WEE (*ang. WEE kinase*) oraz fosfatazą CDC25 (fosfataza cyklu 25, *ang. Cell Division Cycle 25*). Za monitorowanie powstawania zbyt małych komórek oraz

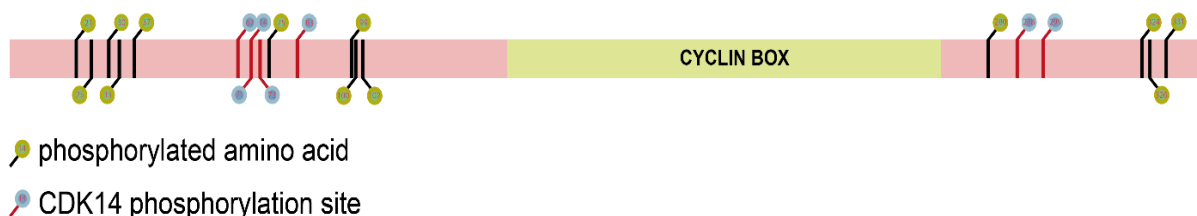
uszkodzeń DNA na tym etapie odpowiada punkt kontrolny G2/M, który wspierany jest przez białko p53 i kinazy Chk (kinaza punktu kontrolnego, *ang. Checkpoint kinase*). Ostatni etap cyklu komórkowego składający się z kariokinezy i cytokinezy prowadzi do powstania dwóch komórek potomnych z jednej komórki - matki [4,31–33].

1.3. Cyklina Y

Cykliny należą do grupy białek, które są niezbędne do prawidłowego przebiegu wszystkich etapów cyklu komórkowego [30]. Główną cechą cyklin jest ich zmienne stężenie w zależności od fazy cyklu komórkowego. Aby kontynuować cykl komórkowy, cyklina musi aktywować lub inaktywować wiele kluczowych białek w komórce. Cykliny kierują zdarzeniami w komórce poprzez współpracę z rodziną enzymów nazywaną kinazami cyklinozależnymi. Sama CDK jest nieaktywna, ale dołączenie cykliny umożliwia jej aktywację, tworząc funkcjonalny enzym, co umożliwia modyfikowanie specyficznych białek. Cykliny dzielone są na dwie grupy: cykliny mitotyczne oraz grupę cyklin fazy G1. Cykliny mitotyczne obejmują cykliny A i B, podczas gdy cykliny D i E można przypisać jako cykliny fazy G1. Z kolei do grupy mniej znanych cyklin należą cykliny C, F, G, H, I, J, K, L, M, O, T i Y [34]. Cykliny od dawna znane są jako regulatory cyklu komórkowego, ale ostatnie badania wskazują również na ich ważną rolę w procesie kancerogenezy. Utrzymanie prawidłowej ekspresji cyklin ma kluczowe znaczenie nie tylko dla prawidłowej proliferacji komórek, ale także odgrywa znaczącą rolę w innych procesach komórkowych, takich jak transkrypcja, naprawa DNA i różnicowanie komórek. Zakłócenie ekspresji tych białek może prowadzić do nieprawidłowej proliferacji komórek i rozwoju raka [5,9]. Progresa cyklu komórkowego jest wysoce uporządkowanym i ściśle regulowanym procesem obejmującym wiele punktów kontrolnych, którego zakłócenie może skutkować niekontrolowanymi podziałami komórkowymi. Dlatego zrozumienie mechanizmów molekularnych nieprawidłowości cyklu podziału komórek w raku może dostarczyć ważnych informacji o tym, w jaki sposób normalne komórki przechodzą transformację złośliwą i czy można zaprojektować nowe strategie leczenia [9].

Cyklina Y jest wysoce konserwatywnym białkiem z rodziny cyklin, o udowodnionej roli w regulacji cyklu komórkowego i procesie transkrypcji [35]. Kodowana jest przez gen CCNY zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 10 w pozycji p11.21 [36]. Struktura cykliny Y

różni się od struktury konwencjonalnych cyklin. W większości cyklin znajdują się dwie kasety cykliny, podczas gdy cyklina Y ma tylko jedną kasetę cykliny [37].



Ryc. 7. Budowa kompleksu cykliny Y z kinazą cyklinozależną 14.

Cyklina Y pierwotnie została zidentyfikowana jako białko wiążące się z CDK14/PFTK1 u drożdży, zwiększając jej aktywność i zmieniając jej lokalizację wewnątrzkomórkową. Badania *in vitro* i *in vivo* wykazały, że motyw PFTAIRE w CDK14 i kasecie cykliny Y jest niezbędny do interakcji między tymi białkami [38]. Późniejsze badania wykazały, że cyklina Y łączy się również z CDK16/PCTK1 tworząc aktywny kompleks zdolny do kontrolowania wielu procesów biologicznych. CDK16 to kinaza białkowa, która jest silnie ekspresowana w mózgu oraz jądrach i jest aktywowana przez związanie z błonową cykliną Y (CCNYm, *ang. membrane distribution isoform of CCNY*) [39]. Cyklina Y może również fosforylować i aktywować koreceptor LRP6 (białko związane z receptorem lipoprotein o niskiej gęstości 6, *ang. low-density lipoprotein receptor-related protein 6*), który jest głównym regulatorem szlaku Wnt/ β -katenina [40].

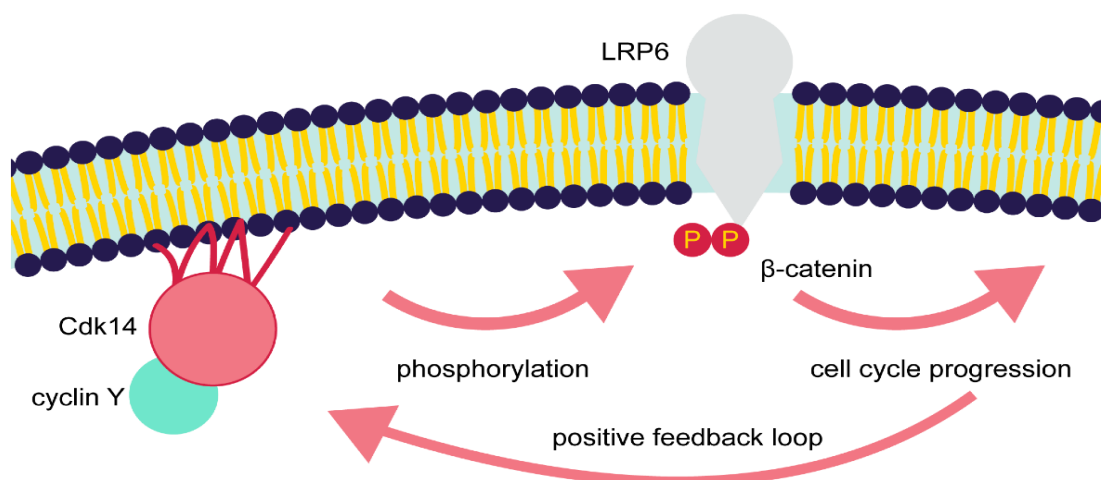
Cyklina Y odgrywa ważną rolę w wielu procesach komórkowych takich jak: utrzymywanie właściwości komórek macierzystych/progenitorowych ssaków, regulowanie rozwoju *Drosophila*, a także w kontrolowaniu procesu adipogenezy i produkcji lipidów. Wykazano również, że uczestniczy ona w regulacji proliferacji komórek nowotworowych, w tym nowotworów płuc i nerek, a obniżenie poziomu ekspresji cykliny Y zmniejsza proliferację i wzrost komórek niedrobnokomórkowego raka płuca czy raka krtani [37,39,41].

1.3.1. Cyklina Y w szlaku sygnałowym Wnt/ β -katenina

Sygnalizacja Wnt jest ewolucyjnie zachowaną ścieżką sygnalizacyjną, która odgrywa ważną rolę w rozwoju embrionalnym i homeostazie tkanek [42]. Nieprawidłowa regulacja

sygnalizacji Wnt może przyczyniać się do kancerogenezy, a coraz większa liczba doniesień wskazuje, że może także wpływać na odpowiedź komórek na leczenie. Biorąc pod uwagę kluczową rolę szlaku Wnt w wielu nowotworach, staje się on jednym z ważniejszych celów w poszukiwaniu nowych leków [43]. Opracowano kilka inhibitorów tego szlaku, które są obiecujące w leczeniu nowotworów spowodowanych zaburzeniami sygnalizacji Wnt i zmniejszaniu oporności na terapię na etapie przedklinicznym [44]. Nazwa szlaku pochodzi od nazw pierwszych odkrytych białek, takich jak Wg (*ang. Wingless*) i Int (strona integracji MMTV, *ang. MMTV integration site*). W późniejszych badaniach wykazano, że białka te są homologami. Obecnie szlak Wnt podzielony jest na szlaki kanoniczne i kilka szlaków alternatywnych - niekanonicznych. Szlak kanoniczny jest zależny od β -kateniny. Reguluje aktywność czynnika transkrypcyjnego (TCF, *ang. The transcription factor*) wpływającego na procesy takie jak embriogeneza, różnicowanie komórek, przeżycie i proliferacja komórek. Natomiast dysfunkcję kanonicznego szlaku Wnt obserwowano w różnych typach nowotworów, a także w chorobach neurodegeneracyjnych i metabolicznych. Nieklasyczne szlaki działają niezależnie od β -kateniny i TCF. Ich rola była dotychczas słabo poznana, ale niektóre doniesienia literaturowe wskazują na ich znaczenie w procesach takich jak przegrupowanie cytoszkieletu i migracja neuronów [44]. Stwierdzono, że w wielu stanach patologicznych, w tym w chorobach neurodegeneracyjnych i metabolicznych, a także w różnych typach nowotworów, zwłaszcza w niedrobnokomórkowym raku płuca, dochodzi do zaburzeń funkcjonowania szlaku Wnt [39,45]. Dostępne piśmiennictwo wskazuje, że szlak sygnałowy Wnt odgrywa ważną rolę w regulacji procesów komórkowych, takich jak proliferacja i przeżycie komórek, embriogeneza i różnicowanie komórek. Nieprawidłowy przebieg tego szlaku może przyczyniać się do utrzymania populacji komórek nowotworowych, co może również wpływać na ich lekooporność [46]. Badając składowe szlaku Wnt wykazano, że zwiększanie lub zmniejszanie jego substratów wiąże się z przeżyciem, a także zwiększoną proliferacją komórek nowotworowych, co wpływa na gorsze rokowanie pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca [45]. Wyniki badań sugerują, że cyklina Y w kompleksie PFKT1/CDK14 promuje niekanoniczny szlak Wnt poprzez wzmacnianie ekspresji białek Dvl2 (*ang. Dishevelled Segment Polarity Protein 2*) i Naked1, które są substratami tego szlaku. Wykazano również udział kompleksu cyklina Y/PFKT1 w aktywacji Rho GTPaz, które są celami

niekanonicznego szlaku sygnałowego Wnt, co prowadzi do polimeryzacji aktyny w komórkach [47]. Inne doniesienia sugerują również, że cyklina Y w zdrowych komórkach, razem z CDK14, wpływa na transdukcję szlaku Wnt poprzez fosforylację LRP6. Wykazano, że kompleks cyklina Y-CDK14 poprzez fosforylację LRP6 zapobiega degradacji β -kateniny, co umożliwia sygnalizację szlaku Wnt. Fosforylacja i sygnalizacja receptora Wnt są maksymalne w fazie G2/M, podobnie jak ekspresja cykliny Y, co może sugerować związek między cyklem komórkowym a procesem transkrypcji [48].



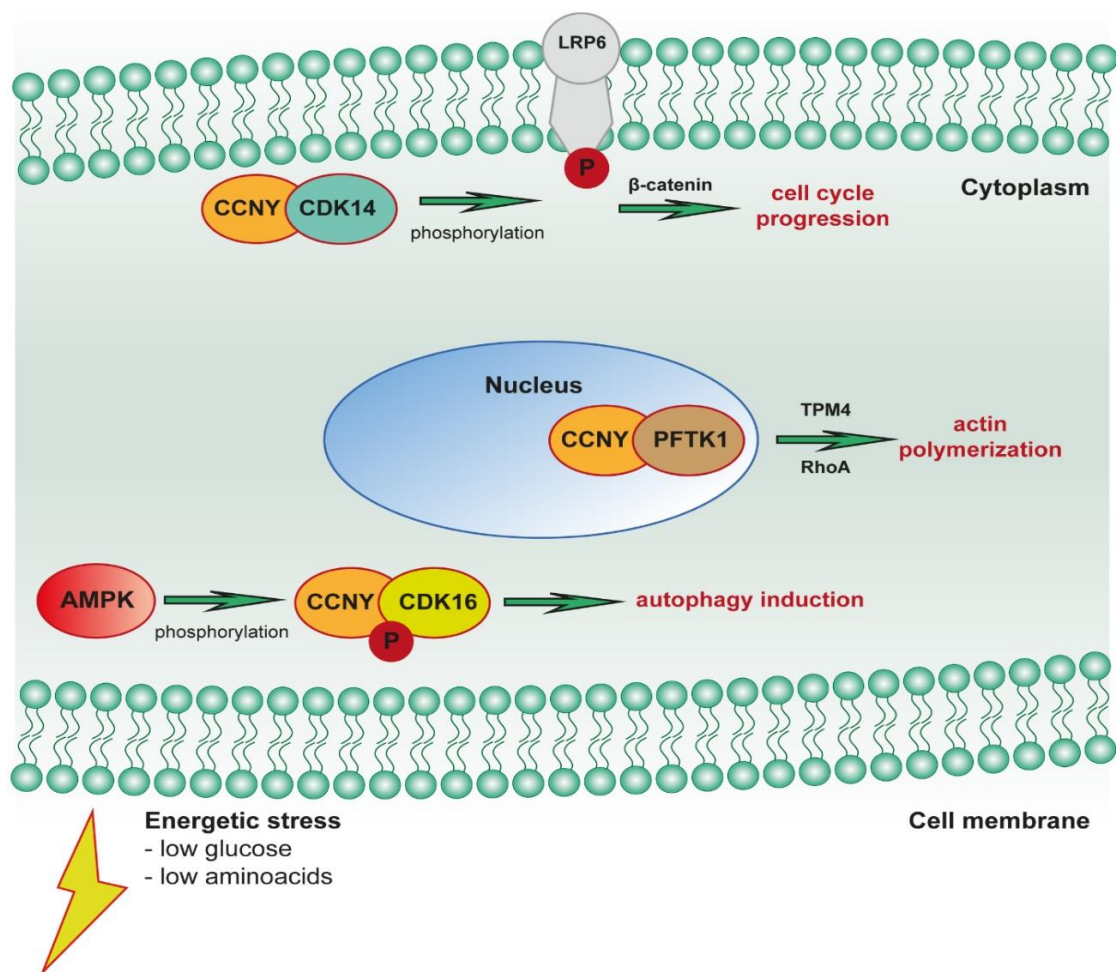
Ryc. 8. Udział kompleksu cykliny Y/CDK14 w szlaku sygnałowym Wnt. Kompleks cykliny Y/CDK14 fosforyluje LRP6 zapobiegając degradacji β -kateniny w wyniku czego następuje progresja cyklu komórkowego.

1.3.2. Cyklina Y w procesie autofagii

Autofagia, która jest ewolucyjnie zachowanym procesem zachodzącym we wszystkich komórkach eukariotycznych, jest aktywowana m.in. w odpowiedzi na niedobory składników odżywczych, uszkodzenia spowodowane przez toksyny komórkowe oraz czynniki indukujące wzrost i różnicowanie. W warunkach fizjologicznych, występuje ona w niewielkim stopniu w większości tkanek. Przyczynia się do adaptacji komórek do warunków stresowych, a tym samym do ich przeżycia [49].

Istnieją dowody na to, że proces ten jest powiązany ze stanami chorobowymi. Zwiększone poziomy autofagii odnotowano w neurodegeneracyjnej chorobie Parkinsona. Z drugiej strony udowodniono zmniejszenie intensywności tego procesu w chorobach serca (choroba Danone'a). Autofagia odgrywa również rolę w kancerogenezie. Może zarówno

wpływać na supresję guza, a także na promocję nowotworu. Proces ten reguluje właściwości nowotworowych komórek macierzystych, indukcje nawrót nowotworu i oporność na czynniki przeciwnowotworowe. Chociaż niektóre modulatory autofagii, takie jak rapamycyna i chlorochina, są stosowane do regulacji autofagii w terapii przeciwnowotworowej. Dokładny mechanizm autofagii w raku wymaga dalszych badań [50]. Kompleks cykliny Y/CDK16 jest substratem AMPK (kinazy białkowej aktywowanej AMP, *ang.* AMP-activated Protein Kinase) i efektem autofagii. Cyklina Y/CDK16 indukuje autofagię, która jest zależna od fosforylacji S326 i wymaga ULK1 (*ang.* Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1) i Bekliny 1, które są niezbędne do indukcji makroautofagii. AMPK aktywuje cyklinę Y/CDK16, aby zainicjować pierwszy etap tworzenia autofagosomów. Potencjalny związek z autofagią sugeruje ponadto funkcja CDK16 w transporcie pęcherzykowym organizacji cytoszkieletu aktynowego [51–53].



Ryc. 9. Cyklina Y odgrywa ważną rolę w wielu procesach komórkowych takich jak kontrola progresji cyklu komórkowego, autofagia i reorganizacja cytoszkieletu komórki.

1.3.3. Cyklina Y w funkcji neuronalnej

Ekspresję cykliny Y i jej znaczący wpływ na funkcję neuronalną opisano w niedzielących się komórkach neuronalnych – komórkach hipokampu. Cho i wsp. w swoich badaniach wykazali, że cyklina Y występuje nie tylko w hipokampie, ale także w domenach presynaptycznych kolców dendrytycznych. Wykazano, że cyklina Y może hamować ruch receptora AMPA (receptor kwasu α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazoloopropionowego, *ang. α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid Receptor*) w kierunku synaps i hamować jego egzocytozę, a tym samym blokować LTP (długotrwałe wzmocnienie synaptyczne, *ang. Long-term potentiation*). Ponadto obniżenie ekspresji cykliny Y powoduje wzrost LTP w skrawkach hipokampu [37]. Hwang i wsp. w odniesieniu do badań i roli cykliny Y w komórkach hipokampu wykazali, że cyklina Y wiąże się z fibrylarną postacią aktyny (F-aktyną, *ang. F-actin*) i zakłóca polimeryzację aktyny indukowanej przez LTP. Cyklina Y wpływa na czynnik depolimeryzacji aktyny, blokując aktywację kofiliny. W efekcie prowadzi to do strukturalnego upośledzenia LTP i zmniejszenia liczby kolców dendrytycznych. Przedstawione dane sugerują, że cyklina Y hamuje LTP funkcjonalnie i strukturalnie poprzez szlak kofilina-aktyna [54]. Rok później Joe i wsp. poprzez badanie sekwencji RNA, analizę transkryptów i qRT-PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym, *ang. Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR*), wykazali, że cyklina Y wpływa na wiele funkcji i ścieżek w komórkach neuronalnych. Rearanżacja cytoszkieletu aktynowego, plastyczność synaptyczna, adhezja ogniskowa, apoptoza, szlak sygnalizacji chemokin, interakcje między macierzą zewnątrzkomórkową, a receptorem oraz uczenie się należą do procesów, na które wpływa ekspresja cykliny Y [40].

Cyklina Y w kompleksie z CDK14 reguluje specyficzne funkcje neuronalne. Wysoką ekspresję CDK14 wykryto w postmitotycznych komórkach mózgu, kompleks cyklina Y/CDK14 odgrywa kluczową rolę w spolaryzowanym ruchu pęcherzyków presynaptycznych i eliminacji synaps podczas przewodzenia nerwowego [55].

1.3.4. Cyklina Y w procesie spermatogenezy

Na końcowe etapy różnicowania spermatogenezy wpływa również cyklina Y, a dokładniej kompleks cyklina Y/CDK16. Mikolcevic i wsp. wykazali, że myszy pozbawione CDK16

były żywotne, a niedobór kinazy nie wpływał na mejozę, chociaż CDK16 był wymagany w końcowych etapach różnicowania w spermatogenezie. Testowane myszy z nokautem CDK16 posiadały wszystkie komórki w swoich jądrach na różnych etapach spermatogenezy. Po dokładnym zbadaniu plemników stwierdzono wiele nieprawidłowości w ich budowie i funkcjonowaniu. Między innymi wystąpiły aberracje w budowie pierścienia plemnika (między innymi wydłużenie i zwężenie regionu pierścienia), dyskineza, czyli defekt w budowie plemników, zniekształcenia w główce plemników, a także występował nadmiar resztkowej cytoplazmy w komórkach. Wady te upośledzały funkcję plemników i przyczyniały się do niepłodności [39].

Rolę cykliny Y w procesie spermatogenezy badali również Zi i wsp. Porównali oni cyklinę Y z bardzo podobną cyklinę Y-Like1 (CCNY-L1) w sekwencji białkowej, która jest słabo scharakteryzowanym białkiem o najwyższym poziomie ekspresji w jądrach myszy. Autorzy wykazali, że myszy z nokautem CCNY-L1 były bezpłodne, a badanie plemników wykazało upośledzenie ruchliwości plemników, pochyloną główkę i aberracje w strukturze pierścienia [45].

1.3.5. Cyklina Y w procesie adipogenezy i produkcji lipidów

Jak wspomniano wcześniej, cyklina Y w kompleksie z CDK14 bierze udział w regulacji sygnalizacji szlaku Wnt poprzez fosforylację białka LRP6 [48]. Co ważne, doniesiono, że szlak sygnałowy Wnt odgrywa ważną rolę w sterowaniu procesem adipogenezy [56,57].

W badaniach, w których poddano ocenie myszy typu dzikiego i myszy z nokautem CCNY, a także pierwotne hepatocyty i linię komórkową HepG2 (linia komórkowa raka wątroby *ang. Hepatocellular Carcinoma Cell Line*). Zaobserwowano, że myszy z nokautem CCNY, w przeciwieństwie do myszy typu dzikiego, wykazywały zarówno niższą masę ciała, jak i zmniejszoną zawartość tłuszczu w ciele. Stwierdzono również szybszy metabolizm, większe zapotrzebowanie na pokarm oraz wrażliwość gryzoni na ograniczenie spożycia kalorii. Z drugiej strony komórki HepG2 i hepatocyty o obniżonej ekspresji cykliny Y stały się niewrażliwe na insulinę [46]. Sugeruje to, że cyklina Y bierze udział w regulacji szlaku sygnałowego insuliny w wątrobie.

1.3.6. Cyklina Y w innych procesach

Martinotti i wsp. zbadali rolę cykliny Y w nieswoistym zapaleniu jelit (IBD, *ang. Irritable Bowel Syndrome*). Materiałami użytymi w badaniach były myszy i linie komórkowe: HTC116, HEK209T, SW48 i PC-3. Naukowcy początkowo sugerowali, że cyklina Y może być niezbędna do utrzymania prawidłowej homeostazy komórek nabłonka jelit (IEC, *ang. Intestinal Epithelium Cells*) poprzez promowanie autofagii i szlaku sygnałowego Wnt/ β -katenina, w który jest zaangażowana. Następnie badali oni stopień regeneracji błony śluzowej oraz odpowiedź na uszkodzenie nabłonka jelitowego u myszy z nokautem CCNY i myszy typu dzikiego. Analiza wyników wykazała, że nie było różnic między dwoma typami myszy pod względem proliferacji komórek i aktywności choroby. W modelu IEC zmniejszenie ekspresji cykliny Y również nie wpłynęło na proliferację komórek, szlak sygnałowy Wnt i autofagię. Autorzy doszli zatem do wniosku, że cyklina Y nie przyczynia się do utrzymania prawidłowej homeostazy nabłonka jelitowego i nie bierze udziału w IBD [58].

Kyselova i wsp. zbadali możliwą ekspresję cykliny Y i jej prawdopodobną rolę w płytkach krwi. Badania potwierdziły obecność cykliny Y w płytkach krwi, a także wykazały, że wyższa ekspresja cykliny Y występowała we krwi zdrowych pacjentów, niż we krwi pacjentów z cukrzycą. Badania na myszach dostarczyły wielu informacji na temat wpływu ekspresji cykliny Y na płytki krwi i powiązane z nimi procesy. U myszy z nokautem CCNY wykazano zmniejszoną liczbę płytek krwi i zmiany w ich biogenezie, a także zmniejszoną krzepliwość i dłuższy czas krwawienia. Wykazano również, że płytki krwi tworzą filopodia, a nie lamelliopodia, a ich zdolność do rozprzestrzeniania się była osłabiona. Ponadto myszy typu dzikiego charakteryzowały się mono-ubikwitynacją cykliny Y i jej translokacją do błony plazmatycznej, gdzie regulowała ona fosforylację integryny β 3-tyrozyny i zewnętrzną sygnalizację za pomocą trombiny w porównaniu z myszami z nokautem CCNY [59].

1.3.7. Cyklina Y w procesie kancerogenezy

Z roku na rok odnotowuje się coraz większe zainteresowanie badaczy cyklina Y w kontekście inicjacji i progresji chorób nowotworowych. Cyklina Y jest białkiem z rodziny cyklin, które nie tylko bierze udział w procesach komórkowych w przypadku komórek prawidłowych, ale występuje również w wielu typach nowotworów. Analiza dostępnej literatury dowodzi, że

najczęściej nadekspresja białka regulatorowego prowadzi do wzmożonej migracji, proliferacji i inwazji komórek nowotworowych, a obniżony poziom ekspresji skutkuje zahamowaniem wyżej wymienionych procesów [41,60]. Najnowsze dane literaturowe wskazują, że nadekspresja cykliny Y jest związana ze złym rokowaniem, które skutkuje zwiększoną proliferacją nieprawidłowych komórek, co sugeruje, że cykliny Y jest zaangażowana w rozwój masy guza i przerzutowanie nowotworów. Związek pomiędzy wysoką ekspresją cykliny Y, a zwiększoną aktywnością proliferacyjną komórek obserwuje się w wielu typach nowotworów, w tym w raku wątroby, raku płuca, piersi, nerki, krtani i jelita grubego, ale także wśród komórek glejaka [41,61–64].

W przypadku raka wątroby badania przeprowadzone na liniach komórkowych wskazują na istotnie zwiększoną proliferację komórek nowotworowych, migrację celowaną i zmniejszony odsetek apoptozy. Wyniki badań oparte na oznaczeniu aktywności metabolicznej komórek, analizie śmierci komórkowej oraz ocenie poziomu ekspresji białek wskazują, że przyczyną wyżej wymienionych zjawisk jest wyższy poziom ekspresji cykliny Y w porównaniu z prawidłowymi komórkami wątroby. Wysoki poziom cykliny Y w komórkach nowotworowych koreluje z obniżonym poziomem ekspresji białka Bax związanego z Bcl-2 (*ang. BCL-2-associated X protein*), którego ekspresja powinna przyspieszać proces apoptozy poprzez tworzenie porów w zewnętrznej błonie mitochondriów, zwiększając tym samym jej przepuszczalność. Odwrotny efekt zaobserwowano w przypadku białek antyapoptotycznych, gdzie szczególną uwagę zwrócono na znaczny wzrost Bcl-2 w komórkach, przy jednoczesnym wzroście ekspresji cykliny Y. Z danych literaturowych wynika również, że progresja HCC (rak wątrobowokomórkowy, *ang. Hepatocellular Carcinoma*) może być również związana z tworzeniem kompleksów cykliny Y z PFTK1 (CDK14), które wzmacniają kluczowe punkty szlaku sygnałowego Wnt [65]. Wyniki te są zbieżne z rezultatami uzyskanymi na materiale pobranym od pacjentów z HCC, gdzie wykazano wysoki współczynnik korelacji ekspresji cykliny Y z wielkością guza, stopniem inwazji, przerzutami do węzłów chłonnych oraz stopniem złośliwości histologicznej [41].

Podobny związek silnej nadekspresji cykliny Y korelującej ze stopniem agresywności nowotworów obserwuje się w komórkach raka płuca. W tym przypadku zarówno badania przeprowadzone na liniach komórkowych, jak i analiza danych klinicznych jednogłośnie

wskazała na zwiększoną proliferację komórek nowotworowych w odpowiedzi na podwyższony poziom cykliny Y [66]. Podobnie jak w przypadku wcześniej opisanego HCC, zarówno badania prowadzone na liniach komórkowych, jak i analiza materiału klinicznego wskazują na związek między nadekspresją cykliny Y, a rozwojem nowotworu, agresywnym przebiegiem i złym rokowaniem NSCLC. Ponadto zaobserwowano, że nadekspresja cykliny Y przy obniżonych poziomach CDKI zapewnia przewagę wzrostu w komórkach nowotworowych. Na podstawie analizy materiału klinicznego obserwuje się związek nadekspresji cykliny Y z podtypem histologicznym i wielkością guza. Wysoki poziom tego białka nie koreluje jednak z częstością przerzutów do węzłów chłonnych i stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu. Zatem poziom ekspresji cykliny Y może mieć istotne znaczenie, przede wszystkim na etapie inicjacji NSCLC. Histologicznie NSCLC obejmuje trzy najczęstsze typy o podobnych cechach, w tym raka płaskonabłonkowego (SCC, *ang. Squamous Cell Carcinoma*), gruczolakoraka (AC, *ang. Adenocarcinoma*) i raka wielkokomórkowego (LCC, *ang. Large-Cell Carcinoma*), a nadekspresja cykliny Y w gruczolakoraku może skutkować znacznie wyższym potencjałem przerzutowym, w porównaniu z rakiem płaskonabłonkowym [67].

Ponadto w komórkach raka jajnika obserwuje się również znacznie zwiększoną ekspresję cykliny Y. Nadekspresja omawianego białka wskazuje na związek z wysokim poziomem białek takich jak: c-myc, cyklina D1, PFTK1, jak również nadekspresją kolokalizowanej β -kateniny w jądrze komórkowym przy jednoczesnym obniżeniu poziomu tego białka w cytoplazmie. Jak wcześniej wspomniano, wysoka ekspresja cykliny Y jest związana z niekanonicznym szlakiem Wnt, który angażuje aktywność białka PFTK1 i GTPazy Rho, które przyczyniają się do polimeryzacji aktyny, co wpływa na ruchliwość i migrację komórek raka jajnika. Dodatkowo zaobserwowano istotny związek między nadekspresją cykliny Y, a stadium kliniczno-patologicznym i przerzutami do węzłów chłonnych. W badaniach stwierdzono powiązany wzrost ekspresji cykliny Y z III i IV stopniem zaawansowania nowotworu oraz przerzutami do węzłów chłonnych, co koreluje ze złym rokowaniem pacjentów w przebiegu raka jajnika [68].

Najmniej dowodów na związek między wysoką ekspresją cykliny Y, a progresją nowotworu odnaleźć można w przypadku raka piersi. Na przykład jeden z projektów badawczych koncentruje się na zrozumieniu związku między wysoką ekspresją cykliny Y, a

zwiększoną proliferacją komórek nowotworowych w oparciu o linie komórkowe raka piersi. Na podstawie wyników testów jednoznacznie stwierdzono, że immunohistochemiczna ekspresja cykliny Y jest silniejsza w tkankach nowotworowych niż w tkankach prawidłowych. Również wszystkie linie komórkowe raka piersi wykazały wysoki poziom badanego białka. Zmniejszenie ekspresji cykliny Y w liniach komórkowych (przy zastosowaniu lentiwirusa) spowodowało zmniejszenie zdolności do tworzenia kolonii i znaczne zmniejszenie proliferacji komórek. Dodatkowo analizując cykl komórkowy komórek tych linii zauważono, że obniżenie ekspresji cykliny Y powoduje zatrzymanie komórek w fazie G0/G1 i hamowanie wzrostu komórek. Na podstawie przedstawionych badań naukowcy doszli do wniosku, że inhibicja cykliny Y poprzez wprowadzenie lentiwirusa zawierającego shRNA (krótki fragment RNA o strukturze spinki do włosów, *ang. short hairpin RNA*) może być opcją terapeutyczną w raku piersi. Inni naukowcy wykazali wpływ ekspresji CDK16 aktywowanej przez cyklinę Y na potrójnie ujemnego raka piersi (TNBC, *ang. Triple-negative breast cancer*). Analiza wyników wykazała, że CDK16 ulega silnej ekspresji w TNBC. Podwyższony poziom badanego białka zwiększał proliferację i migrację komórek nowotworowych, sprzyjał wzrostowi guza i był skorelowany ze złym rokowaniem pacjentów. Z drugiej strony obniżenie poziomu ekspresji CDK16 znacząco hamowało progresję nowotworu [69].

Podsumowując, wyniki przedstawionych badań wskazują, na istotny związek między zwiększoną ekspresją cykliny Y, a progresją nowotworu. Dotychczasowa analiza badań wskazuje na podobny mechanizm działania cykliny Y w różnych typach nowotworów, oparty na szlaku sygnałowym Wnt, indukującym wzmożoną proliferację i migrację komórek nowotworowych. Dalsze badania tego białka prawdopodobnie pomogą w szerszym zrozumieniu mechanizmu molekularnego leżącego u podstaw działania cykliny Y na maszynię cyklu komórkowego oraz procesu śmierci komórki, co mogłoby pozwolić na wykorzystanie badania poziomu cykliny Y jako potencjalnego biomarkera w diagnostyce raka.

1.4. Rodzaje śmierci komórki

W ludzkim organizmie śmierć komórkowa jest procesem niezbędnym do utrzymania prawidłowej homeostazy tkanek oraz eliminacji szkodliwych komórek, do których należą między innymi komórki nowotworowe. Jedną z głównych cech nowotworów jest

niekontrolowana proliferacja komórek, która jest wynikiem zaburzeń cyklu podziałowego lub procesu śmierci komórkowej [70]. Do niedawna apoptoza uważana była za główny rodzaj śmierci komórkowej, ale z biegiem lat prowadzone badania dostarczyły nam informacji o większej ilości typów śmierci. Instytucją zajmującą się usystematyzowaniem aktualnej wiedzy na temat śmierci komórkowej jest Komitet do Spraw Nazewnictwa Śmierci Komórkowej (NCCD, *ang. Nomenclature Committee on Cell Death*). W 2005 roku NCCD po raz pierwszy sformułował definicje oraz wytyczne interpretacji śmierci komórki z perspektywy biochemicznej, morfologicznej i funkcjonalnej, które w roku 2009 zostały wydane jako rekomendacje dla autorów, recenzentów oraz redaktorów czasopism naukowych. Głównym założeniem było sformułowanie morfologicznych lub molekularnych kryteriów definiowania martwych komórek. Według NCCD komórka martwa to taka, która spełnia jedno z wymienionych kryteriów tj. komórka utraciła integralność błony plazmatycznej, komórka oraz jej jądro komórkowe uległo całkowitej fragmentacji lub martwa komórka i/lub jej pozostałości zostały pochłonięte przez sąsiadujące komórki. Na podstawie wyżej wymienionych wytycznych sklasyfikowano główne rodzaje śmierci komórki, do których należą: apoptoza, autofagia, rogowacenie oraz martwica [71].

APOPTOZA	AUTOFAGIA	ROGOWACENIE	MARTWICA
<ul style="list-style-type: none"> • zaokrąglenie komórki • zmniejszenie objętości komórki • niewielkie modyfikacje organelli • fragmentacja jądra • wytwarzanie pęcherzyków z błony plazmatycznej, które pofałdowane zostają przez fagocyty 	<ul style="list-style-type: none"> • brak kondensacji chromatyny • wakuolizacja cytolpazmy • akumulacja wakuoli autofagalnych • niewielki wychwyt przez komórki fagocytarne 	<ul style="list-style-type: none"> • eliminacja organelli cytozolowych • modyfikacja błony komórkowej • akumulacja lipidów • złuszczenie poprzez aktywację proteaz 	<ul style="list-style-type: none"> • obrzęk komórki oraz organelli • pęknięcie błony plazmatycznej • umiarkowana kondensacja chromatyny

Tab. 1. Charakterystyczne cechy morfologii komórek w wybranych rodzajach śmierci komórki [Opracowano na podstawie „Classification of cell death recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009”].

NCCD w swoim raporcie uwzględnia również wstępne definicje nietypowych wariantów śmierci komórki. Należą do nich: katastrofa mitotyczna (występująca podczas lub krótko po nieprawidłowym przebiegu mitozy, charakteryzująca się mikronukleacją i wielojądrowością), anoikis (apoptotyczna śmierć komórki wywołana utratą przyczepności komórki do substratu lub komórek sąsiadujących), ekscytotoksyczność (występująca w neuronach uszkodzonych lub zabijanych między innymi przez glutaminian), zwyrodnienie Wallera (mające miejsce wskutek przerwania ciągłości włókna nerwowego), paraptoza (często wywoływana przez ekspresję receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu i związana z rozległą wakuolizacją cytoplazmy oraz obrzękiem mitochondriów), pyroptoza (obejmująca aktywację kaspazy 1) oraz entoza (definiowana jako forma „kanibalizmu komórkowego”, w której jedna komórka pochlania jedną komórkę sąsiadującą) [71].

Ze względu na ciągły rozwój i ujawnianie nowych mechanizmów śmierci komórki NCCD w 2018 roku zaproponował zaktualizowaną klasyfikację tych procesów. Rodzaje śmierci komórki zostały podzielone na dwie grupy, do których należą regulowana śmierć komórki (RCD, *ang. regulated cell death*) oraz przypadkowa śmierć komórki (ACD, *ang. Accidental Cell Death*). RCD opiera się na dedykowanej maszynerii molekularnej, co sugeruje, że może być modulowana (tj. opóźniona lub przyspieszona) przez interwencje farmakologiczne lub genetyczne. Natomiast ACD definiowana jest jako natychmiastowa i katastrofalna śmierć komórki, która narażona jest na działanie czynników natury fizycznej (np. wysokie ciśnienie, temperatura lub siły osmotyczne), chemicznej (np. ekstremalne wahania pH) lub mechanicznej (np. siły ścinające). Oprócz wymienionych grup NCCD zwraca również uwagę na procesy nieletalne, w których udział bierze maszyneria molekularna RCD. Należą do nich między innymi starzenie komórek, katastrofa mitotyczna oraz wiele przypadków końcowego różnicowania komórek [72].

Rozregulowanie procesów śmierci komórkowej jest wysoce istotne dla procesu nowotworzenia oraz patogenezy wielu chorób, tj. choroby układu sercowo-naczyniowego, choroby autoimmunologiczne oraz różnego typu zwyrodnienia powstające w organizmie człowieka. Związek między procesem śmierci komórki, a rakiem jest bardzo złożony, a złożoność tę przypisuje się kilku czynnikom. Należą do nich występowanie więcej niż jednego rodzaju endogennej śmierci komórki (która zaangażowana jest w chorobę nowotworową) oraz

fakt, iż niektóre rodzaje śmierci komórki mają podwójny lub przeciwstawny wpływ na proces kancerogenezy. Przykładem takiej śmierci komórki może być apoptoza. Komórki nowotworowe mogą z jednej strony uniknąć apoptozy poprzez obniżenie lub zablokowanie szlaków apoptotycznych, natomiast z drugiej strony proces apoptozy może napędzać proliferację komórek jako rekompensatę ich utraty [72,73].

GŁÓWNE RODZAJE REGULOWANEJ ŚMIERCI KOMÓRKI		
Typ śmierci	Cechy morfologiczne	Cechy biochemiczne
Szlak wewnętrzny apoptozy	Zaokrąglenie komórek; kondensacja chromatyny; wytwarzanie pęcherzyków błony plazmatycznej; tworzenie ciałek apoptotycznych	Wyznaczany przez MOMP; zależny od kaspaz (głównie kaspazy 3)
Szlak zewnętrzny apoptozy		Wykrywany przez receptory błony komórkowej; aktywowany przez kaspazę 8
Nekroza	Obrzęk komórek; pęknięcie błony komórkowej; umiarkowana kondensacja chromatyny	Aktywacja RIPK1, RIPK3 i MLKL; tworzenie nekrosomów cytozolowych
Ferroptoza	Zmniejszenie mitochondriów; zwiększenie gęstości błon mitochondrialnych; zwiększenie ilości pęknięć błony mitochondrialnej	Akumulacja żelaza; peroksydacja lipidów; konwersja MAP1LC3B-I do MAP1LC3B-II; glutaminoliza; niezależna od kaspaz
Pyroptoza	Brak obrzęku komórek; pęknięcie błony plazmatycznej; umiarkowana kondensacja chromatyny	Aktywacja Kaspazy 1, Kaspazy 3 i GSDMD; tworzenie porów indukowane przez GSDMD; wytwarzanie IL1 β
Partanatoza	Kondensacja chromatyny; duża fragmentacja DNA; brak ciałek apoptotycznych; utrata ciągłości błony komórkowej; brak obrzęku komórek	Nadmierna aktywacja PARP1; niezależny od kaspaz; wyczerpanie NAD ⁺ i ATP; akumulacja polimerów poli-ADP-rybozy (PAR); Uwalnianie AIFM1 z mitochondriów do jądra

Entotyczna śmierć komórki	Struktura komórki w komórce	Aktywacja białek adhezyjnych; fagocytoza związana z MAP1LC3; niezależna od kaspaz
NETotyczna śmierć komórki	Pęknięcie błony plazmatycznej; zapadnięcie się błony jądrowej; uwalnianie włókien chromatyny	uwalnianie i translokacja enzymów; cytrulinacja histonów
Śmierć komórki zależna od lizosomów	Pęknięcie lizosomu i błony plazmatycznej	Zwiększenie przepuszczalności błony lizosomalnej; uwalnianie lizosomalnych enzymów hydrolitycznych; lizosomalne uszkodzenie oksydacyjne wywołane żelazem
Śmierć komórki zależna od autofagii	Autofagalna wakuolizacja	Konwersja MAP1LC3B-I do MAP1LC3B-II; zwiększona aktywność lizosomalna
Immunogenna śmierć komórki	Morfologia podobna do apoptozy z zachowaniem integralności błony komórkowej	Aktywacja DAMP; Zależna od kaspaz;
Nekroza sterowana MPT	Morfologia podobna do nekrozy; utrata przepuszczalności wewnętrznej błony mitochondrialnej; rozpad osmotyczny obu błon mitochondrialnych	Opiera się na CYPD

Tab. 2. Rodzaje regulowanej śmierci komórki [Opracowano na podstawie „Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018.”].

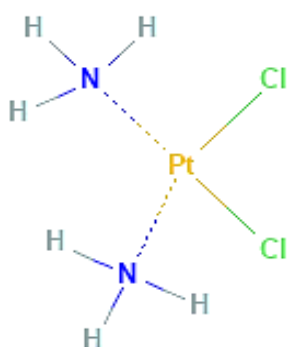
Proces śmierci komórki (głównie apoptozy) można indukować poprzez zastosowanie leków cytostatycznych różnego typu. Większość leków przeciwnowotworowych stosowanych obecnie w onkologii klinicznej wykorzystuje nienaruszone apoptotyczne szlaki sygnałowe do wywołania śmierci komórek nowotworowych. Metody przepisywania chemioterapii opierają się na różnych elementach, w tym rodzaju i stadium nowotworu, wieku pacjenta, ogólnym stanie zdrowia pacjenta, innych współistniejących problemach zdrowotnych i historii

otrzymywania chemioterapii. Ponieważ leki chemioterapeutyczne nie mogą odróżnić prawidłowych komórek od komórek nowotworowych, przepisana dawka jest kolejnym kluczowym aspektem dla osiągnięcia najlepszej możliwej odpowiedzi [74,75].

1.5. Cisplatyna

Standardem leczenia nowotworów jest farmakoterapia, której jednym z elementów jest często terapia skojarzona. Do leków stosowanych w leczeniu nowotworów zaliczamy przede wszystkim hormony, przeciwciała monoklonalne, środki immunostymulujące oraz leki cytostaticzne. Zazwyczaj podczas chemioterapii stosuje się kilka leków z różnych grup cytostatyków. Leki cytostaticzne stanowią grupę substancji syntetycznych i naturalnych, które wykorzystywane są w leczeniu nowotworów różnego typu. Mechanizm działania cytostatyków opiera się głównie na wywoływaniu zaburzeń cyklu komórkowego komórek nowotworowych, co w ostateczności prowadzi do śmierci komórki. Jednym z leków stosowanych w chemioterapii nowotworów jest cisplatyna.

Cisplatyna ($\text{Cl}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{Pt}$) należy do grupy nieorganicznych związków chemicznych o wysokiej toksyczności. Jest metalicznym związkiem koordynacyjnym o kwadratowej geometrii płaskiej, a jej masa cząsteczkowa wynosi 301,1 g/mol, natomiast gęstość 3,74 g/cm³ [76].



Ryc. 10. Struktura chemiczna cisplatyny.
[Cisplatyna | $\text{Cl}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{Pt}$ - PubChem
(nih.gov)]

Po raz pierwszy zsyntetyzowana została w 1844 roku przez M. Peyrone, a pod koniec lat 70-tych XX wieku została dopuszczona do użytku medycznego przez FDA (Federalny Urząd Żywności i Leków, *ang. Food and Drug Administration*) jako pierwszy związek platyny stosowany w leczeniu zaawansowanego raka pęcherza moczowego, raka jąder oraz raka jajnika [77,78] Z biegiem lat klinicyści zaczęli również stosować cisplatynę w leczeniu innych

rodzajów nowotworów złośliwych, takich jak nowotwory głowy i szyi, rak przewodu pokarmowego, czy rak płuca, gdzie korzyści z leczenia przewyższają ryzyko wystąpienia niepożądanych skutków ubocznych leku. Pierwsze badania nad właściwościami cytostatycznymi cisplatyny przeprowadzone zostały w 1960 roku przez B. Rosenberga. Wykazał on, że działanie elektrod platynowych wpływa na zmniejszenie proliferacji bakterii w zawieszynie. Opracowanie wyników tych badań rozpoczęło zainteresowanie nad wpływem cisplatyny na komórki i w konsekwencji pozwoliło na odniesienie sukcesu cisplatyny w sferze klinicznej [79]. Proces oddziaływania cisplatyny z materiałem genetycznym w komórce rozpoczyna się od aktywacji związku platynowego na drodze reakcji hydrolizy, w wyniku której powstaje aktywny metabolit (w przypadku cisplatyny jest to cis-diaminadihydroksyplatyna (II)) [80]. W wyniku wypierania jonów chlorkowych przez cząsteczki wody powstaje silny elektrofil o ładunku dodatnim, który poprzez wiązanie kowalencyjne wiąże się z dowolnym nukleofilem. W badaniach *in vitro* traktując DNA plemników łososia wykazano, że najczęściej występującą reakcją jest wewnątrzniowe wiązanie krzyżowe aktywnej cisplatyny z resztkami purynowymi. Potwierdzenie tych wyników uzyskano w badaniach *in vivo*, gdzie analizowanym materiałem były białe krwinki pobrane od pacjentów z nowotworem [76,81,82]. Mechanizm działania cisplatyny w komórkach nowotworowych polega na wywieraniu cytotoxyczności związku w celu tworzenia adduktów DNA, głównie sieciujących adduktów wewnątrzniowych, które aktywują kilka szlaków transdukcji sygnału, w tym te obejmujące białka takie jak ATR (ataksja teleangiectazja związana z Rad3, *ang. Ataxia Telangiectasia and Rad3 related*), p53, p73 oraz MAPK. Wynikiem tego procesu jest zatrzymanie cyklu komórkowego komórek nowotworowych, w celu naprawy uszkodzeń DNA. Niepowodzenie w naprawie DNA prowadzi do nieprawidłowej mitozy komórek, a ostatecznie do indukcji procesu apoptozy [83],[84].

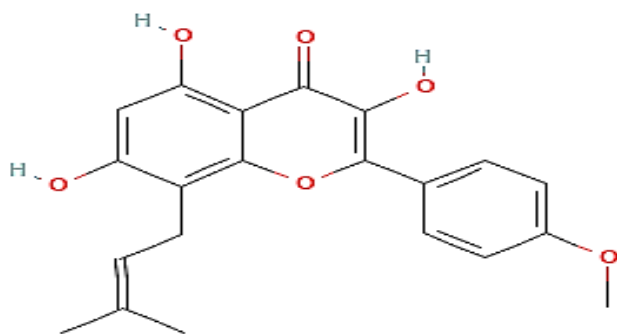
Chociaż cisplatyna ma szeroko udowodnione działanie przeciwnowotworowe należy pamiętać, że leczenie wiąże się z opornością komórek nowotworowych na ten rodzaj platyny, a także z występowaniem stosunkowo poważnych skutków ubocznych. Za oporność komórek na działanie związku cytotoxycznego odpowiada między innymi inaktywacja aktywnej już postaci cisplatyny. Cytoplazma komórek zawiera metalotioneinę oraz glutation, które są bogate w cysteinę i metioninę, czyli aminokwasy zawierające siarkę. W komórkach cisplatyna wiąże się z siarką, w wyniku czego zostaje ona dezaktywowana. Innymi mechanizmami

oporności jest wzmożone wydalanie cisplatyny z komórek przez eksportery miedzi (ATP7A, ATP7B), rozregulowanie szlaków apoptotycznych oraz wzmożona naprawa DNA przez komórki [85]. Natomiast do najczęściej występujących skutków ubocznych podczas leczenia cisplatyną należą: ostra niewydolność nerek, uszkodzenie wątroby, ototoksyczność oraz gastrotoksyczność, której skutkiem są nudności i wymioty [86].

1.6. Ikarytyna

Pomimo znaczącego postępu w odkrywaniu i opracowywaniu nowatorskich leków przeciwnowotworowych, rak pozostaje najczęstszą przyczyną zgonów na świecie. Od wielu lat związki pochodzące z roślin znajdują się w czołówce jako ważne źródło terapii przeciwnowotworowych i odgrywają istotną rolę w profilaktyce i leczeniu nowotworów ze względu na ich dostępność i stosunkowo niską toksyczność w porównaniu z chemioterapią. Ponad 3000 gatunków roślin zostało zgłoszonych w leczeniu raka, a około trzydziestu związków pochodzenia roślinnego zostało wyizolowanych i przetestowanych w badaniach klinicznych. Mechanizmy działania roślinnych leków przeciwnowotworowych są liczne i większość z nich indukuje apoptotyczną śmierć komórek.

Ikarytyna ($C_{21}H_{20}O_6$) jest hydrolytycznym produktem ikariiny, która jest organicznym związkiem z grupy flawonoidów. Ikarytyna pochodzenia naturalnego występuje w *Epimedium Genus*, który należy do roślin z rodziny berberysowatych [87]. Masa cząsteczkowa ikarytyny wynosi 368,38 g/mol [88].



Ryc. 11. Struktura chemiczna ikarytyny.

[Ikarytyna | C₂₁H₂₀O₆ - PubChem
(nih.gov)]

Ikarytyna wykazuje szereg funkcji farmakologicznych i biologicznych zarówno w chorobach nienowotworowych, jak i w samych nowotworach, gdzie wykazuje działanie

antykanцерогенne poprzez indukowanie zatrzymania cyklu komórkowego, udział w procesie apoptozy, a także hamowanie migracji i inwazji komórek [89,90]. W komórkach niezmiennych nowotworowo wykazuje działanie immunoregulacyjne [91], neuroprotekcyjne [92], kardioprotekcyjne [93], a także zapobiega osteoporozie [94].

W ostatnich latach ikarytyna przyciąga coraz większą uwagę naukowców. Mechanizmy przeciwnowotworowe związku pochodzenia naturalnego wykazywane są w coraz szerszym zakresie. Dane literaturowe dowodzą, że ikarytyna skutecznie reguluje ekspresję wielu białek cyklu komórkowego (p16, p21, p27,) a dodatkowo hamuje cyklinę D1 oraz CDK4 skutkując zatrzymaniem cyklu komórkowego w fazie G1 [95]. Zatrzymanie cyklu w fazie S wywołane jest poprzez wpływ flawonoidu na ekspresję cykliny A i CDK2 [96], w fazie G1/S hamując działanie cykliny A, cykliny E oraz cykliny D1 [97], a w fazie G2/M poprzez zmniejszenie ekspresji CDC25, CDC2 i cykliny B [98]. Natomiast promowanie szlaków apoptotycznych przez ikarytynę związane między innymi z ligandem indukującym apoptozę związanym z TNF (TRAIL, *ang. Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand*) lub kaspazami wykazano w różnych rodzajach nowotworów, tj. glejak, rak wątroby, kostniakomięsak oraz rak jajnika [99,100]. Ikarytyna indukuje również proces apoptozy poprzez tłumienie szlaku Akt/mTor oraz aktywację białka p53 [101].

W przeciwieństwie do cisplatyny, która stosowana jest jako lek chemioterapeutyczny, ikarytyna wykazuje znacznie mniejsze działanie toksyczne dla organizmu. Przeprowadzone badania nad wpływem ikarytyny na raka wątroby zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* dowiodły, że ikarytyna prawie tak samo skutecznie jak cisplatyna hamuje progresję tego typu nowotworu, zachowując jednocześnie mniejszą toksyczność dla komórek prawidłowych wątroby [102]. Natomiast wyniki badań Zhu i wsp. dostarczają informacji, iż ikarytyna nie powodowała supresji szpiku kostnego u badanych myszy [103].

Analiza danych dostępnych w bazie PubChem, dostarcza informacji o prowadzonych lub ukończonych badaniach klinicznych nad wpływem ikarytyny na choroby nowotworowe. Pierwsze badania kliniczne odbyły się dekadę temu nad rakiem piersi, które niestety zakończone zostały już w pierwszej fazie bez powodzenia. Kolejne badania z użyciem ikarytyny w raku wątroby znajdują się już w III fazie badań klinicznych [88].

Dostępne informacje na temat wpływu ikarytyny na komórki zdrowe i zmienione

nowotworowo oraz wykazanie niskiej toksyczności omawianego związku mogą sugerować w przyszłości powodzenie w terapii przeciwnowotworowej. Aktualnie dostępne dane o wpływie ikarytyny na poszczególne mechanizmy komórkowe są nieprecyzyjne. Dlatego ważnym krokiem w badaniach omawianego związku będzie sprawdzenie interakcji ikarytyny z istniejącymi już lekami przeciwnowotworowymi w celu ustalenia, czy mogą wywołać efekt synergistyczny lub antagonistyczny.

2. Założenia i cele pracy

Transformacja nowotworowa następuje w wyniku mutacji powstałych podczas proliferacji i różnicowania komórek, syntezy oraz naprawy DNA, a także na drodze regulacji procesu śmierci komórki. Niezmieniony przebieg wymienionych procesów wyznaczany jest przez poprawny przebieg cyklu komórkowego, w którym cykliny są pozytywnymi regulatorami. Utrzymanie prawidłowego poziomu cyklin istotne jest w wielu procesach komórkowych, a nieprawidłowa ekspresja białek regulatorowych przyczynia się do powstawania różnego typu nowotworów [104]. Ze względu na interakcje ekspresji cyklin z procesem nowotworzenia, kluczowe staje się dokładne poznanie mechanizmu regulatorowego białek cyklu komórkowego oraz wpływu ich poziomu na procesy komórkowe.

Celem badań prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej było określenie wpływu wzrastających dawek cisplatyny i ikarytyny na przeżywalność, morfologię, cykl komórkowy, potencjał migracyjny komórek, rodzaj indukowanej śmierci komórek oraz ekspresję cykliny Y w liniach komórkowych A549 i H1299.

Do tej pory nie zbadano wpływu cisplatyny i ikarytyny na ekspresję cykliny Y w komórkach linii A549 oraz H1299. Oba zastosowane związki wykazują działanie indukujące śmierć komórki.

Cel ten zrealizowano poprzez osiem zadań szczegółowych:

1. Ocenę przeżycia komórek z zastosowaniem testu MTT
2. Analizę morfologii komórek metodą barwienia hematoksyliną wg Mayera
3. Ocenę cyklu komórkowego przy użyciu cytometru przepływowego
4. Ocenę testu tworzenia kolonii
5. Ocenę migracji komórek
6. Ocenę rodzaju indukowanej śmierci komórek
7. Ocenę profilu ekspresyjnego cykliny Y, białka RRM2 oraz β -kateniny przy zastosowaniu metody cytometrii przepływowej
8. Ocenę ekspresji cykliny Y przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego

Dwa zadania dodatkowe:

1. Ocena tempa migracji komórek z zastosowaniem mikroskopu kontrastowo-fazowego
2. Ocena procesu powstawania kryształów

3. Materiały i metody

3.1. Hodowla i traktowanie komórek

Materiał do badań stanowiły komórki niedrobnokomórkowego raka płuca linii A549 i H1299 zakupione z ATCC (Amerykańska Kolekcja Kultur Komórkowych, *ang. American Type Culture Collection*). Komórki linii A549 hodowane były na dnie butelek 25 cm³, 75 cm³ lub płytek 6-dołkowych, 12-dołkowych, 24-dołkowych oraz 96-dołkowych (Falcon) w płynnym medium wzrostowym Dulbecco's Modified of Eagle's Medium (DMEM; zmodyfikowane płynne podłoże wzrostowe, *ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium*; CORNING, Mediatech) z L-glutaminą. Natomiast komórki linii H1299 hodowane były w medium Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640; CORNING, Mediatech) z L-glutaminą. Do każdego medium hodowlanego dodano 10% bydlęcej surowicy płodowej (płodowa surowica bydlęca, FBS: *ang. Fetal Bovine Serum*); CORNING, Mediatech) oraz 50 µg/ml penicyliny i streptomycyny (Sigma-Aldrich). Hodowlę komórek linii A549 i H1299 prowadzono w inkubatorze CO₂ (Thermo Scientific) w optymalnych warunkach, w atmosferze wynoszącej 95% wilgotności, zawierającej 5% CO₂ oraz w temperaturze 37°C. W takich warunkach hodowlę prowadzono 24 godziny. Po tym czasie komórki poddano działaniu cisplatyny (cis-Diamineplatinum (II) dichloride; Sigma-Aldrich) w stężeniach 10, 20, 30, 40 i 50 µM oraz ikarytyny (Icaritin; Sigma-Aldrich) w stężeniach 10, 20, 30, 40, 50 i 60 µM. Do dalszych badań wybrano cisplatynę w stężeniu 10 oraz 30 µM i ikarytynę w stężeniu 30 oraz 60 µM, natomiast komórki hodowane w takich samych warunkach bez dodatku związków stanowiły kontrole.

3.2. Analiza przeżycia komórek w teście MTT

Analizę przeżycia komórek przeprowadzono za pomocą testu MTT. Test MTT oparty jest na zdolności enzymu - dehydrogenazy mitochondrialnej do przekształcania żółtej, rozpuszczalnej w wodzie soli tetrazolowej (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl) -2,5-difenylotetrazoliowy) do nierozpuszczalnego formazanu, będącego ciemnoniebieskim produktem powyższej reakcji. Z komórek hodowanych na płytkach 96-dołkowych (1x10⁴ komórek/dołek dla linii A549 i H1299) i traktowanych przez 24 oraz 48 godzin wybranymi związkami za pomocą wyżej wymienionej metody usunięto medium i przepłukano je PBS (roztwór soli w buforze fosforanowym (*ang. Phosphate Buffered Saline*);

CORNING, Mediatech). Następnym etapem było dodanie 100 μ l roztworu roboczego MTT na dołek i inkubacja w temperaturze 37°C przez 2 godziny. Po upływie wyznaczonego czasu, usunięto roztwór roboczy MTT. Powstałe w wyniku reakcji kryształy formazanu rozpuszczono w 100 μ l DMSO (dimetylosulfotlenek; CHEMPUR) i ponownie inkubowano w 37°C przez 10 minut. Ostatnim etapem była analiza i pomiar absorpcji spektrofotometrycznie przy długości fali 570 nm. Z otrzymanych danych wyliczono procent zahamowania wzrostu komórek w obecności badanego związku, przyjmując absorpcję roztworu komórek kontrolnych jako 100%.

3.3. Analiza morfologii komórek metodą barwienia hematoksyliną wg Mayera

Komórki hodowano w płytkach 12-dołkowych (A549: 5×10^4 komórek/dołek; H1299: 4×10^4 komórek/dołek) na szkiełkach nakrywkowych zgodnie z wyżej opisaną metodą. Na początku usunięto medium i przepłukano komórki PBS (3x5 minut). Kolejnym etapem było utrwalenie komórek w 4% PFA (paraformaldehyd, *ang. Paraformaldehyde*; Sigma-Aldrich) przez 20 minut. Następnie komórki przepłukano najpierw PBS (3x5 minut), a następnie wodą destylowaną (5x30 sekund). Po płukaniu dodano hematoksylinę (Sigma-Aldrich) i inkubowano 3 minuty, przepłukano komórki wodą wodociągową (3x5 minut) i inkubowano przez 10 minut w PBS. Po inkubacji szkiełka osuszono i zamknięto w medium zamykającym Aqua Poly Mount (Polysciences Inc.) Do oceny morfologii komórek zastosowano mikroskop świetlny Eclipse E800 (Nikon) z zastosowaniem systemu komputerowej analizy obrazu, w oparciu o program NIS-elements 4.00 i kamerę CCD (DS.-5Mc-U, Nikon).

3.4. Analiza cyklu komórkowego

Analizę cyklu komórkowego linii A549 i H1299 traktowanych cisplatyną i ikarytyną przeprowadzono z zastosowaniem cytometru przepływowego (Merck Guava 6HT-2L). Komórki hodowano na płytkach 6-dołkowych (A549: 10×10^4 komórek/dołek, H1299: 8×10^4 komórek/dołek) zgodnie z wyżej opisaną metodą. Pierwszym etapem było odklejenie komórek trypsyną (CORNING, Mediatech), przeniesienie zawartości dołeków do falconów i odwirowanie komórek (300xg, 6 min). Po odwirowaniu odciągnięto supernatant i osad składający się z komórek przepłukano PBS i ponownie odwirowano (300xg, 6 min). Następnie

przeprowadzono utrwalenie komórek w 1 ml 75% schłodzonego etanolu poprzez usunięcie PBS i dodawanie na vortexie kroplami schłodzonego etanolu. Zawiesinę rozpipetowano i przeniesiono do nowych eppendorfów. Tak przygotowane próbki umieszczone zostały w temperaturze -20°C na 24 godziny. Po inkubacji próbki zwirowano ($650\times g$, 5 min), usunięto etanol i dodano 1 ml zimnego PBS do każdej z nich w celu przepłukania. Następnie ponownie odwirowano ($500\times g$, 7 min), odciągnięto supernatant i dodano 200 μl kitu FxCycleTMPI/RNase Staining Solution (Invitrogen, Thermo Fisher) i inkubowano 30 minut w ciemności. Tak powstałe próbki nałożono po 200 μl na dołek płytki 96-dołkowej i analizowano na cytometrze przepływowym.

3.5. Analiza testu tworzenia kolonii

Test tworzenia kolonii jest testem przeżycia komórek, który opiera się na zdolności pojedynczej komórki do proliferacji i w ostateczności do tworzenia kolonii przez dłuższy czas. Komórki hodowano na płytkach 6-dołkowych przy użyciu wyżej opisanej metody (A549: 10×10^4 komórek/dołek, H1299: 8×10^4 komórek/dołek). Po uzyskaniu konfluencji hodowli około 70%, potraktowano komórki cisplatyną i ikarytyną. Komórki nietraktowane stanowiły kontrolę. Po 48 godzinach komórki odklejono i wysiano na nowo po 1 tysiąc komórek na dołek. Wzrost kolonii trwał 10 dni, a w tym czasie co 2 dni zmieniano medium hodowlane. Następnie odciągnięto medium i dodano 4% PFA na 20 minut. Po inkubacji przepłukano dołki PBS (3×5 minut) i inkubowano w metanolu przez 10 minut. Tak utrwalone komórki przepłukano ponownie PBS (3×5 minut) i na 20-30 minut zalano fioletem krystalicznym. Po upływie wyznaczonego czasu komórki płukano do momentu, gdy fiolet krystaliczny został dokładnie wypłukany z dołków. Do oceny wyników zastosowano BIO-RAD ChemiDoc.

3.6. Analiza migracji komórek

Komórki hodowano na płytkach 24-dołkowych (A549: 25×10^4 komórek/dołek, H1299: 20×10^4 komórek/dołek) według wcześniej opisanej metody. Po uzyskaniu konfluencji hodowli około 70%, potraktowano komórki cisplatyną i ikarytyną w odpowiednich stężeniach. Komórki nietraktowane stanowiły kontrolę. Po 48 godzinnej inkubacji przy użyciu trypsyny odklejono komórki. Na nowe płytki 24-dołkowe z medium z 10% FBS (750 μl /dołek) nałożono inserty, na

które wysiano odklejone wcześniej komórki w gęstości $25-50 \times 10^4$ /insert i dodano medium bez FBS. Komórki inkubowano 16 godzin w inkubatorze. Po inkubacji odciągnięto medium i utrwalono komórki 3,7 % paraformaldehydem (2 min). Następnie inserty i dołki przepłukano dwukrotnie PBS. Kolejnym etapem była permeabilizacja błony komórkowej schłodzonym 100% metanolem przez 20 min pod wyciągiem. Komórki ponownie przepłukano dwukrotnie PBS i dodano na inserty fiolet krystaliczny (CORNING, Mediatech) i inkubowano 15 minut. Wypłukano inserty w PBS i patyczkami higienicznymi delikatnie oczyszczono inserty w środku. Do oceny migracji komórek zastosowano mikroskop świetlny Eclipse E800 (Nikon) z zastosowaniem systemu komputerowej analizy obrazu, w oparciu o program NIS-elements 4.00 i kamerę CCD (DS.-5Mc-U, Nikon).

3.7. Analiza tempa migracji komórek

Analizę potencjału migracyjnego komórek wykonano przy użyciu mikroskopu kontrastowo-fazowego. Komórki hodowane były na płytkach 6-dołkowych przy użyciu wcześniej opisanej metody (A549: 10×10^4 komórek/dołek, H1299: 8×10^4 komórek/dołek) przez 24 godziny. Po tym czasie komórki potraktowano cisplatyną i ikarytyną w odpowiednich stężeniach i po godzinnej inkubacji w inkubatorze hodowlanym wstawiono do mikroskopu w celu analizy. Zdjęcia poklatkowe wykonywane były co 10 min przez 48 godzin w standardowych warunkach hodowli przy użyciu mikroskopu kontrastowo-fazowego Axio Observer Z1 (Zeiss) wyposażonego w system inkubacji do obrazowania żywych komórek (PeCon), przy użyciu obiektywu powietrznego EC Plan-Neofluar x 10/0.30 Ph1 (Zeiss), monokamery AxioCam 503 (Zeiss) oraz oprogramowania ZEN 2 (Zeiss). Zebrane wyniki analizowano w programie ImageJ.

3.8. Analiza rodzaju indukowanej śmierci komórek

W celu analizy procesu apoptozy badanych komórek, użyto cytometr przepływowy. Komórki hodowano na płytkach 6-dołkowych (A549: 10×10^4 komórek/dołek, H1299: 8×10^4 komórek/dołek) zgodnie z wcześniej opisaną metodyką. Pierwszym etapem było odklejenie komórek trypsyną, przeniesienie do falconów i odwirowanie (300xg, 6 min). Następnie usunięto medium nad osadu, przepłukano PBS, odwirowano (300xg, 6 min) i zawieszono

komórki w 100 μ l buforu ABB (Annexin V Binding Buffer 10x stężony, do użytku rozcieńczony w H₂O destylowanej; Elabscience). Następnie zawieszinę rozpipetowano i przeniesiono do eppendorfów. Kolejnym etapem było dodanie 2,5 μ l Aneksyny V (Annexin V-AF647 Reagent; Elabscience) i 2,5 μ l jodku propidyny (PI Staining Solution; Elabscience). Rozpipetowano i inkubowano 20 minut w ciemności. Po upływie czasu inkubacji dodano 400 μ l ABB. Powstałe w ten sposób próby analizowano na cytometrze dodając 200 μ l próby na dołek.

3.9. Analiza ekspresji cykliny Y, białka RRM2 oraz β -kateniny przy użyciu cytometru przepływowego

Analizę ekspresji cykliny Y, RRM2 (*ang. Ribonucleotide Reductase Regulatory Subunit M2*; podjednostka reduktazy rybonukleotydowo-difosforanowej M2) oraz β -kateniny w linii A549 i H1299 przeprowadzono za pomocą cytometru przepływowego. Komórki hodowane na płytkach 6-dołkowych (A549: 10×10^4 komórek/dołek, H1299: 8×10^4 komórek/dołek) zgodnie z wcześniej opisaną metodą. Komórki odklejono, odwirowano, odciągnięto medium, przepłukano PBS i ponownie odwirowano. Następnie dodano PFA (500 μ l/1 mln komórek) w celu utrwalenia i inkubowano 20-30 min. Kolejnym etapem było przepłukanie komórek PBS. Komórki odwirowano i odciągnięto płyn z nad osadu. Ostatnim etapem utrwalania było dodanie 1 ml 80% metanolu i pozostawienie w temperaturze -20°C przez 24 godziny. Po 24 godzinach komórki odwirowano (650xg, 5 min) i odciągnięto supernatant. Do osadu dodano 1 ml PBS w celu przepłukania komórek, rozpipetowano i ponownie odwirowano (500xg, 7 min). Po zwirowaniu odciągnięto supernatant, dodano 1 ml BSA (albumina surowicy bydlęcej, *ang. Bovine Serum Albumin*;) i inkubowano 20 min. Po inkubacji zwirowano i odciągnięto supernatant. Kolejnym etapem było dodanie pierwszorzędowego króliczego przeciwciała monoklonalnego IgG przeciwko cyklinie Y (Anti-cyclin Y; Sigma-Aldrich), RRM2 (Santa Cruz Biotechnology) lub β -kateninie (Invitrogen) w rozcieńczeniu 1:200 w obecności BSA i ponowne inkubowanie przez 30 minut. Następnie przepłukano komórki PBS, odwirowano i odciągnięto supernatant. Dodano drugorzędowe antykrólicze przeciwciało IgG skoniugowane z Alexa Fluor 647 (Invitrogen, Thermo Fisher) w rozcieńczeniu 1:200 w przypadku Cykliny Y, a antymysie przeciwciało IgG skoniugowane z Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Thermo Fisher) w przypadku RRM2 i β -kateniny i inkubowano w ciemności przez 30 minut. Komórki przepłukano PBS,

odwirowano i zawieszono w 200 μ l PBS. Do oceny wyników użyto cytometr przepływowo dodając na płytkę 200 μ l próby na dołek.

3.10. Analiza ekspresji cykliny Y przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego

Do oceny ekspresji cykliny Y w linii niedrobnokomórkowego raka płuca A549 i H1299 traktowanych cisplatyną oraz ikarytyną zastosowano metodę immunofluorescencji pośredniej. Do tej metody użyto komórek hodowanych na szkiełkach nakrywkowych umieszczonych w płytkach 12-dołkowych (A549: 10×10^4 komórek/dołek, H1299: 8×10^4 komórek/dołek), z których najpierw usunięto medium i utrwalano je w 4% PFA w temperaturze pokojowej przez 20 minut. Następnie przepłukano preparaty PBS (3x5 minut). Kolejnym etapem była permeabilizacja błony komórkowej. Po usunięciu PBS do komórek dodano 0,1% Triton X-100 i inkubowano 10 minut. Ponownie przepłukano szkiełka PBS (3x5 minut), dodano 1% BSA i inkubowano 30 minut. Następnie dodano pierwszorzędowe królicze przeciwciało monoklonalne IgG przeciwko cyklinie Y (Anti-cyclin Y; Sigma-Aldrich) w rozcieńczeniu 1:200 w 4% roztworze BSA i inkubowano 60 minut. Kolejne etapy przeprowadzono w ciemności. Po inkubacji komórki przepłukano trzykrotnie PBS i naniesiono drugorzędowe przeciwciało antykrólicze IgG skoniugowane z Alexa Fluor 594 (Invitrogen, Thermo Fisher) w rozcieńczeniu 1:200 i inkubowano 60 minut. Następnie trzykrotnie przepłukano komórki PBS. W celu uwidocznienia cytoszkieletu aktynowego, komórki potraktowano falloidyną (Invitrogen, Thermo Fisher) w rozcieńczeniu 1:400 w PBS i inkubowano 40 min. Po inkubacji przepłukano PBS (3x5 min). W celu wizualizacji jąder komórkowych użyto DAPI (4',6-diaminoino-2-fenylindol, *ang.* 4',6-Diamidino-2-Phenylindole) (Invitrogen, Thermo Fisher) rozcieńczone 1:100 w wodzie destylowanej i inkubowano 10 minut. 3-krotnie przepłukano PBS i zamknięto preparaty na szkiełkach podstawowych w medium zamykającym Aqua Poly Mount. Do oceny wyników zastosowano mikroskop fluorescencyjny Eclipse E800 (Nikon) i z systemem komputerowym do analizy obrazu opartym na programie NIS-elements 4.00 i kamerę CCD (DS.-5Mc-U, Nikon).

3.11. Analiza statystyczna

Dane, które zostały zaprezentowane w niniejszej pracy przedstawione zostały jako średnie arytmetyczne \pm odchylenie standardowe. Test t-Studenta posłużył do analizy statystycznej wyznaczenia efektywnej dawki IC₁₀, IC₅₀ oraz IC₈₀ (stężenie hamujące wzrost komórek; *ang. inhibitory concentration*) związków indukujących śmierć komórek. Dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA została wykonana dla danych uzyskanych z cytometru przepływowego tj. cykl komórkowy, rodzaj indukowanej śmierci komórki, relatywna średnia fluorescencji białek, a także dla testów tworzenia kolonii, migracji oraz tempa migracji komórek.

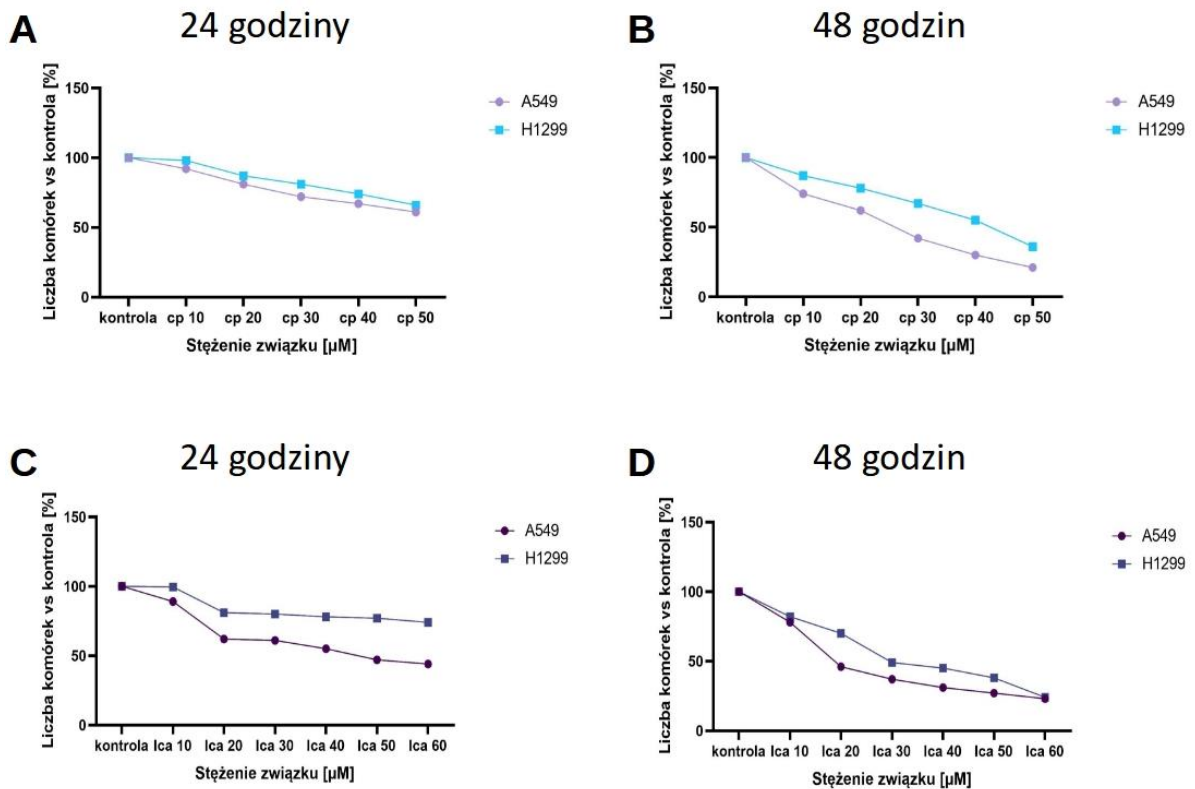
Analizę statystyczną wykonano w oparciu o program komputerowy GraphPad Prism w wersji 9.0 (GraphPad Software).

4. Wyniki

4.1. Ocena przeżycia komórek

Pierwszym etapem badań wpływu związków indukujących śmierć komórek na odpowiedź komórek jest wyznaczenie ich efektywnej dawki. W tym celu zastosowano wykres zależności zahamowania wzrostu komórek do stężenia badanego związku, gdzie komórki traktowane wyrażone są procentowo w stosunku do kontroli, którą przyjmuje się jako 100%. IC₁₀, IC₅₀ oraz IC₈₀ to stężenie związku, w którym zahamowanie wzrostu komórek wynosi odpowiednio 10%, 50% oraz 80% w stosunku do komórek kontrolnych, które nie są traktowane związkiem.

Efektywne stężenia cisplatyny i ikarytyny zostały wyznaczone na podstawie wyników absorbancji roztworu komórek linii A549 oraz H1299. Komórki kontrolne oznaczono jako 100% i na tej podstawie wyliczono procent przeżywalności, komórek obu linii traktowanych związkami w odpowiednich stężeniach. Dane z odczytu spektrofotometrycznego pozwoliły na wykonanie analizy statystycznej. Uzyskane wyniki pokazują, że zarówno cisplatyna, jak i ikarytyna hamowały proliferację komórek obu linii w sposób zależny od stężenia (wyk. 1). Oba związki wykazywały wyższą cytotoksyczność względem linii A549 przy dłuższym czasie inkubacji. Po 24 godzinach żaden ze związków nie wykazywał efektywnej dawki na poziomie IC₈₀ w linii komórkowej A549 oraz H1299. IC₁₀ oraz IC₅₀ w linii A549 dla ikarytyny wynosi odpowiednio 10 μ M i 45 μ M, natomiast dla cisplatyny wyznaczono tylko IC₁₀ wynoszące 10 μ M. Dla linii H1299 po 24h inkubacji ze związkiem wyznaczono wyłącznie IC₁₀, które dla ikarytyny wynosiło 15 μ M, natomiast dla cisplatyny wynosiło 20 μ M. Po 48 godzinach inkubacji z cisplatyną dla linii A549 IC₁₀, IC₅₀, oraz IC₈₀ wynosiły odpowiednio: 5, 25 oraz 50 μ M, natomiast z ikarytyną: 5, 20 i 60 μ M. W linii H1299 efektywne dawki IC₁₀, IC₅₀, oraz IC₈₀ dla ikarytyny wynosiły 5, 30 i 60 μ M, za to dla cisplatyny wyznaczono tylko IC₁₀ i IC₅₀ wynoszące odpowiednio: 10 i 40 μ M (tab. 3; tab. 4).



Wyk. 1. Zależny od dawki i czasu inkubacji wpływ cisplatyny i ikarytyny na linię komórkową A549 i H1299. Wykresy zostały opracowane na podstawie minimum trzech niezależnych doświadczeń. (A) Wpływ cisplatyny na linie A549 i H1299 po 24 godzinnej inkubacji ze związkiem. (B) Wpływ cisplatyny na linie A549 i H1299 po 48 godzinnej inkubacji ze związkiem. (C) Wpływ ikarytyny na linie A549 i H1299 po 24 godzinnej inkubacji ze związkiem. (D) Wpływ ikarytyny na linie A549 i H1299 po 48 godzinnej inkubacji ze związkiem. Analizę statystyczną przeprowadzono testem t-Studenta.

24 godziny		
Stężenie Cp	A549	H1299
IC ₁₀ [μM]	1,821 ± 0,024	1,19 ± 0,236
IC ₅₀ [μM]	-	-
IC ₈₀ [μM]	-	-

48 godzin		
Stężenie Cp	A549	H1299
IC ₁₀ [μM]	2,025 ± 0,138	1,285 ± 0,562
IC ₅₀ [μM]	1,215 ± 0,215	0,811 ± 0,118
IC ₈₀ [μM]	0,7 ± 0,197	-

Tab. 3. Wartości aktywności cytotoksycznej cisplatyny IC₁₀, IC₅₀ oraz IC₈₀ wobec komórek linii A549 i H1299 wyznaczone po 24 i 48 godzinach inkubacji ze związkiem. Wartości IC₁₀, IC₅₀ oraz IC₈₀ przedstawiono w postaci średnich ± odchylenie standardowe na podstawie minimum trzech niezależnych eksperymentów.

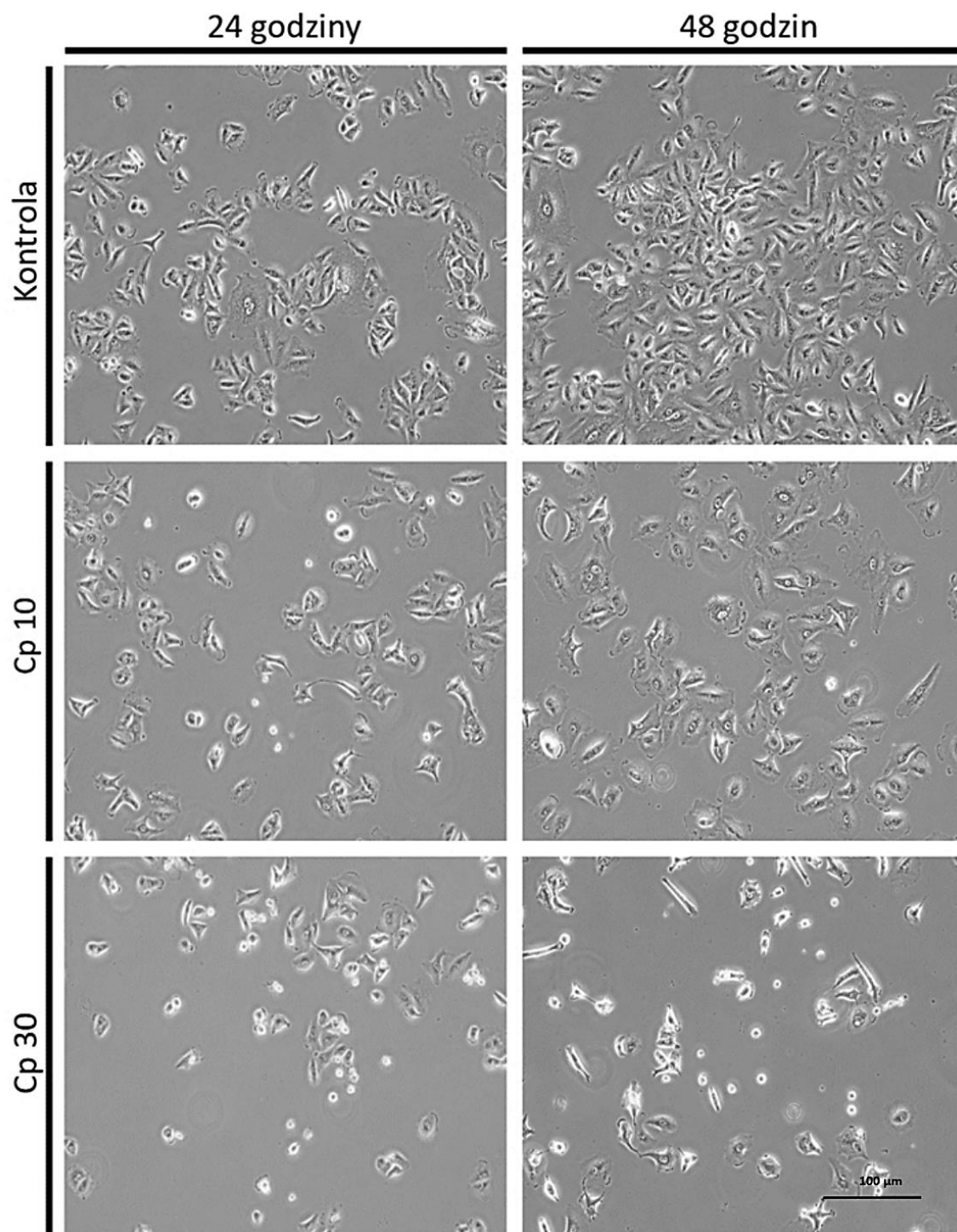
24 godziny		
Stężenie Ica	A549	H1299
IC ₁₀ [μM]	1,399 ± 0,397	1,267 ± 0,301
IC ₅₀ [μM]	0,808 ± 0,005	-
IC ₈₀ [μM]	-	-

48 godzin		
Stężenie Ica	A549	H1299
IC ₁₀ [μM]	1,943 ± 0,376	1,614 ± 0,141
IC ₅₀ [μM]	0,992 ± 0,269	0,87 ± 0,254
IC ₈₀ [μM]	0,503 ± 0,214	0,428 ± 0,036

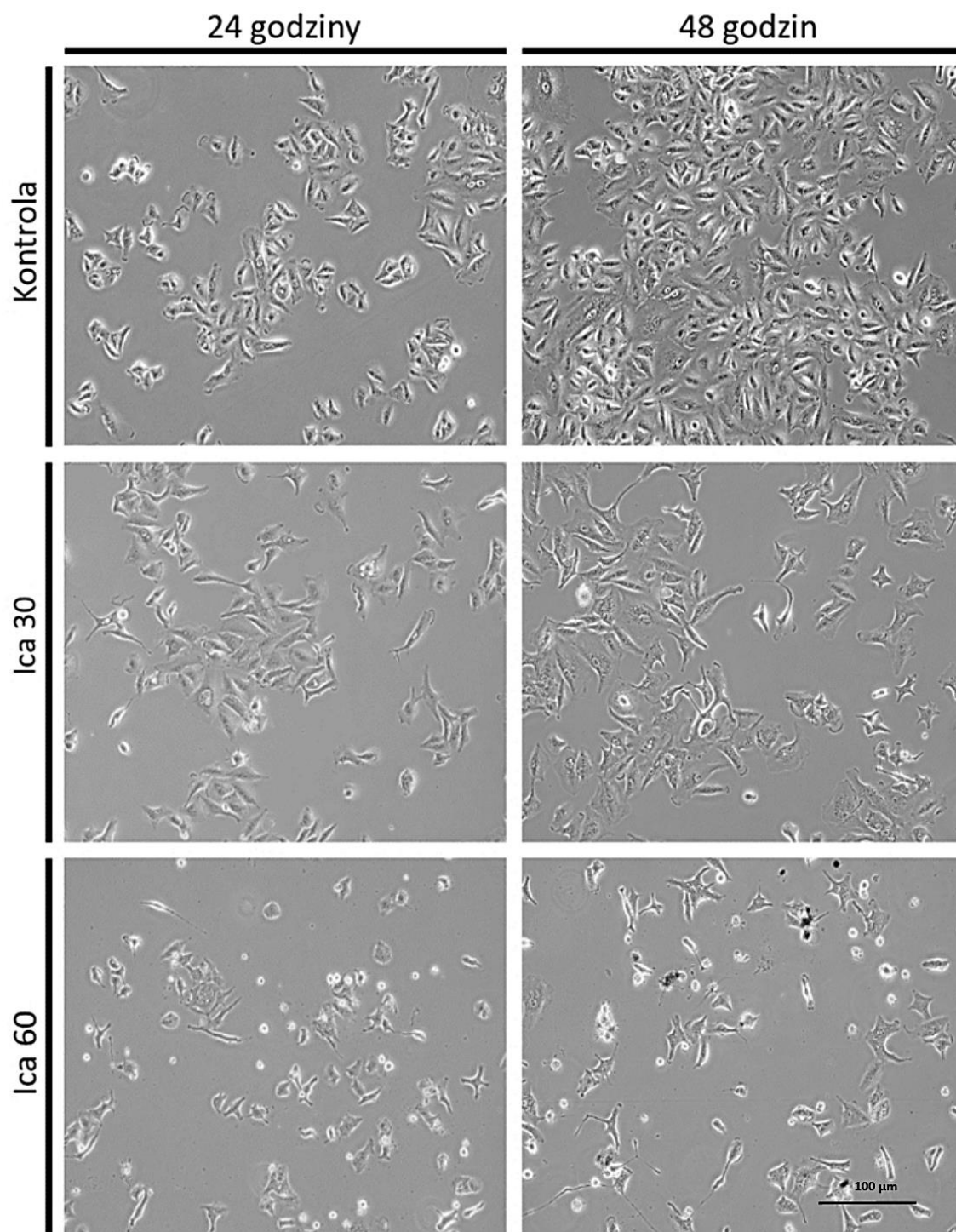
Tab. 4. Wartości aktywności cytotoksycznej ikarytyny IC₁₀, IC₅₀ oraz IC₈₀ wobec komórek linii A549 i H1299 wyznaczone po 24 i 48 godzinach inkubacji ze związkiem. Wartości IC₁₀, IC₅₀ oraz IC₈₀ przedstawiono w postaci średnich ± odchylenie standardowe na podstawie minimum trzech niezależnych eksperymentów.

Z otrzymanych wyników do dalszych badań wybrano dwie dawki cisplatyny tj. 10 i 30 μM (ryc. 12; ryc. 14) oraz ikarytyny tj. 30 i 60 μM (ryc. 13; ryc. 15) z uwzględnieniem między innymi IC₁₀, IC₅₀, oraz IC₈₀ badanych związków oraz skutków ubocznych zbyt wysokiego stężenia leku w przypadku stosowania go w terapii przeciwnowotworowej. W celu zachowania integralności wyników dla obu linii komórkowych wybrano takie same stężenia obu związków. Różnica w wynikach przeżywalności komórek wynikać może między innymi z cech charakterystycznych danej linii.

4.1.1. Komórki linii A549 traktowane cisplatyną i ikarytyną.

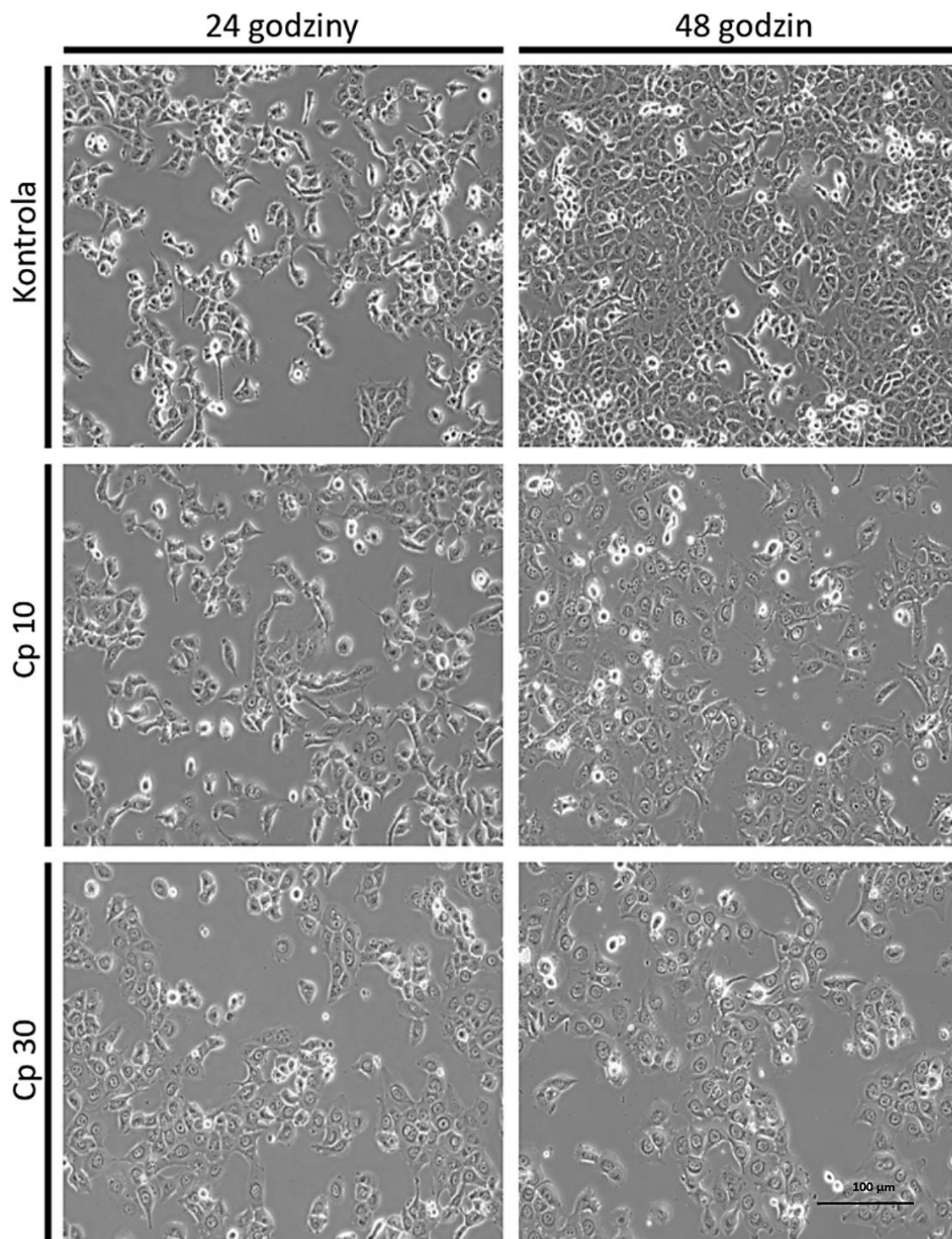


Ryc. 12. Komórki linii A549 (kontrola oraz 10 i 30 μM cisplatyny) po 24 i 48 godzinnej inkubacji. Zdjęcia wykonano w trakcie hodowli komórek przy użyciu mikroskopu świetlnego z kamerą OLYMPUS oraz aplikacji EPview™.

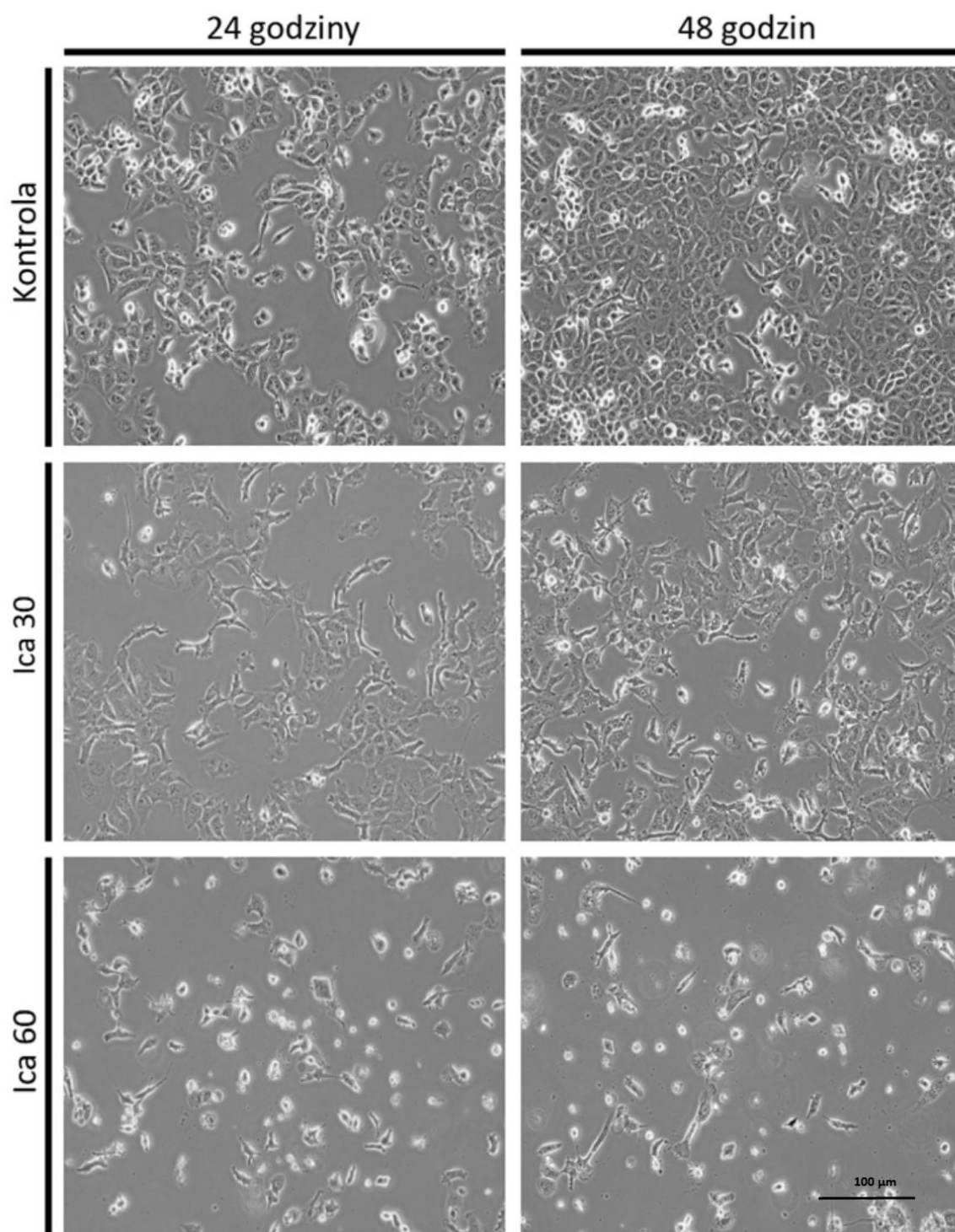


Ryc. 13. Komórki linii A549 (kontrola oraz 30 i 60 μM ikarytyny) po 24 i 48 godzinnej inkubacji. Zdjęcia wykonano w trakcie hodowli komórek przy użyciu mikroskopu świetlnego z kamerą OLYMPUS oraz aplikacji EPview™.

4.1.2. Komórki linii H1299 traktowane cisplatyną i ikarytyną



Ryc. 14. Komórki linii H1299 (kontrola oraz 10 i 30 μM cisplatyny) po 24 i 48 godzinnej inkubacji. Zdjęcia wykonano w trakcie hodowli komórek przy użyciu mikroskopu świetlnego z kamerą OLYMPUS oraz aplikacji EPview™



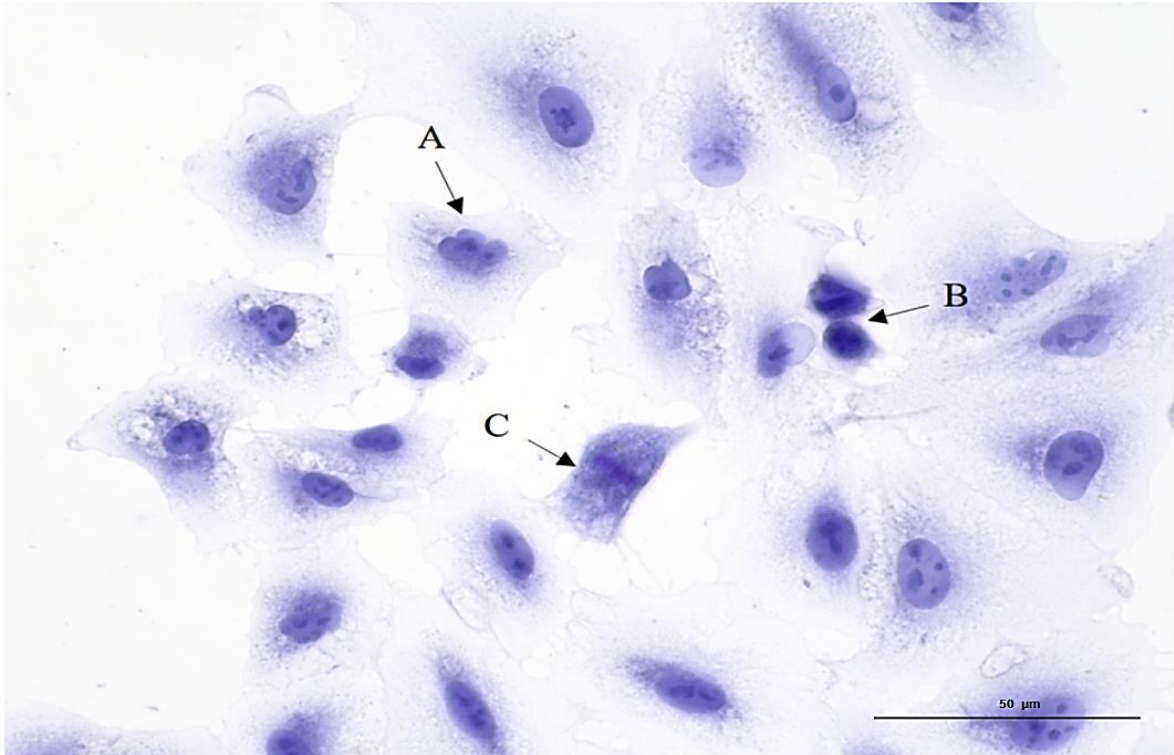
Ryc. 15. Komórki linii H1299 (kontrola oraz 30 i 60 µM ikarytyny) po 24 i 48 godzinnej inkubacji. Zdjęcia wykonano w trakcie hodowli komórek przy użyciu mikroskopu świetlnego z kamerą OLYMPUS oraz aplikacji EPview™.

4.2. Ocena morfologii komórek

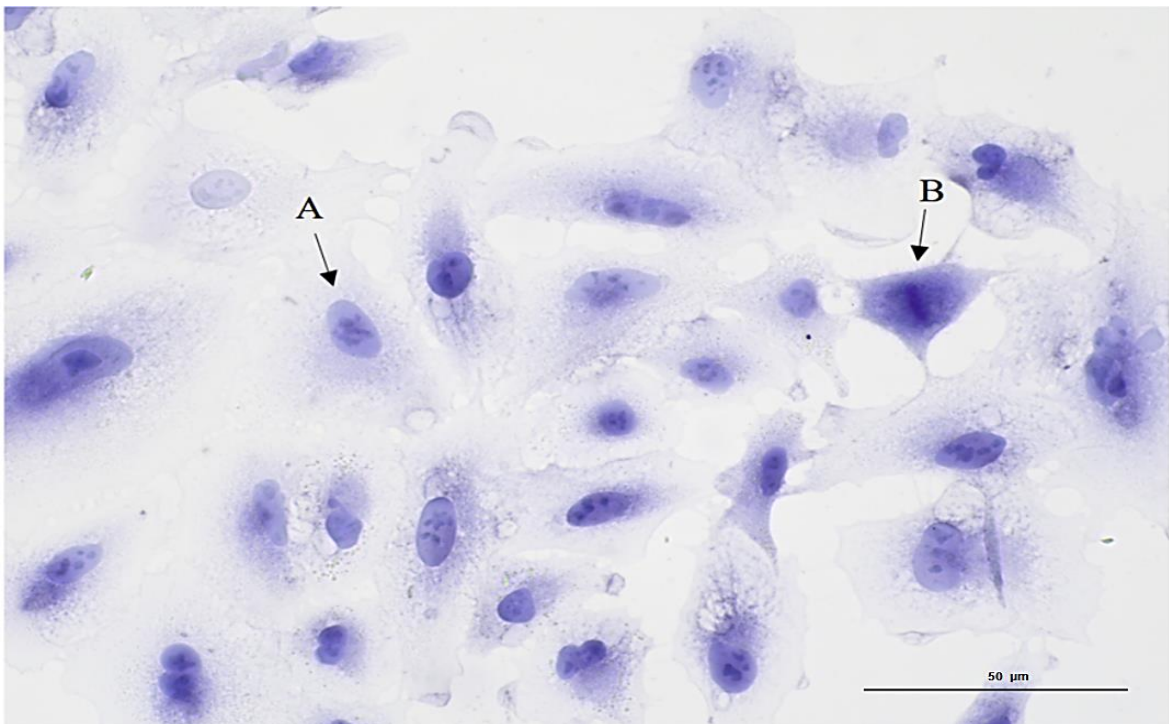
Morfologię komórek niedrobnokomórkowego raka płuca linii A549 i H1299 oceniono na podstawie testu barwienia hematoksyliną wg Mayera po 48 godzinach inkubacji ze związkami indukującymi śmierć komórki (tj. cisplatyna w stężeniach 10 i 30 μM oraz ikarytyna w stężeniach 30 i 60 μM). Analiza w mikroskopie świetlnym wykazała zmiany w morfologii komórek traktowanych w obu liniach komórkowych.

4.2.1. Komórki linii A549 traktowane cisplatyną i ikarytyną

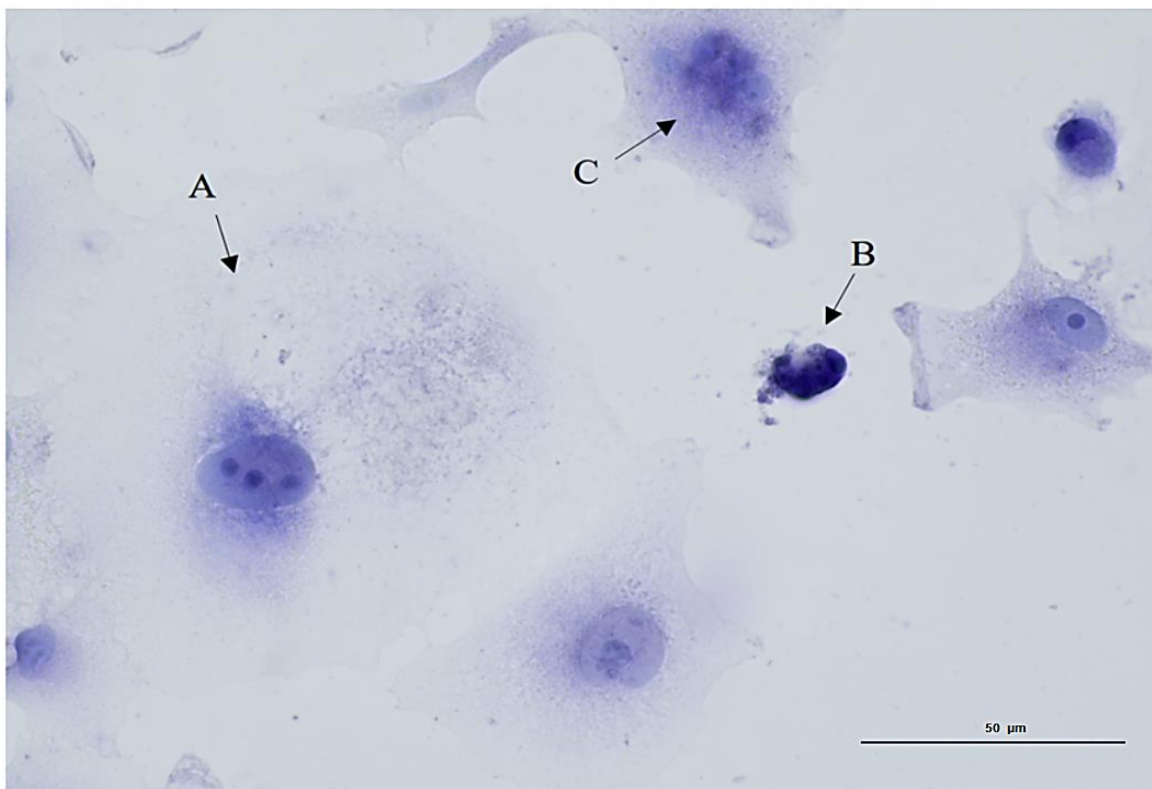
Wyniki analizowane przy zastosowaniu mikroskopu świetlnego wykazały, że komórki kontrolne posiadają typową morfologię komórek płaskonabłonkowych, rosnących adherentnie w monowarstwach. W centralnej części komórki znajduje się owalne jądro lub jądra komórkowe. Zaobserwowano również komórki w trakcie podziału mitotycznego (ryc. 16 i 17). W komórkach traktowanych cisplatyną w stężeniu 10 μM można już zaobserwować zachodzące zmiany w morfologii. Występują komórki powiększone, co świadczyć może o początkowych fazach nekrozy. Zaobserwowano również komórki martwe oraz komórki zawierające kilka mikrojąder. Zwiększeniu uległy również przestrzenie międzykomórkowe (ryc. 18; ryc. 19). Po zastosowaniu dawki 30 μM cisplatyny komórki linii A549 znacznie zmieniły swoją morfologię. Wpływ na to może mieć brak połączeń międzykomórkowych, który nastąpił poprzez zmniejszoną ilość komórek w wyniku zatrzymania cyklu komórkowego oraz indukcję śmierci. Zwiększeniu uległa ilość komórek apoptotycznych oraz martwych. (ryc. 20; ryc. 21). Ikarytyna w dawce 30 μM , tak samo jak cisplatyna, indukowała powstawanie komórek powiększonych z dużymi jądrami komórkowymi. W cytoplazmie występowały także struktury wakuolopodobne i powstawały drobne kryształy ikarytyny o nierównym kształcie (ryc. 22; 23). Po traktowaniu komórek 60 μM stężeniem ikarytyny nastąpiła ich znaczna degradacja zarówno na poziomie cytoplazmy, jak i jądra komórkowego. Widoczne były ciała apoptotyczne, komórki martwe, a także dalej tworzące się nieregularne kryształy ikarytyny (ryc. 24; ryc. 25). Bez względu na zastosowany rodzaj związku, a także jego stężenie zwiększeniu ulegała nie tylko wielkość komórek, ale również jąder komórkowych. Poprzez zastosowanie wyższych stężeń obu związków wykazano, że ilość komórek uległa obniżeniu.



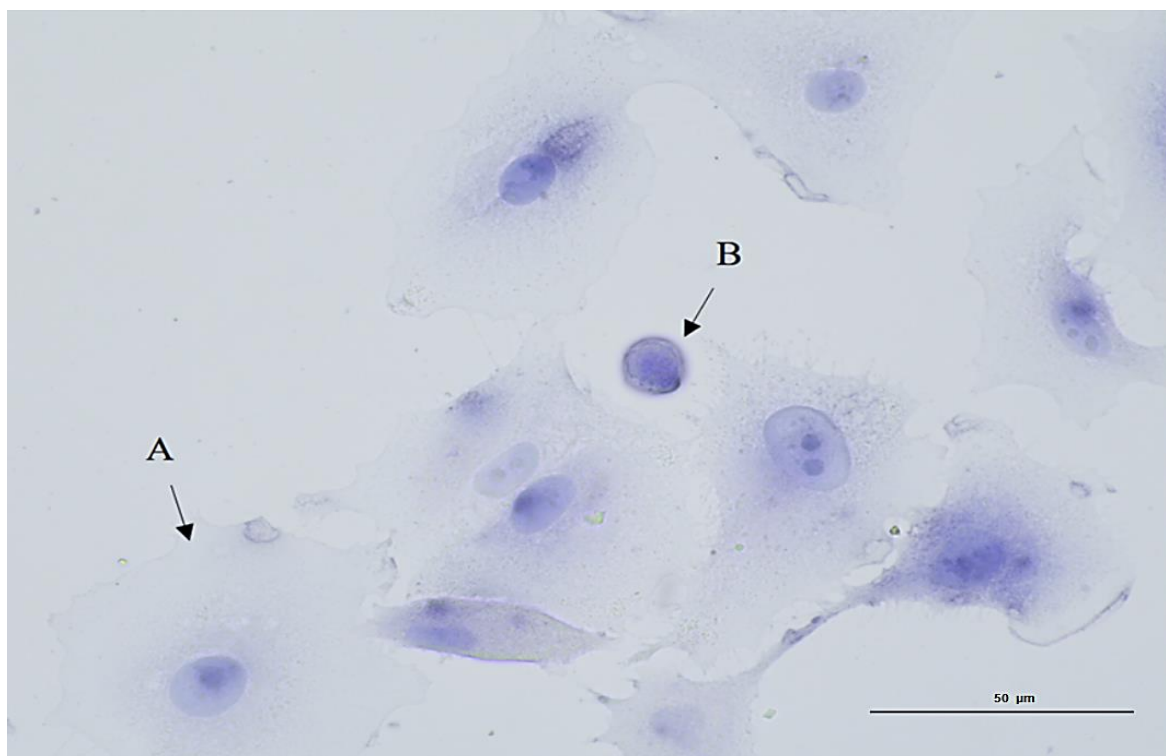
Ryc. 16. Komórki kontrolne linii A549 barwione hematoksyliną. A – komórka z kilkoma jądrami komórkowymi, B – komórka dzieląca się, C – komórka w początkowej fazie podziału.



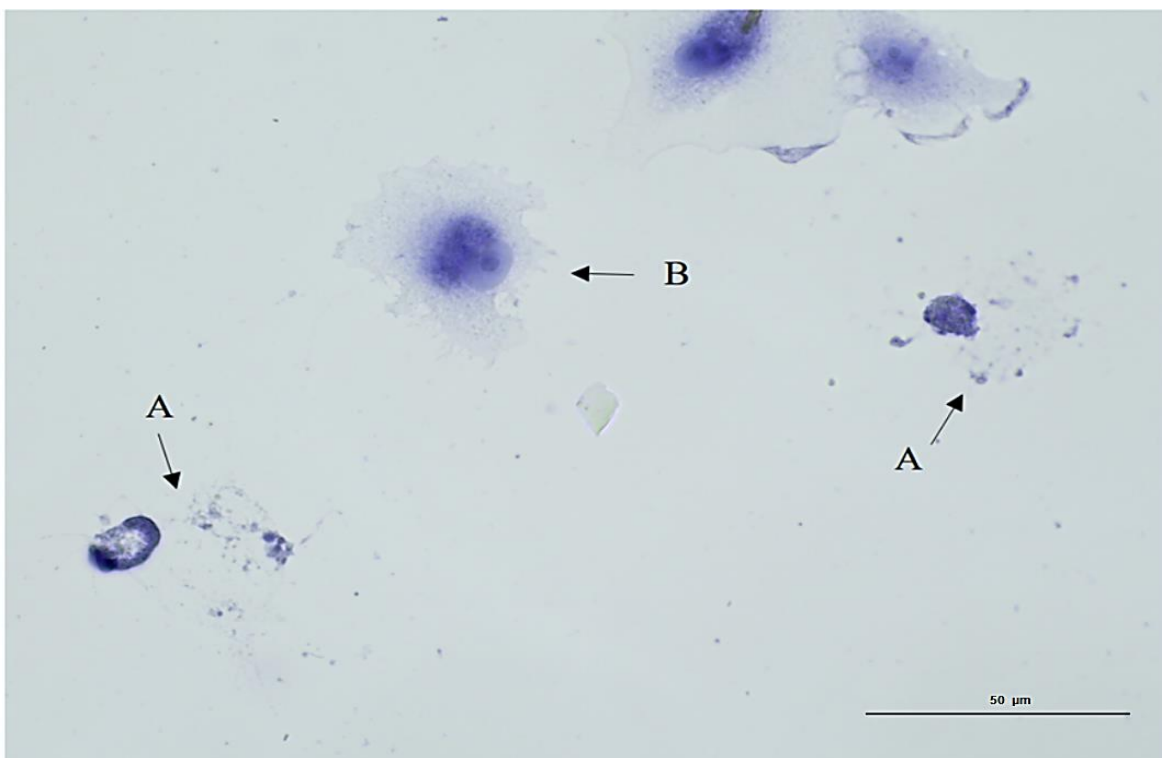
Ryc. 17. Komórki kontrolne linii A549 barwione hematoksyliną. A – komórka z centralnie ułożonym jądrem komórkowym, B – komórka w czasie podziału.



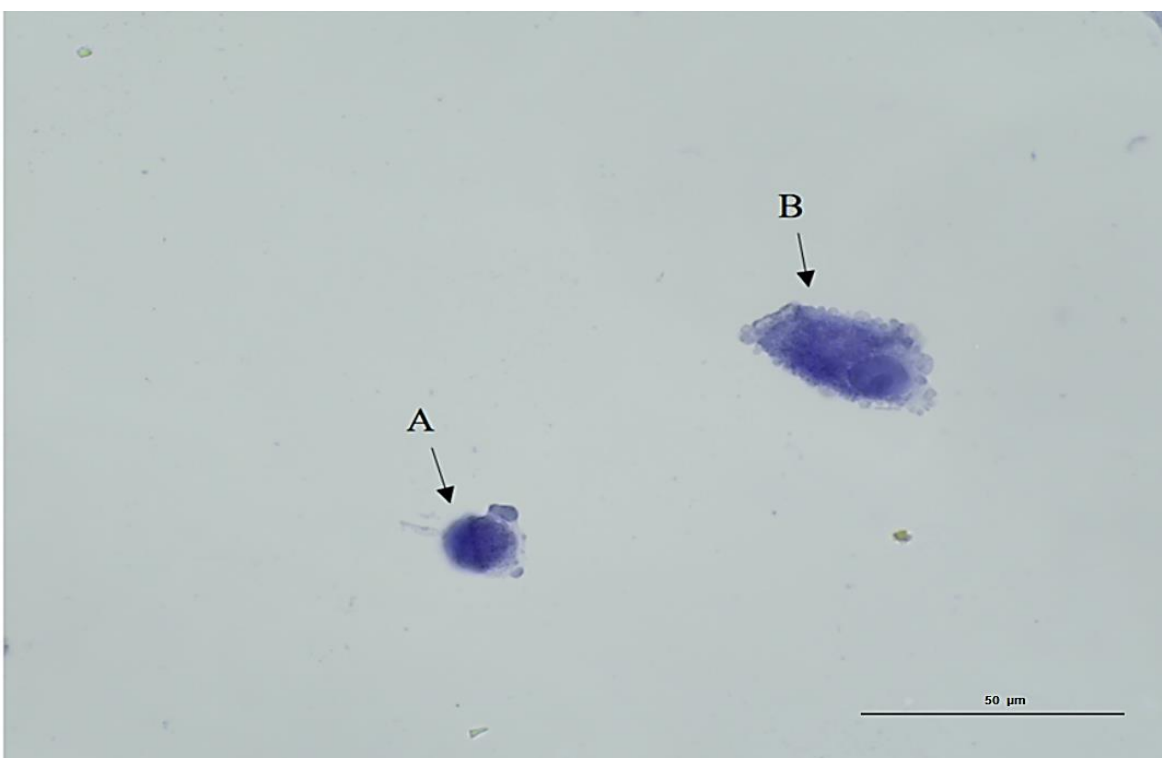
Ryc. 18. Komórki linii A549 traktowane cisplatyną w stężeniu 10 μM . A – powiększona komórka, B – martwa komórka, C – komórka z mikronukleacją.



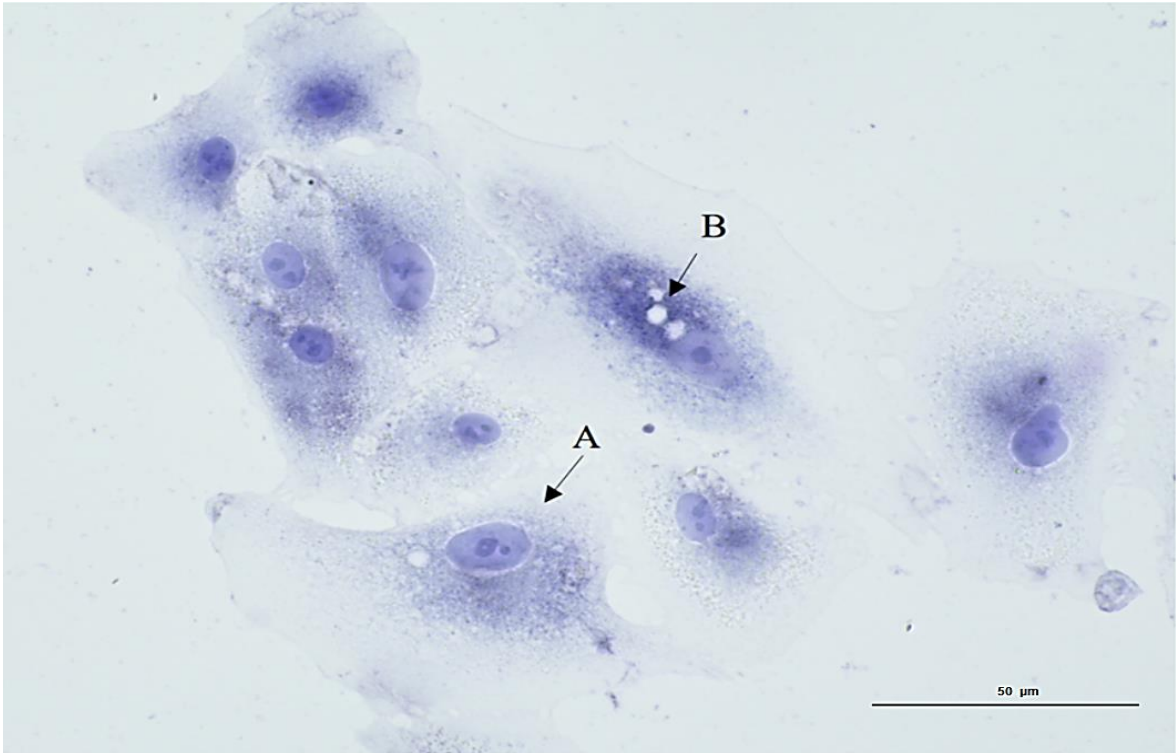
Ryc. 19. Komórki linii A549 traktowane cisplatyną w stężeniu 10 μM . A – komórka powiększona, B – komórka martwa.



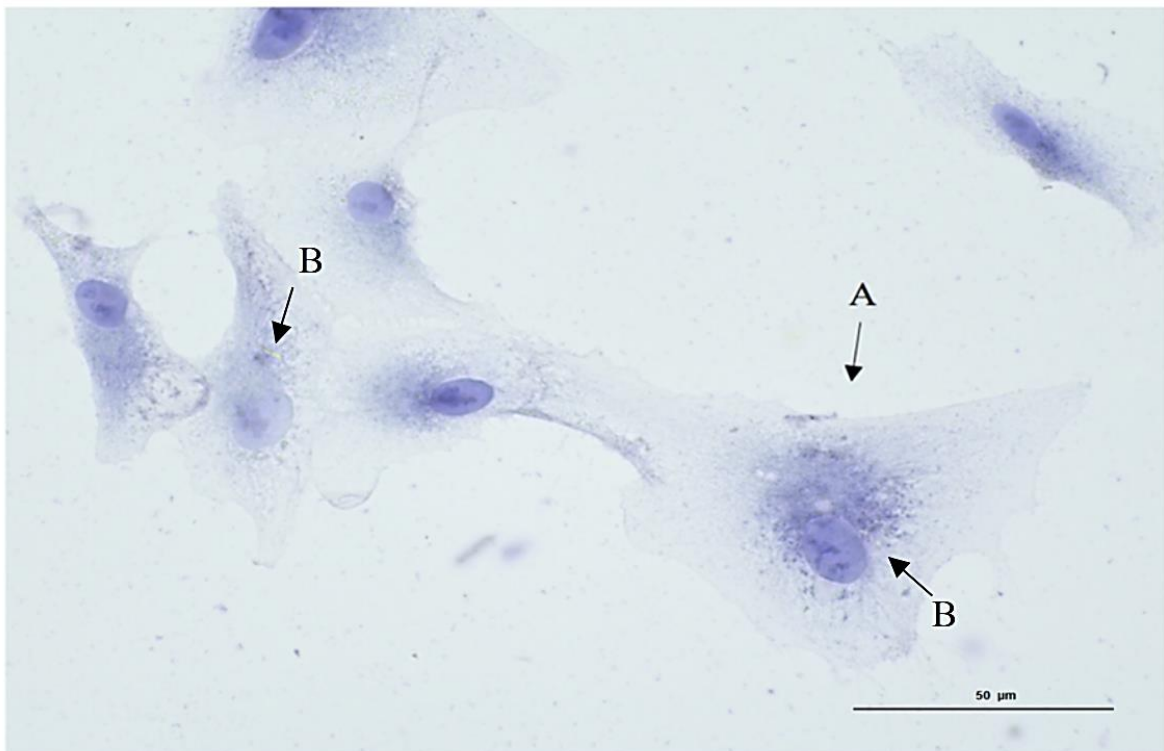
Ryc. 20. Komórki linii A549 traktowane cisplatyną w stężeniu 30 μM . A – komórki apoptotyczne, B – komórka powiększona, która zatraciła kształt charakterystyczny dla linii A549.



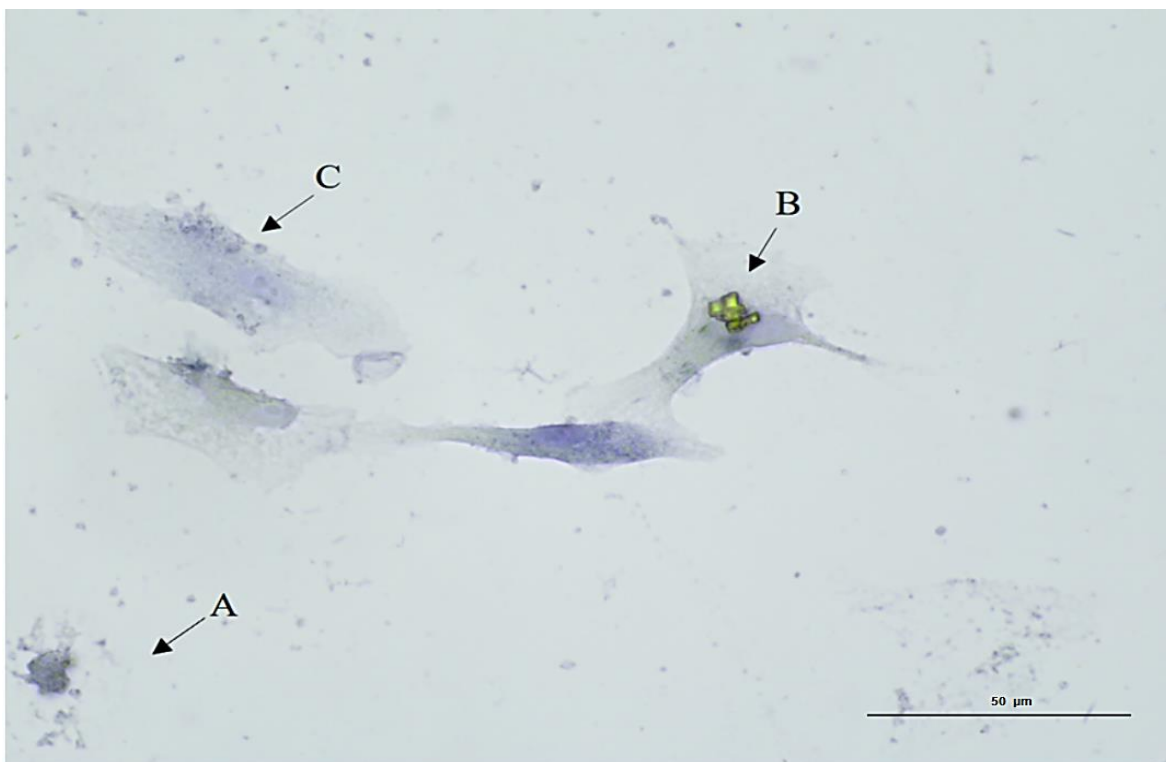
Ryc. 21. Komórki linii A549 traktowane cisplatyną w stężeniu 30 μM . A – komórka martwa, B – komórka apoptotyczna.



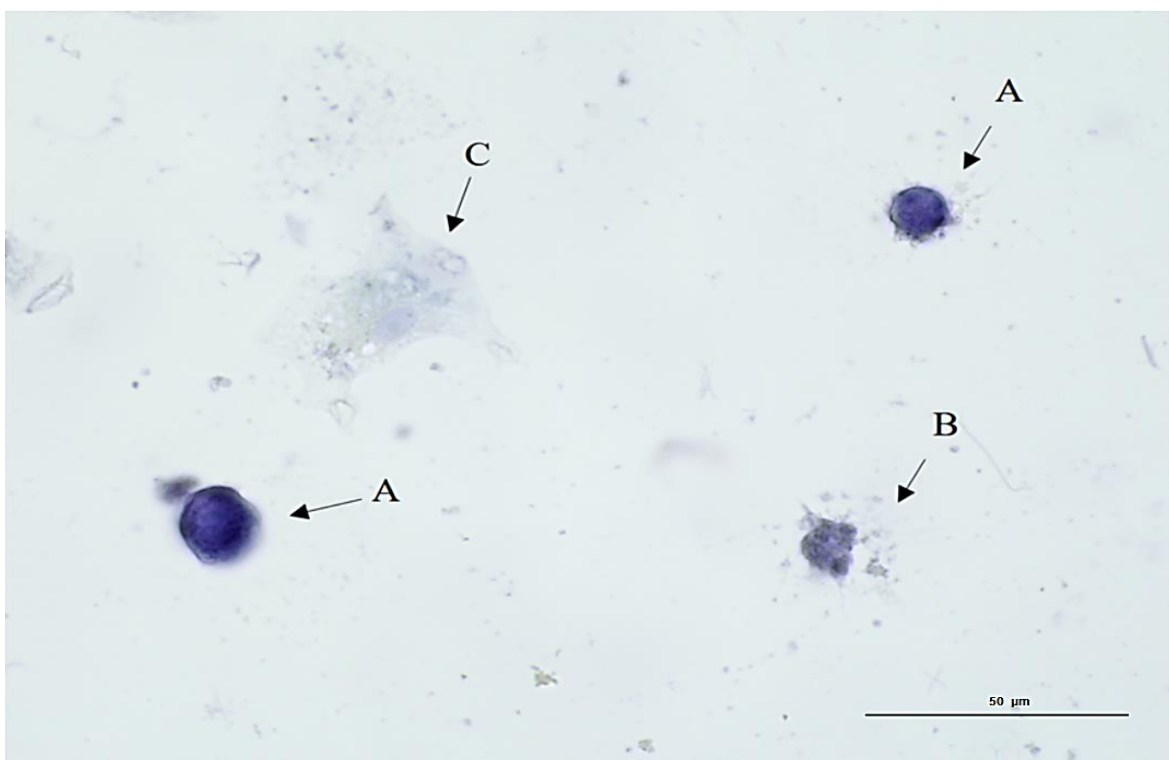
Ryc. 22. Komórki linii A549 traktowane ikarytyną w stężeniu 30 μM . A – Powiększona komórka z dużym jądrem, B – powiększona komórka ze strukturami wakuolopodobnymi.



Ryc. 23. Komórki linii A549 traktowane ikarytyną w stężeniu 30 μM . A – Powiększona komórka z dużym jądrem, B – mikrokryształy ikarytyny



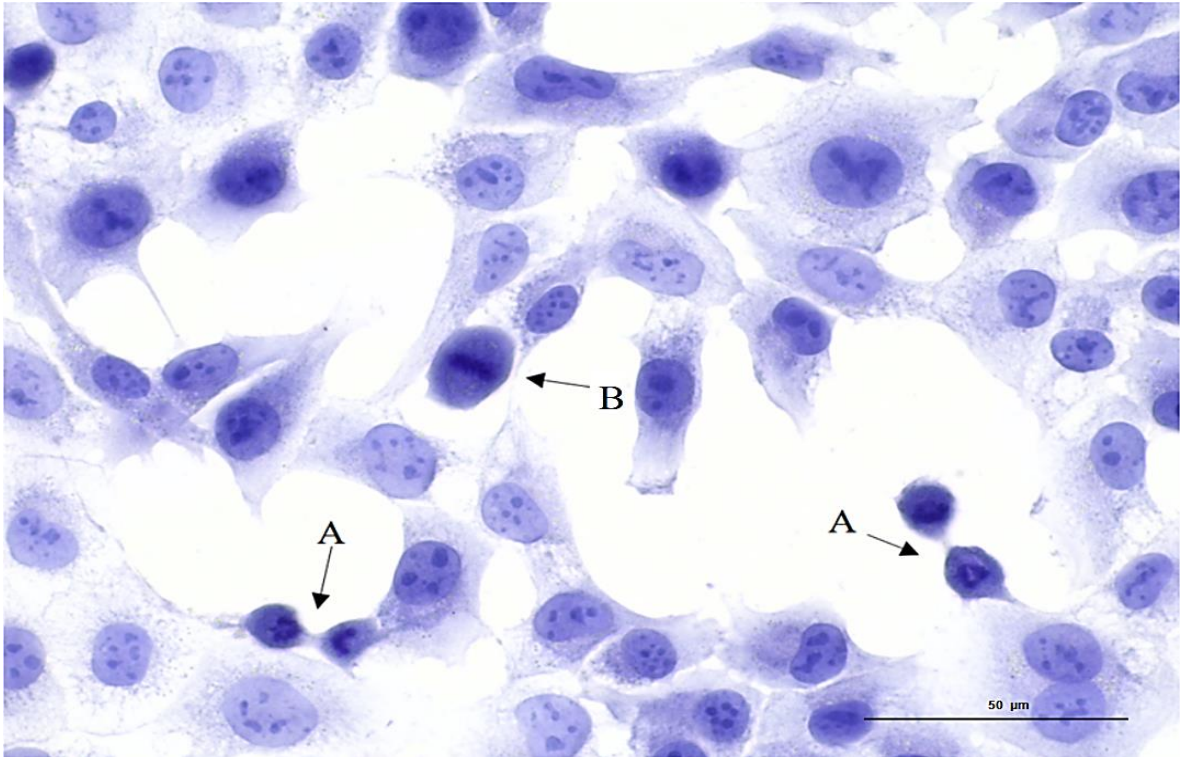
Ryc. 24. Komórki linii A549 traktowane ikarytyną w stężeniu 60 μM . A – komórka apoptotyczna, B – kryształy ikarytyny, C – komórka o nieregularnym kształcie z degradacją jądra komórkowego.



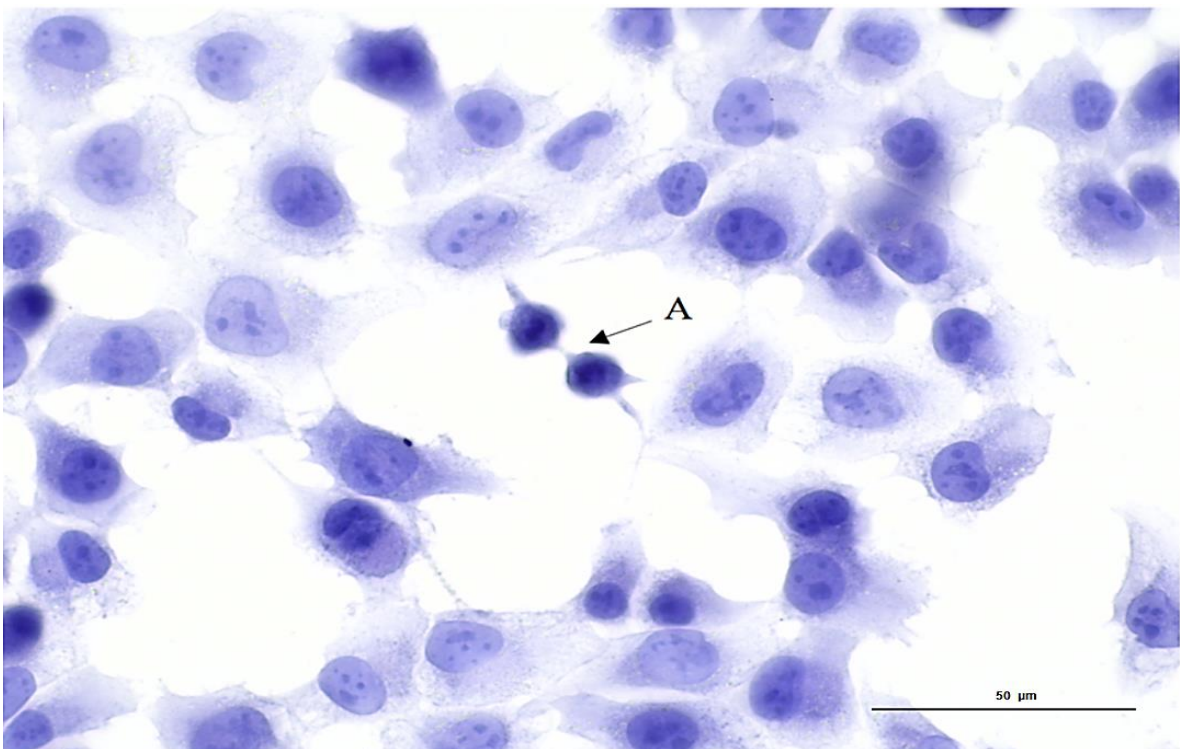
Ryc. 25. Komórki linii A549 traktowane ikarytyną w stężeniu 60 μM . A – komórki martwe, B – komórka apoptotyczna, C – komórka o nieregularnym kształcie ze strukturami wakuolopodobnymi.

4.2.2. Komórki linii H1299 traktowane cisplatyną i ikarytyną

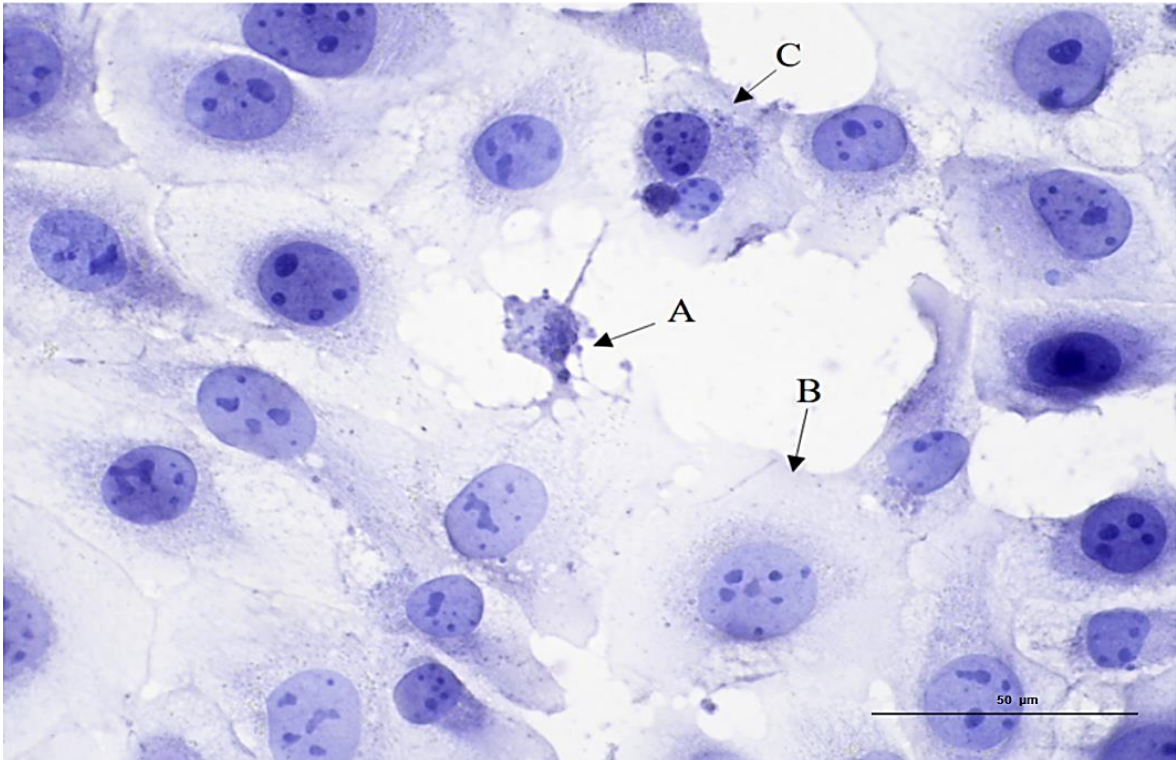
Analiza komórek kontrolnych linii H1299, wykazała typową morfologię komórek podobnych do nabłonka, rosnących adherentnie w monowarstwach. Występowały również komórki w różnych fazach podziału komórkowego (ryc. 26 i 27). Zastosowanie cisplatyny w stężeniu 10 μM spowodowało pojawienie się komórek apoptotycznych, komórek zawierających kilka mikrojader (co mogło świadczyć o początkowych etapach katastrofy mitotycznej), a także komórek powiększonych z powiększonym jądrem komórkowym. Zaobserwowano również komórki martwe oraz komórki z nieregularnym jądrem komórkowym (ryc. 28 i 29). W preparatach, w których komórki potraktowane zostały cisplatyną w stężeniu 30 μM , zaobserwowano zwiększenie przestrzeni międzykomórkowych. Większość komórek uległa powiększeniu, występowały struktury wakuolopodobne w cytoplazmie oraz występowały komórki z mikronukleacją (ryc. 30 i 31). Ikarytyna w stężeniu 30 μM indukowała zmiany w morfologii komórek. Występowały komórki o fenotypie katastrofy mitotycznej z kilkoma mikrojadrami oraz komórki powiększone z powiększonym jądrem komórkowym. Komórki zawierały również struktury wakuolopodobne w cytoplazmie. W preparatach widoczne były powstające kryształy ikarytyny (ryc. 32 i 33). Komórki powiększone z powiększonym jądrem komórkowym występowały także po traktowaniu ikarytyną w stężeniu 60 μM . Dodatkowo zaobserwowano komórki pomniejszone oraz martwe. Kryształy ikarytyny nabrały regularnego kształtu (romb) i były większe niż przy zastosowaniu mniejszej dawki związku. Ilość komórek uległa znacznemu zmniejszeniu (ryc. 34 i 35). Tak samo jak w przypadku linii A549, zastosowanie ikarytyny i cisplatyny wywołało zmiany w morfologii komórek linii H1299, a wraz ze wzrostem stężenia zaobserwowano zmniejszenie ilości komórek.



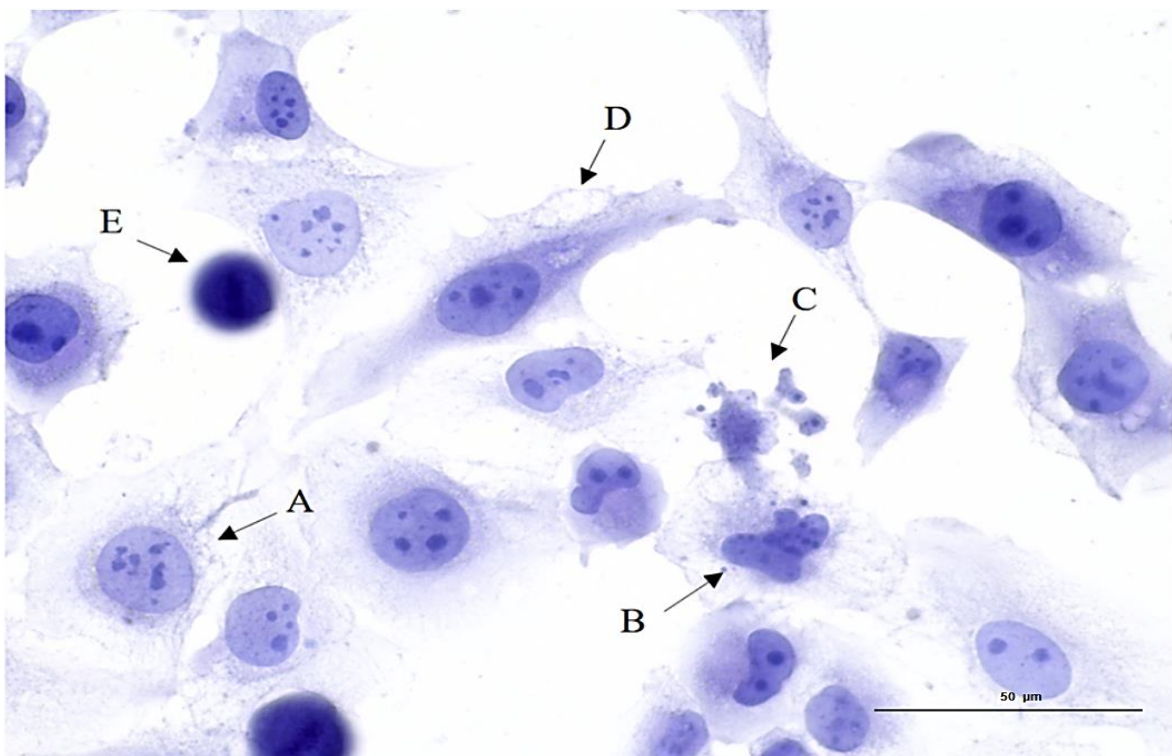
Ryc. 26. Komórki kontrolne linii H1299 barwione hematoksyliną. A – komórki dzielące się, B – komórka mitotyczna w początkowej fazie podziału.



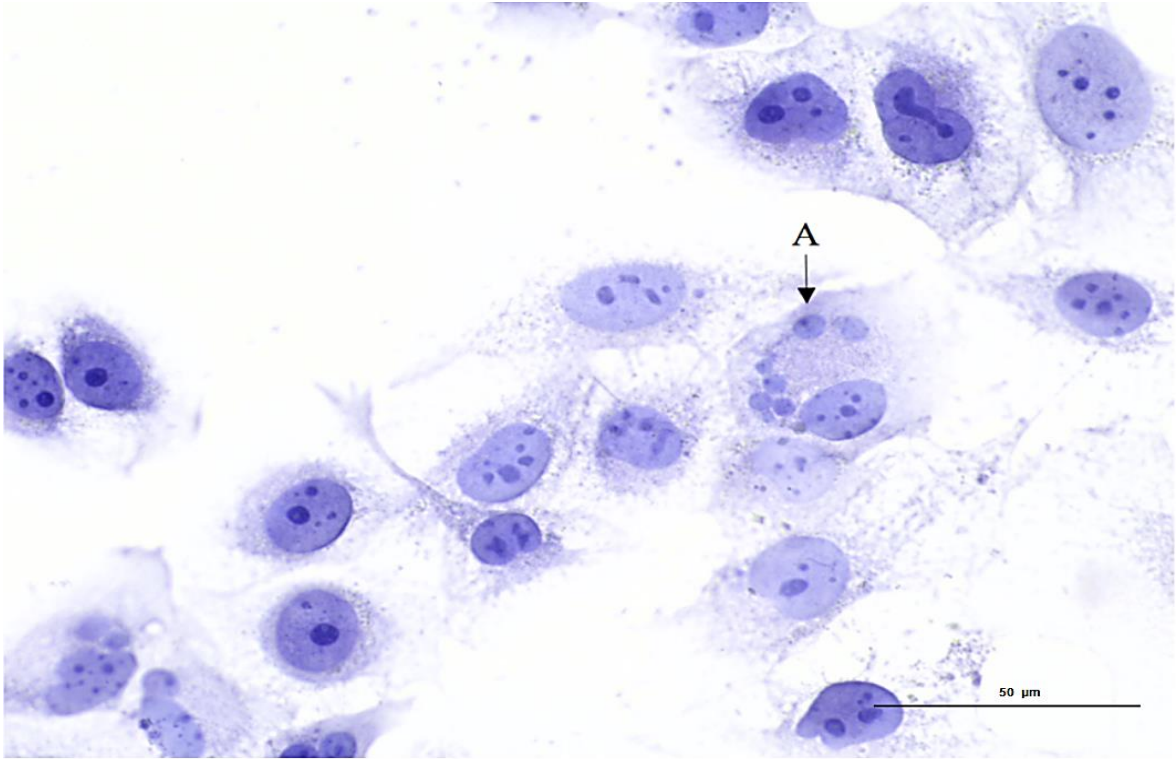
Ryc. 27. Komórki kontrolne linii H1299 barwione hematoksyliną. A – komórka dzieląca się.



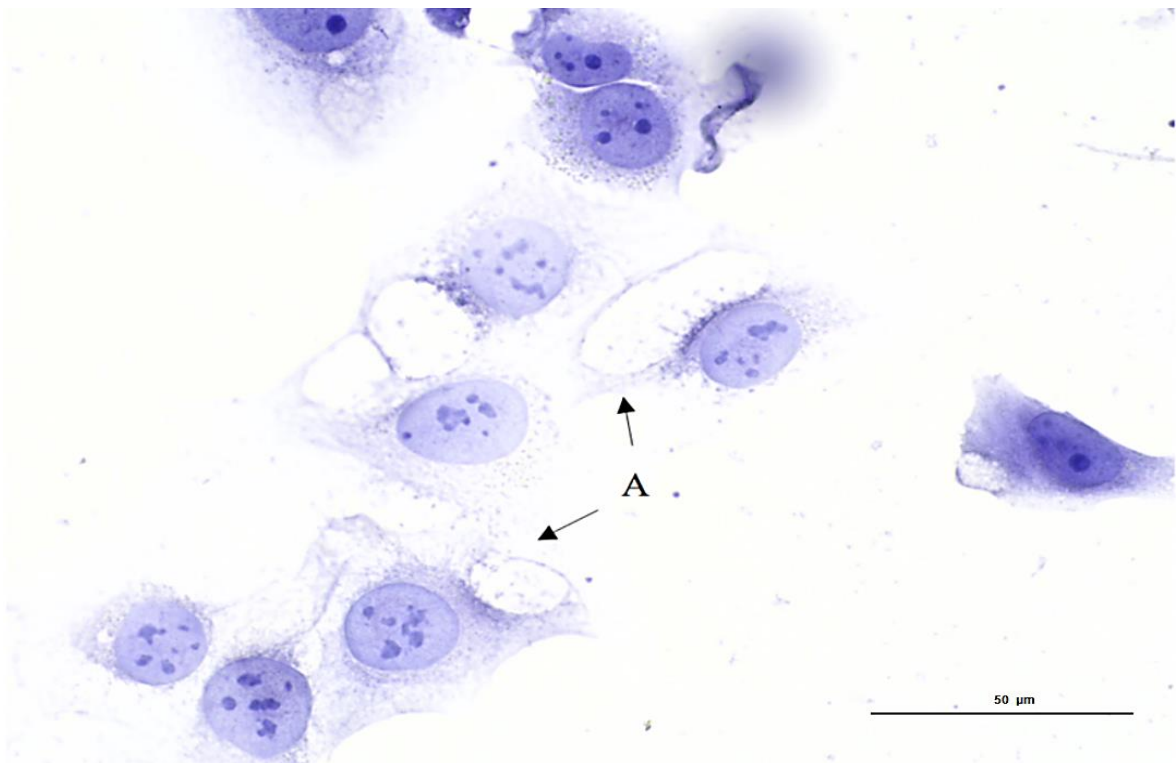
Ryc. 28. Komórki linii H1299 traktowane cisplatyną w stężeniu 10 μM . A – komórka apoptotyczna, B – komórka powiększona z dużym jądrem komórkowym, C – komórka z kilkoma jądrami.



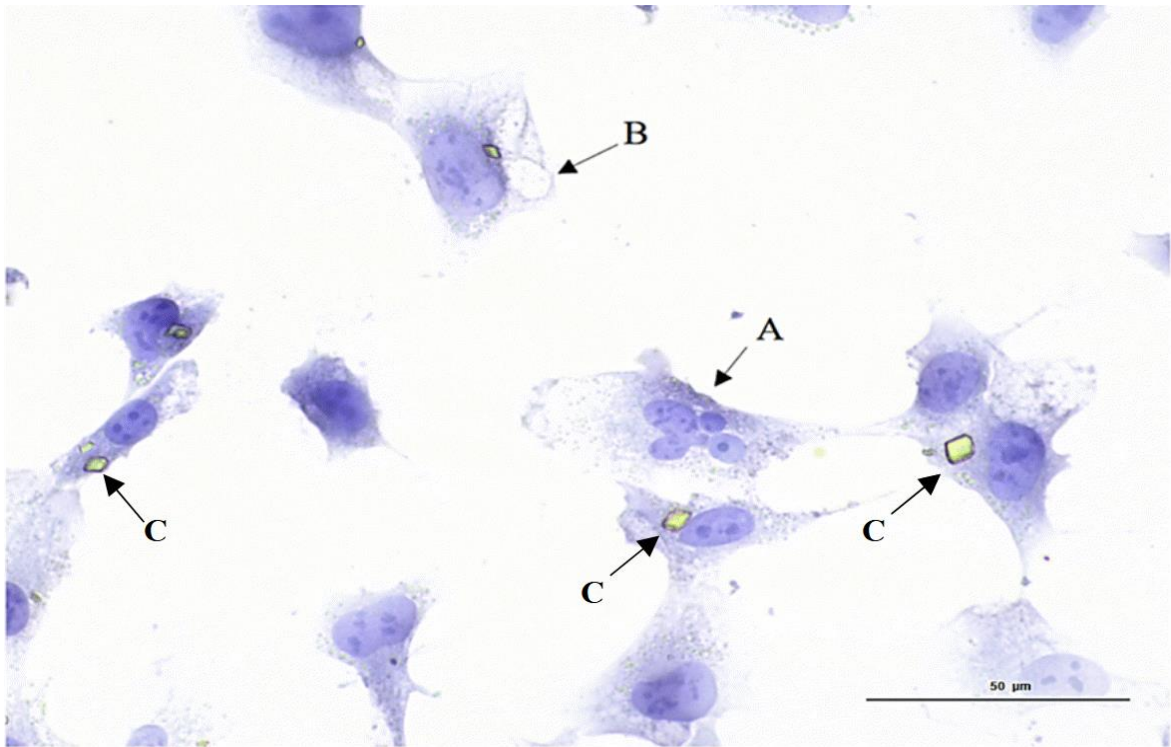
Ryc. 29. Komórki linii H1299 traktowane cisplatyną w stężeniu 10 μM . A – komórka powiększona z powiększonym jądrem komórkowym, B – komórka z deformacją jądra komórkowego, C – komórka apoptotyczna, D – struktury wakuolopodobne, E – komórka w fazie mitozy.



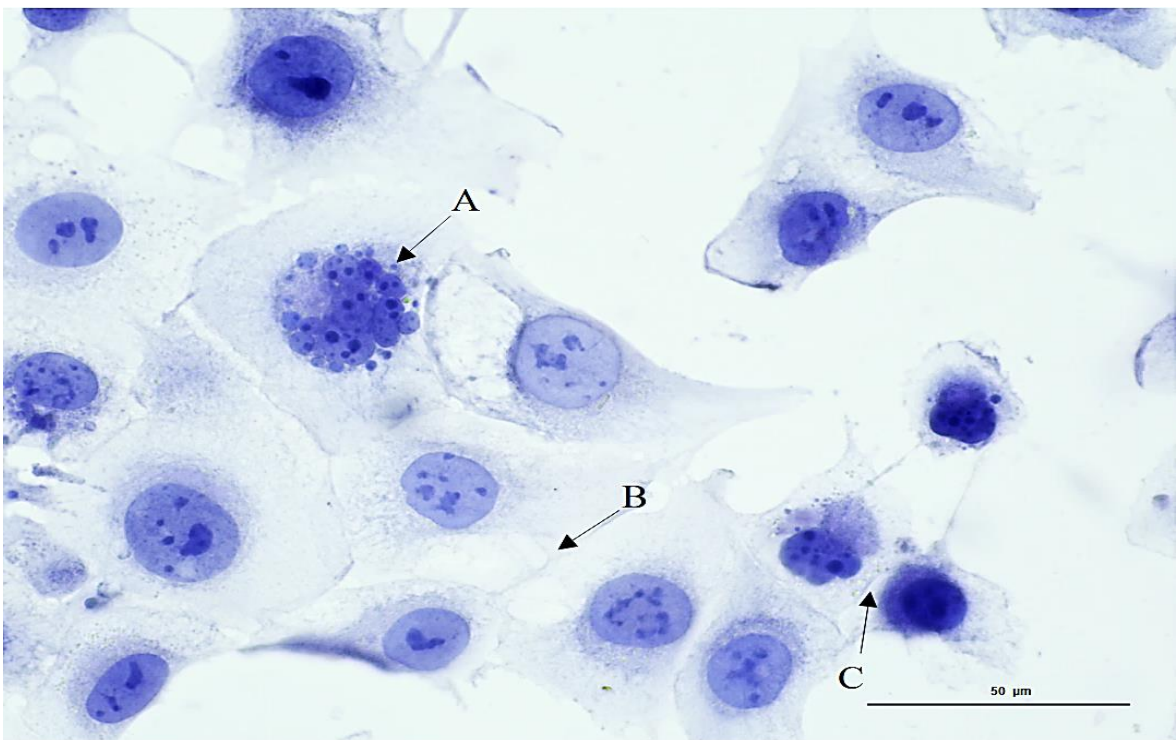
Ryc. 30 Komórki linii H1299 traktowane cisplatyną w stężeniu 30 μM. A – komórka z mikronukleacją.



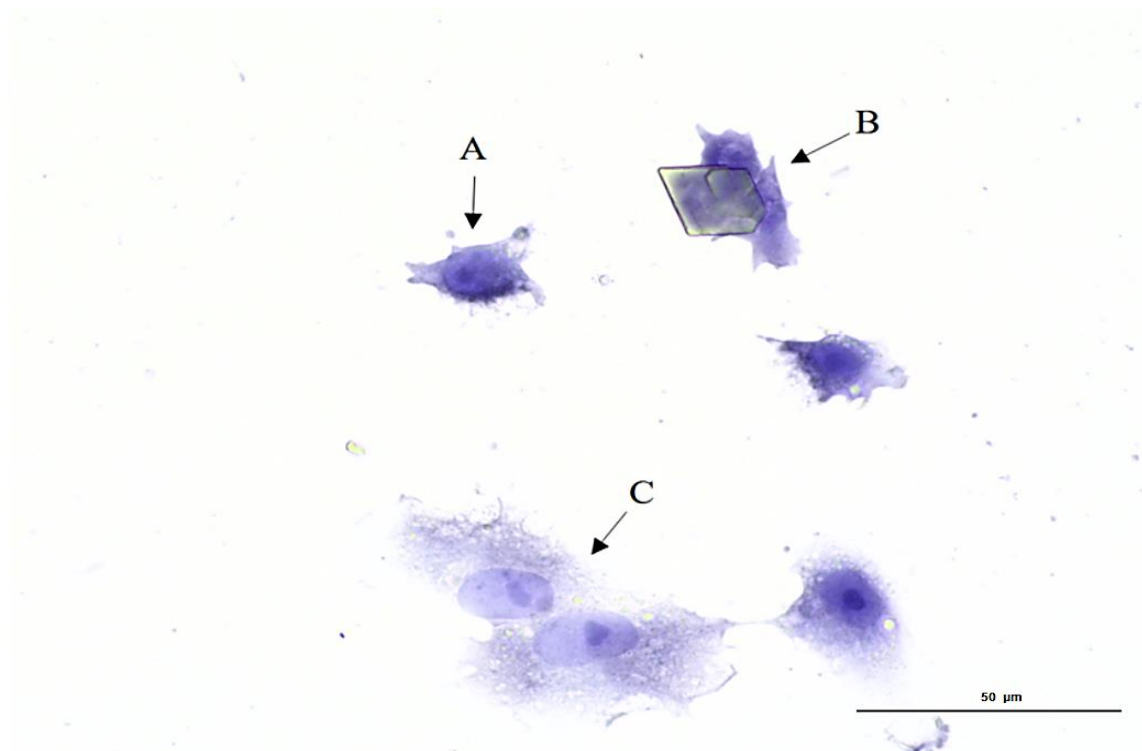
Ryc. 31. Komórki linii H1299 traktowane cisplatyną w stężeniu 30 μM. A – komórki ze strukturami wakuolopodobnymi.



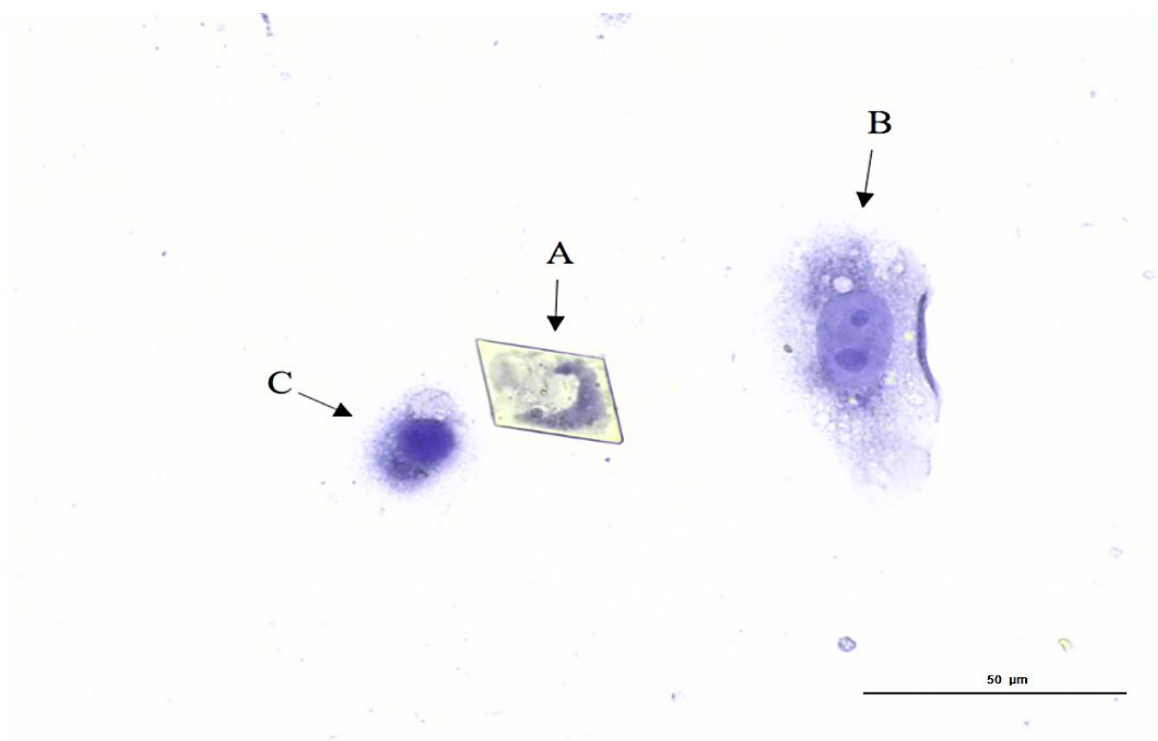
Ryc. 32. Komórki linii H1299 traktowane ikarytyną w stężeniu 30 μM . A – komórka o fenotypie katastrofy mitotycznej, B – struktury wakuolopodobne w cytoplazmie komórki, C – kryształy ikarytyny.



Ryc. 33. Komórki linii H1299 traktowane ikarytyną w stężeniu 30 μM . A – komórka powiększona z multinukleacją (fenotyp katastrofy mitotycznej), B – wakuolizacja cytoplazmy, C – mikrokryształy ikarytyny.



Ryc. 34. Komórki linii H1299 traktowane ikarytyną w stężeniu 60 μM . A – komórka pomniejszona, B – zdeformowana komórka zawierająca kryształ ikarytyny, C – komórki powiększone z deformacją cytoplazmy i powiększonymi jądrami komórkowymi.



Ryc. 35. Komórki linii H1299 traktowane ikarytyną w stężeniu 60 μM . A – Kryształ ikarytyny, B – komórka powiększona z powiększonym jądrem komórkowym, C – komórka martwa.

4.3. Ocena cyklu komórkowego

Cytometria przepływowa została wykorzystana do analizy cyklu komórkowego, w celu oszacowania odsetka komórek w poszczególnych fazach. Po wybarwieniu, DNA komórek wiąże barwnik proporcjonalnie do ilości materiału genetycznego obecnego w komórce.

4.3.1. Komórki linii A549

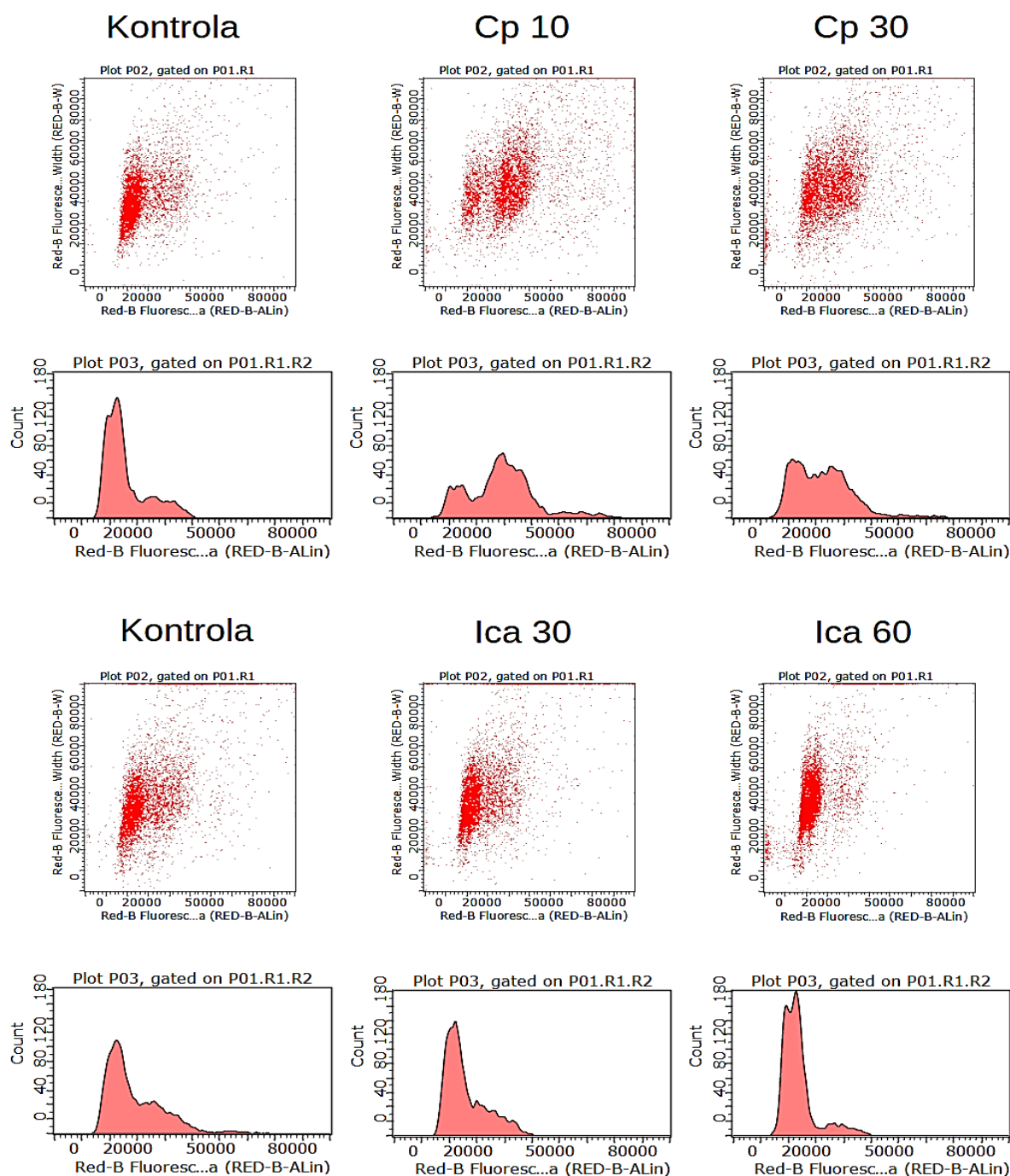
W komórkach linii A549, po zastosowaniu związków indukujących śmierć komórki, zauważono istotne statystycznie zmiany w odsetku komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego w porównaniu z komórkami kontrolnymi. W fazie G0/G1, największy spadek odsetka komórek, uzyskano po traktowaniu cisplatyną w stężeniu 10 μM (z 67,69 % dla kontroli do 33,2 % dla Cp 10 μM , gdzie $P = 0,0007$) (tab. 5; wyk. 2A/2B). W przypadku odsetka komórek traktowanych ikarytyną w stężeniu 60 μM zauważalny jest wzrost, co może świadczyć o zatrzymaniu komórek w tej fazie cyklu komórkowego. Natomiast pozostałe użyte w badaniach stężenia, nie wpływają na istotne statystycznie zmiany w odsetku komórek (wyk. 2A). We wszystkich dawkach obu związków odsetek komórek w fazie S w porównaniu z kontrolą pozostaje na podobnym poziomie (wyk. 2C).

Stężenie związku [μM]	% komórek		
	G0/G1	S	G2/M
K	67,69 \pm 5,12	10,64 \pm 2,05	21,45 \pm 3,57
Cp 10	33,2 \pm 9,65	14,28 \pm 3,88	52,16 \pm 13,52
Cp 30	54,88 \pm 13,11	15,24 \pm 4,41	29,7 \pm 9,63
Ica 30	68,25 \pm 2,64	14,26 \pm 1,98	17,23 \pm 3,79
Ica 60	78,92 \pm 6,45	9,13 \pm 3,47	11,77 \pm 3,56

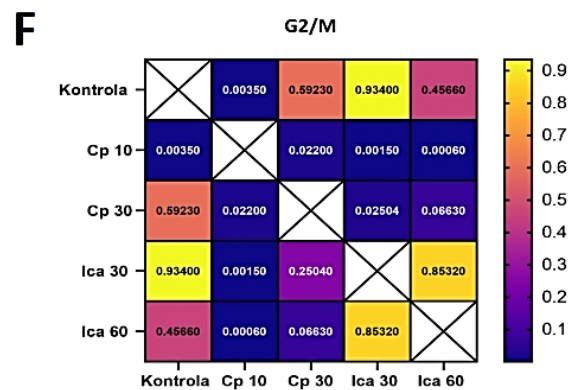
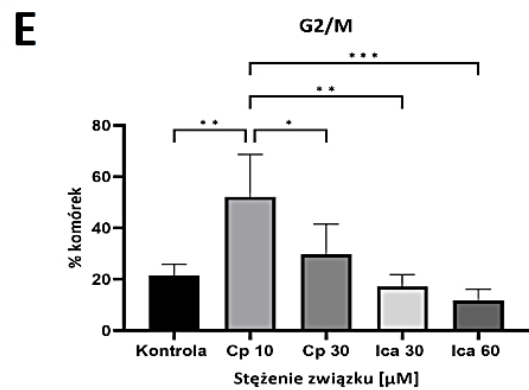
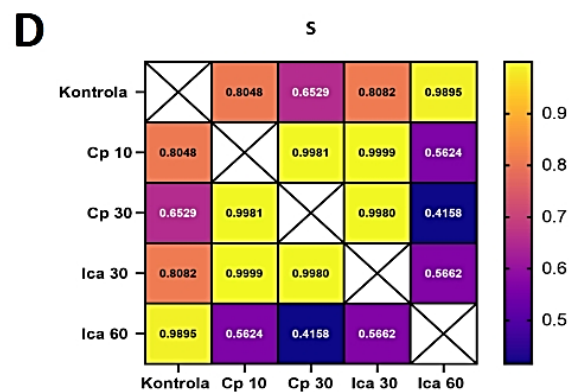
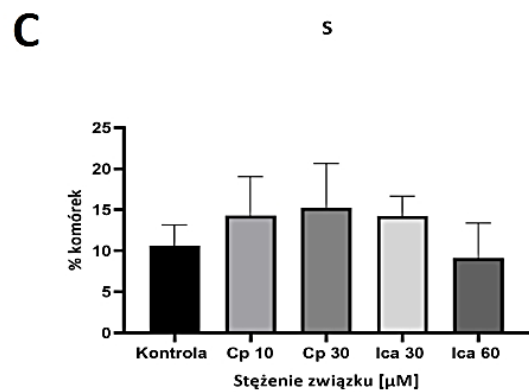
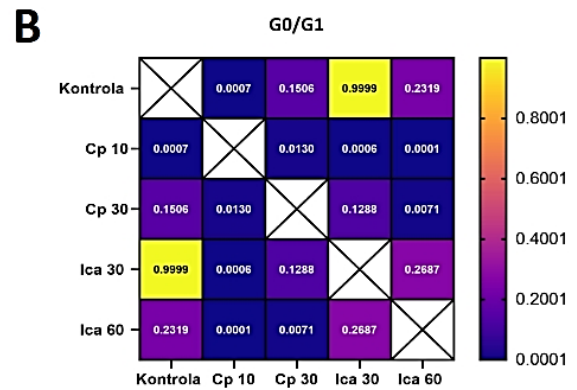
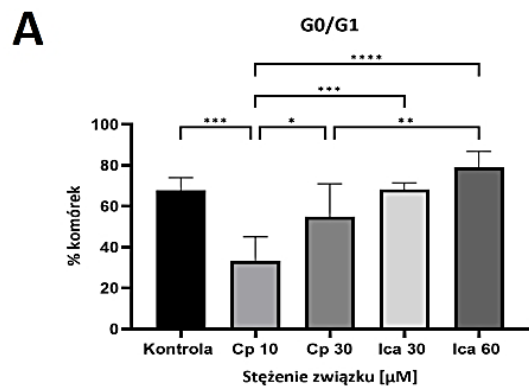
Tab. 5. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na cykl komórkowy komórek linii A549 po 48 godzinnej inkubacji ze związkami. Procentowy rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Wyniki poszczególnych grup przedstawiono w postaci średnich \pm odchylenie standardowe.

W fazie G2/M odsetek komórek dla kontroli oraz poszczególnych dawek wyniósł 21,45%, 52,16%, 29,7%, 17,23% oraz 11,77% odpowiednio dla kontroli, Cp 10 μM , Cp 30 μM , Ica 30 μM oraz Ica 60 μM (tab. 5). Zmiany istotne statystycznie w fazie G2/M występowały między kontrolą, a dawką Cp 10, gdzie $P=0,0035$ (tab. 5; wyk. 2E/2F).

Wyniki rozkładu cyklu komórkowego z cytometru przepływowego pokazano na reprezentatywnych wykresach (ryc. 36).



Ryc. 36. Wykresy przedstawiające zmiany w ilości komórek linii A549 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Oś X – intensywność fluorescencji, oś Y – ilość komórek. Wybrano jeden reprezentatywny wykres dla każdego stężenia związku, na podstawie minimum 3 niezależnych doświadczeń.



Wyk. 2. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na cykl komórkowy komórek linii A549 po 48 godzinnej inkubacji ze związkami. (A) Komórki w fazie G0/G1. (B) Komórki w fazie G0/G1 – heat mapa istotności statystycznych. (C) Komórki w fazie S. (D) Komórki w fazie S – heat mapa istotności statystycznych. (E) Komórki w fazie G2/M. (F) Komórki w fazie G2/M – heat mapa istotności statystycznych. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA, na poziomie istotności, gdzie **** - $P \leq 0,0001$; *** - $P \leq 0,001$; ** - $P \leq 0,01$; * - $P \leq 0,05$, na podstawie minimum 3 niezależnych doświadczeń.

4.3.2. Komórki linii H1299

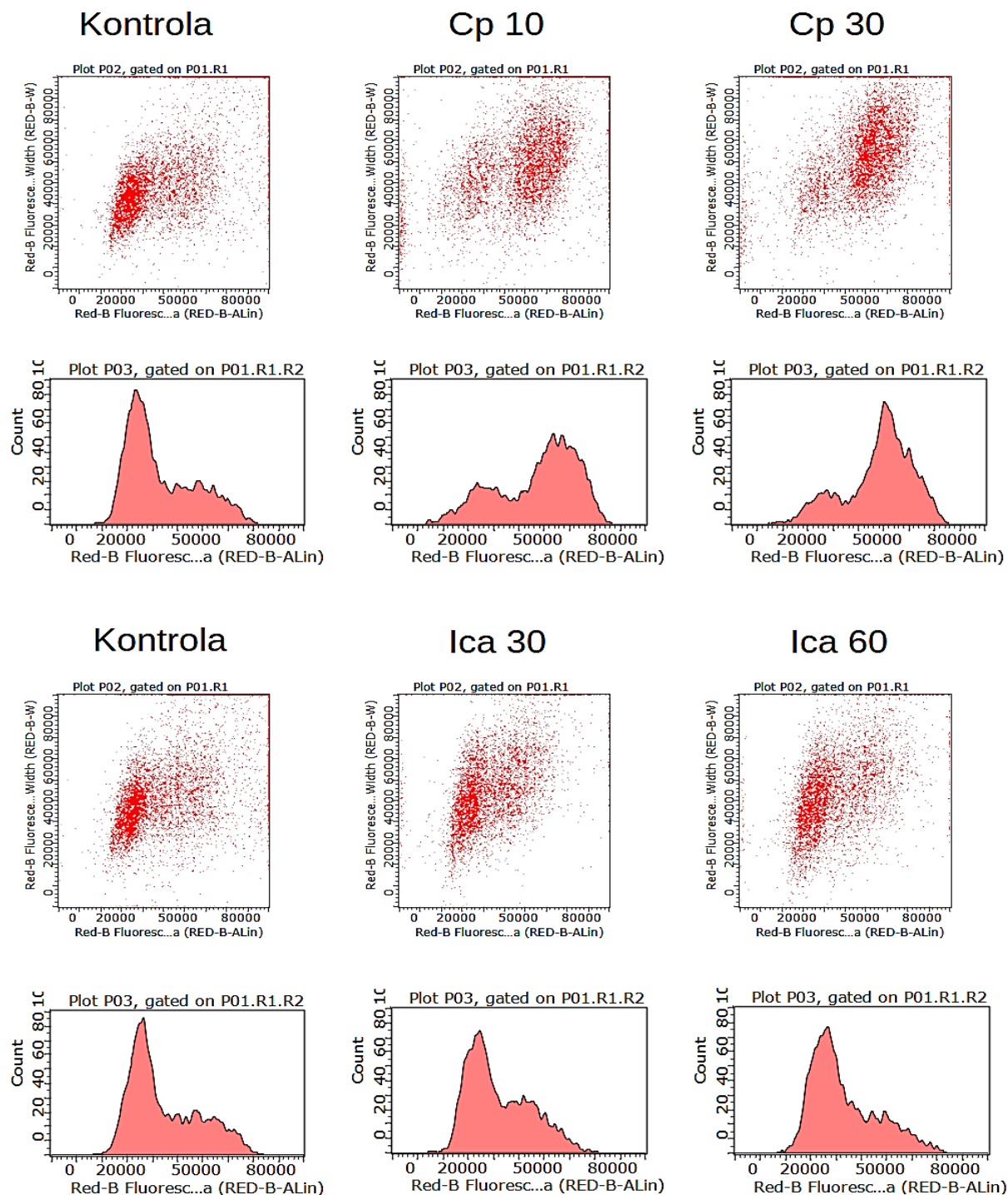
Dla linii H1299 odsetek komórek kontrolnych w porównaniu z komórkami traktowanymi cisplatyną i ikarytyną, tak samo jak w przypadku linii A549, uległ zmianie w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Analizując wyniki fazy G0/G1 można zauważyć, że między kontrolą (55,74%), a Cp 10 (23,34%) oraz Cp 30 (16,9%) występuje istotność statystyczna, gdzie $P < 0,0001$ (tab. 6; wyk. 3A/3B). Zauważyć można również, że wraz ze wzrostem dawki cisplatyny spada ilość komórek w tej fazie cyklu. Natomiast odsetek komórek traktowanych ikarytyną w porównaniu z grupą kontrolną jest na tym samym poziomie (tab. 6; wyk. 3A). W fazie S zastosowanie cisplatyny spowodowało spadek ilości komórek w tej fazie, a zastosowanie ikarytyny spowodowało minimalny wzrost komórek w porównaniu z kontrolą (tab. 6; wyk. 3C). W fazie G2/M cyklu komórkowego odsetek komórek po zastosowaniu cisplatyny wzrasta z 30,61% dla kontroli do 66,38% dla Cp 10 oraz 72,24% dla Cp 30 (dla obu dawek $P < 0,0001$). Również zauważalna jest tendencja, że wraz ze wzrostem dawki cisplatyny wzrasta odsetek komórek w tej fazie. W fazie G2/M występuje sytuacja odwrotna w porównaniu z fazą G0/G1 (tab. 6; wyk. 3E/3F).

W obu liniach zastosowanie cisplatyny powodowało spadek odsetka komórek w fazie G0/G1 oraz wzrost w fazie G2/M.

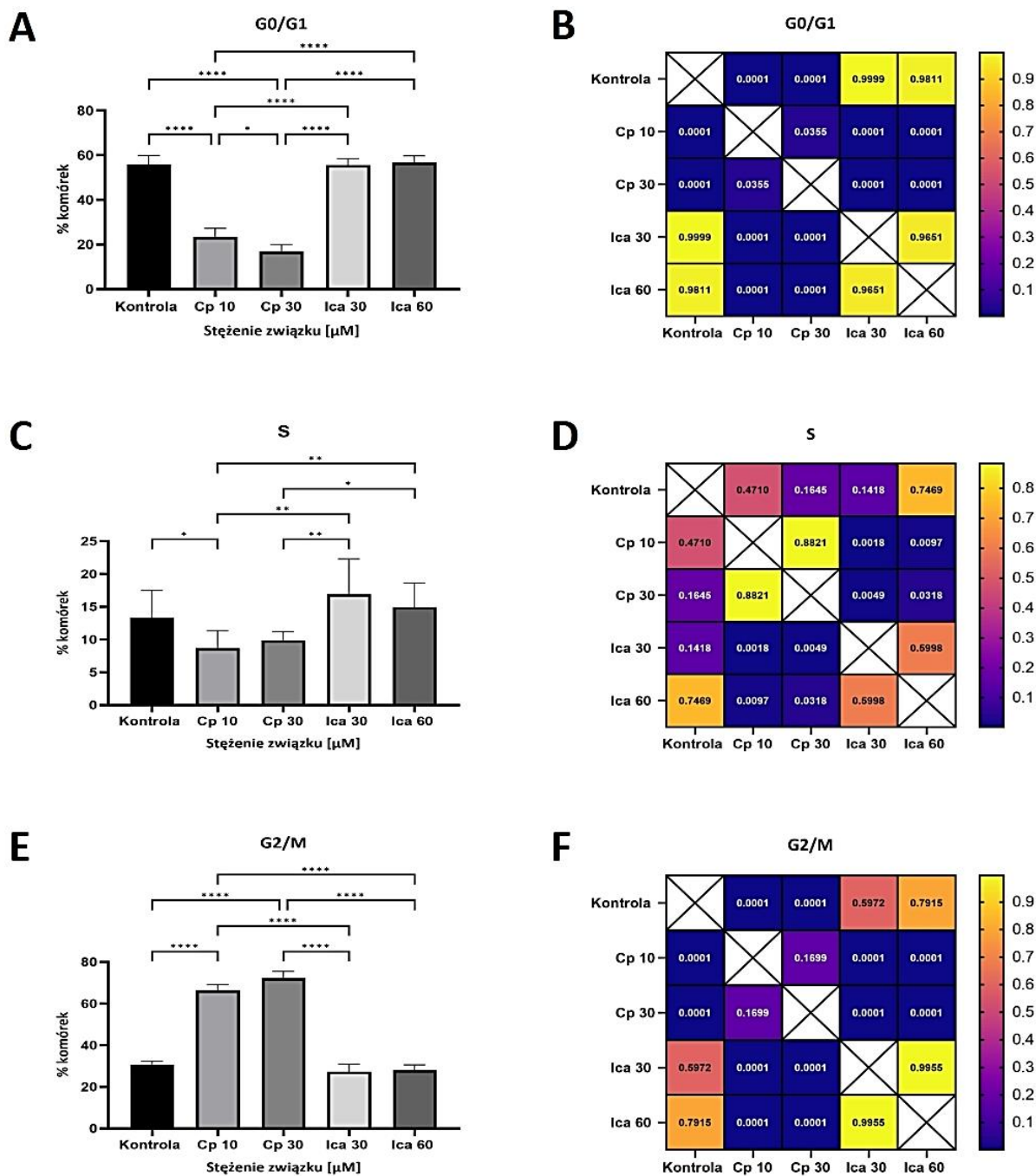
Stężenie związku [μM]	% komórek		
	G0/G1	S	G2/M
K	55,74 ± 3,39	13,34 ± 4,42	30,61 ± 1,41
Cp 10	23,34 ± 3,18	8,69 ± 2,14	66,38 ± 2,19
Cp 30	16,9 ± 2,43	9,91 ± 1,04	72,24 ± 2,67
Ica 30	55,57 ± 2,40	16,91 ± 4,42	27,21 ± 3,04
Ica 60	56,67 ± 2,48	14,95 ± 3,01	28,04 ± 2,10

Tab. 6. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na cykl komórkowy komórek linii H1299 po 48 godzinnej inkubacji ze związkami. Procentowy rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Wyniki poszczególnych grup przedstawiono w postaci średnich ± odchylenie standardowe.

Wyniki cyklu komórkowego z cytometru przepływowego pokazano na reprezentatywnych wykresach (ryc. 37).



Ryc. 37. Wykresy przedstawiające zmiany w ilości komórek linii H1299 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Oś X – intensywność fluorescencji, oś Y – ilość komórek. Wybrano jeden reprezentatywny wykres dla każdego stężenia związku, na podstawie minimum 3 niezależnych doświadczeń.



Wyk. 3. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na cykl komórkowy komórek linii H1299 po 48 godzinnej inkubacji ze związkami. (A) Komórki w fazie G0/G1. (B) Komórki w fazie G0/G1 – heat mapa istotności statystycznych. (C) Komórki w fazie S. (D) Komórki w fazie S – heat mapa istotności statystycznych. (E) Komórki w fazie G2/M. (F) Komórki w fazie G2/M – heat mapa istotności statystycznych. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA, na poziomie istotności, gdzie **** - $P \leq 0,0001$; *** - $P \leq 0,001$; ** - $P \leq 0,01$; * - $P \leq 0,05$, na podstawie minimum 3 niezależnych doświadczeń.

4.4. Ocena potencjału migracyjnego komórek

Ocenę potencjału migracyjnego komórek wyznaczono na podstawie trzech testów tj. tworzenia kolonii, migracji komórek oraz tempa migracji komórek z zastosowaniem mikroskopu kontrastowo-fazowego.

4.4.1. Ocena testu tworzenia kolonii

Ocenę testu tworzenia kolonii przez komórki linii A549 i H1299 mierzono poprzez liczenie kolonii po 10 dniach od wysiania 1 tysiąca komórek kontrolnych oraz komórek traktowanych wybranymi do testów dawkami cisplatyny i ikarytyny. Wyniki przeprowadzonego testu pokazują, że oba zastosowane w badaniach związki hamują proliferację i możliwość tworzenia kolonii komórek linii A549 i H1299, w sposób zależny od dawki.

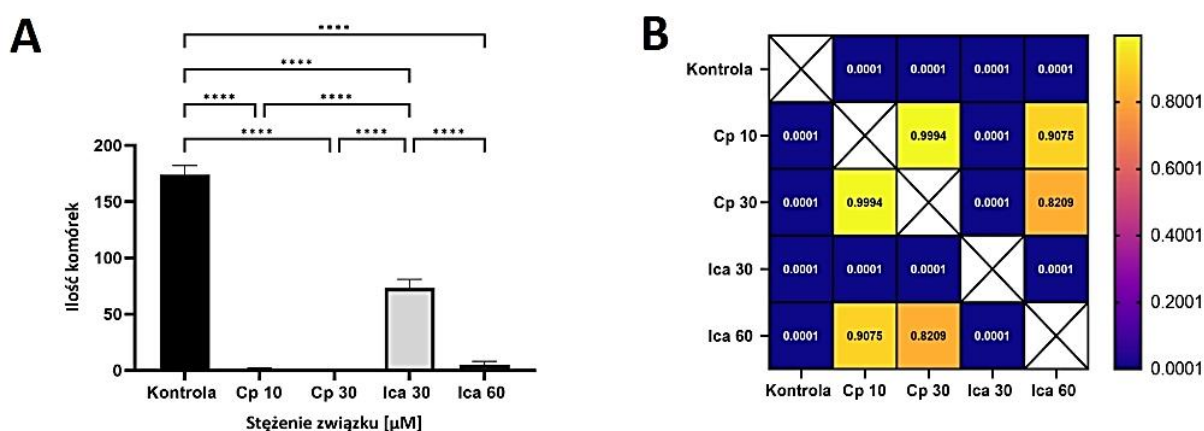
4.4.1.1. Komórki linii A549

Test tworzenia kolonii przeprowadzony na komórkach niedrobnokomórkowego raka płuca linii A549 wykazał, że ilość wytworzonych kolonii w grupie kontrolnej wynosiła $174 \pm 6,68$, natomiast dla grup komórek traktowanych cisplatyną zarówno w stężeniu $10 \mu\text{M}$, jak i $30 \mu\text{M}$ ilość wytworzonych kolonii była prawie równa 0, odpowiednio $1 \pm 0,82$; 0 kolonii dla pierwszej i drugiej dawki. W przypadku grup komórek traktowanych ikarytyną ilość kolonii była znacznie wyższa - dla ikarytyny w stężeniu $30 \mu\text{M}$ wynosiła $73 \pm 6,53$, natomiast dla ikarytyny w stężeniu $60 \mu\text{M}$ wynosiła $5 \pm 2,45$ (tab. 7).

A549			
Stężenie cisplatyny [μM]	Ilość kolonii	Stężenie ikarytyny [μM]	Ilość kolonii
K	$174 \pm 6,68$	K	$174 \pm 6,68$
Cp 10	$1 \pm 0,82$	Ica 30	$73 \pm 6,53$
Cp 30	0	Ica 60	$5 \pm 2,45$

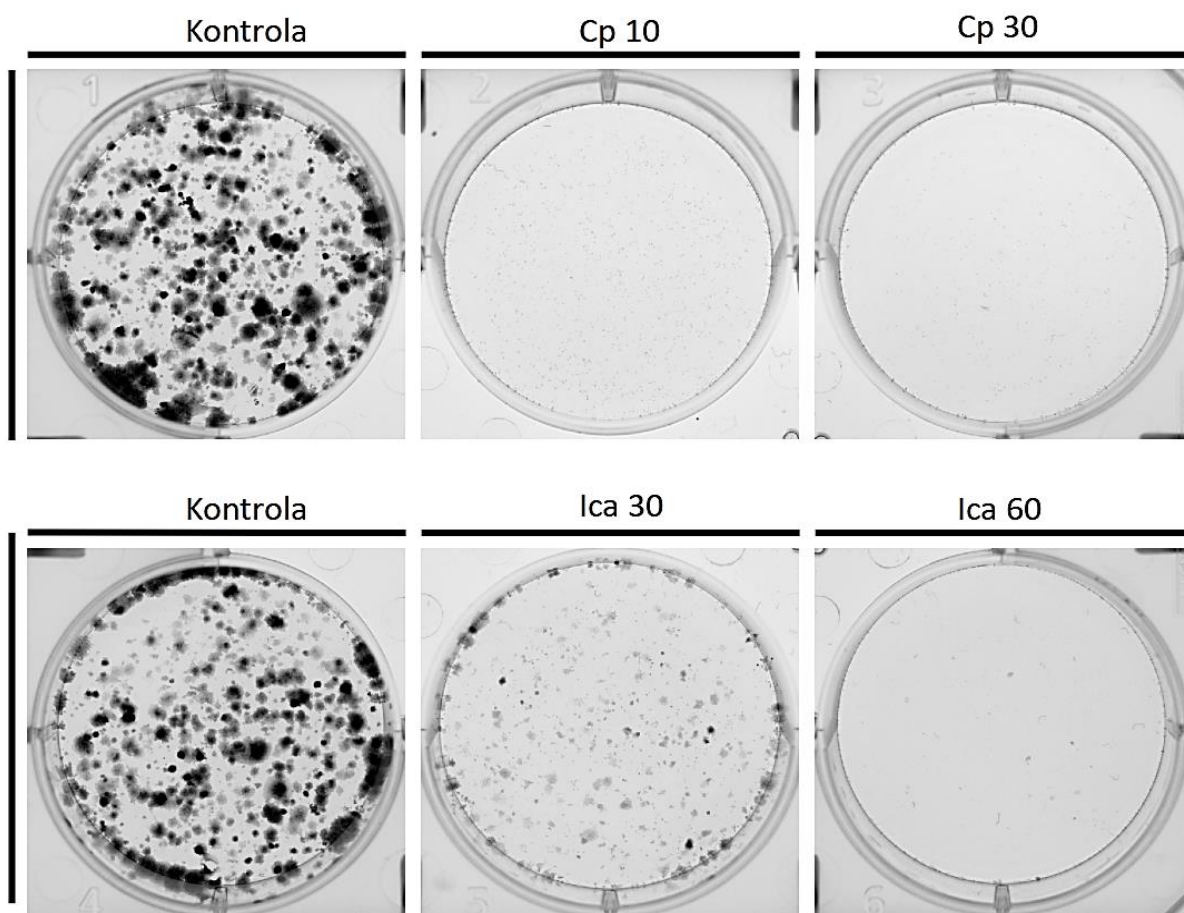
Tab. 7. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na zdolność do tworzenia kolonii komórek linii A549. Wartości przedstawiono jako średnia \pm odchylenie standardowe na podstawie minimum 3 niezależnych doświadczeń.

Porównując wyniki analizy statystycznej grupy kontrolnej z poszczególnymi grupami komórek traktowanych, poziom istotności statystycznej we wszystkich przypadkach wynosił $P < 0,0001$. W przypadku analizy istotności statystycznych między dawkami zauważyć można istotność równą $P < 0,0001$ między najniższą zastosowaną dawką cisplatyny, a najniższą dawką ikarytyny, najwyższą dawką cisplatyny i najniższą ikarytyny oraz między dawkami ikarytyny. Natomiast brak istotności statystycznej występuje pomiędzy pozostałymi dawkami (wyk. 4A/4B).



Wyk. 4. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na zdolność do tworzenia kolonii komórek linii A549. (A) Ilość kolonii. (B) Ilość kolonii - heat mapa istotności statystycznych. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA, na poziomie istotności **** - $P < 0,0001$.

Wyniki testu tworzenia kolonii pokazano na reprezentatywnych zdjęciach dołków płytki 6-dołkowej (ryc. 38).



Ryc. 38. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na zdolność do tworzenia kolonii komórek linii A549. Zdjęcia poglądowe. Widoczne: wraz ze wzrostem dawki ikarytyny i cisplatyny mniejsza ilość komórek ma zdolność tworzenia kolonii. Na podstawie minimum 3 niezależnych doświadczeń.

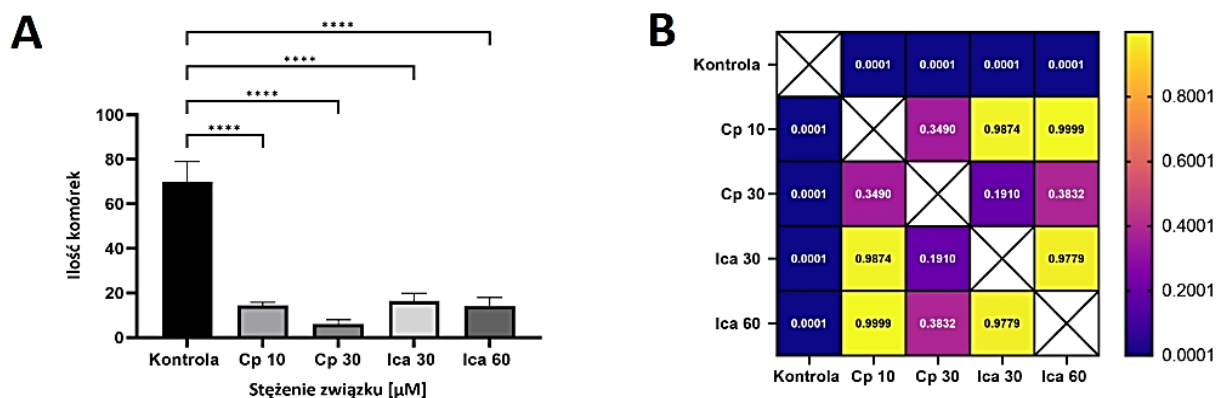
4.4.1.2. Komórki linii H1299

Przeprowadzenie testu tworzenia kolonii na komórkach linii H1299, dostarczyło nieco innych wyników, niż w przypadku linii A549. Dla grupy kontrolnej, ilość tworzonych kolonii wynosiła $70 \pm 30,97$, natomiast dla poszczególnych dawek cisplatyny i ikarytyny wyniki przedstawiają się następująco:

H1299			
Stężenie cisplatyny [μM]	Ilość kolonii	Stężenie ikarytyny [μM]	Ilość kolonii
K	70 \pm 30,97	K	70 \pm 30,97
Cp 10	14,33 \pm 6,30	Ica 30	16,33 \pm 7,50
Cp 30	6 \pm 2,96	Ica 60	14 \pm 6,69

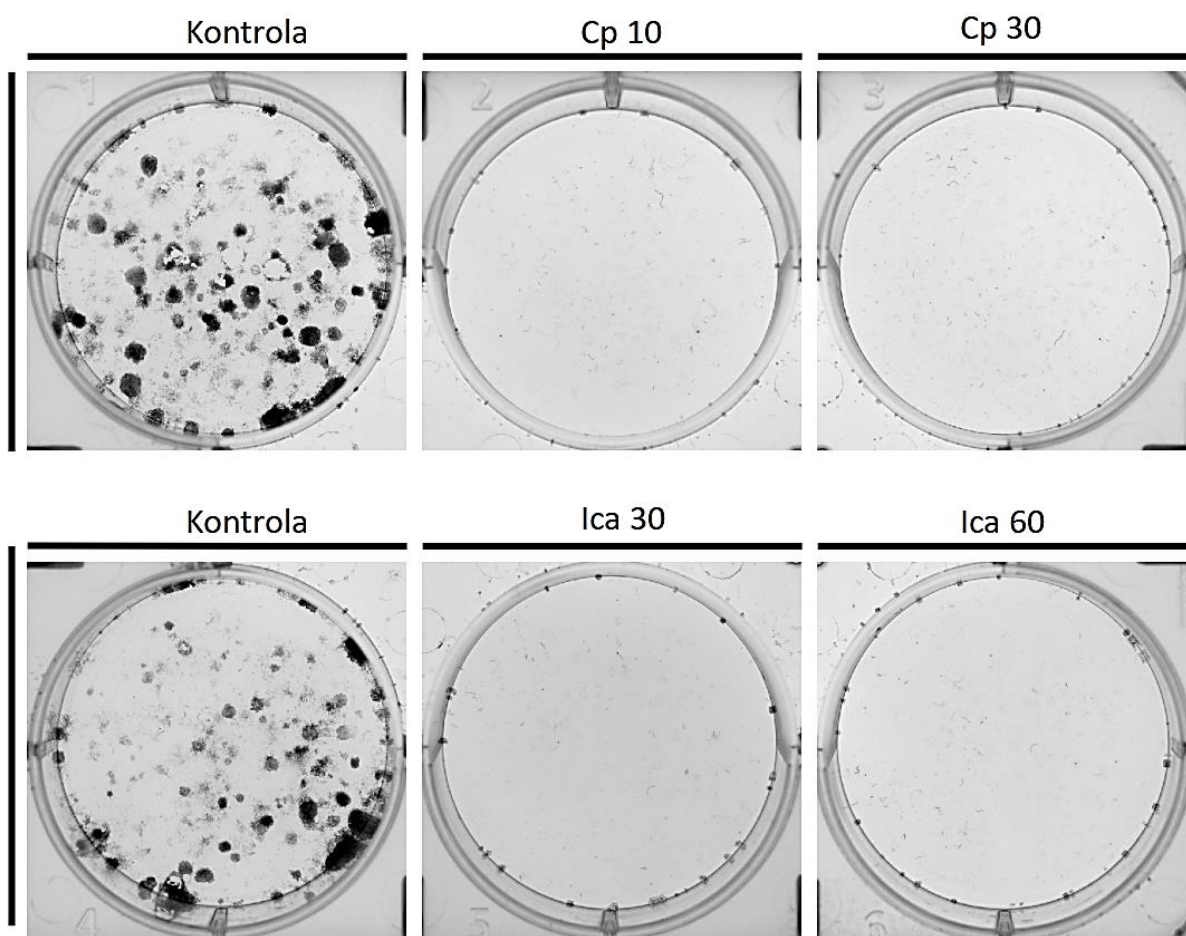
Tab. 8. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na zdolność do tworzenia kolonii komórek linii H1299. Wartości przedstawiono jako średnia \pm odchylenie standardowe na podstawie minimum 3 niezależnych doświadczeń.

Dane przedstawione w tab. 8 zinterpretowano dodatkowo z zastosowaniem proporcji. Wykazano, że ilość kolonii w grupach komórek traktowanych czynnikami indukującymi śmierć komórki wynosiła między 8,5% (grupa komórek traktowanych cisplatyną w stężeniu 30 μM), a 22% (grupa komórek traktowanych ikarytyną w stężeniu 30 μM), w porównaniu z grupą kontrolną oznaczoną jako 100%. Zarówno dla komórek traktowanych cisplatyną w stężeniu 10 μM i ikarytyną w stężeniu 60 μM ilość kolonii wynosiła 20%, w porównaniu z grupą kontrolną (tab. 8). Między kontrolą, a poszczególnymi grupami komórek traktowanych, istotność statystyczna wynosiła $P < 0,0001$, natomiast między poszczególnymi dawkami cisplatyny oraz ikarytyny występował brak istotności statystycznej, co może mieć związek z lepszą regeneracją komórek niedrobnokomórkowego raka płuca linii H1299 po zastosowaniu leków cytostatycznych w porównaniu z linią A549 (wyk. 5A/5B).



Wyk. 5. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na zdolność do tworzenia kolonii komórek linii H1299. (A) Ilość kolonii. (B) Ilość kolonii - heat mapa istotności statystycznych. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA, na poziomie istotności, gdzie **** - $P < 0,0001$.

Wyniki testu tworzenia kolonii linii H1299 pokazano na reprezentatywnych zdjęciach dołków płytki 6-dołkowej (ryc. 39).



Ryc. 39. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na zdolność do tworzenia kolonii komórek linii H1299. Zdjęcia poglądowe. Widoczne: wraz ze wzrostem dawki ikarytyny i cisplatyny mniejsza ilość komórek ma zdolność do tworzenia kolonii. Wykonano na podstawie minimum 3 niezależnych doświadczeń.

4.4.2. Ocena migracji komórek

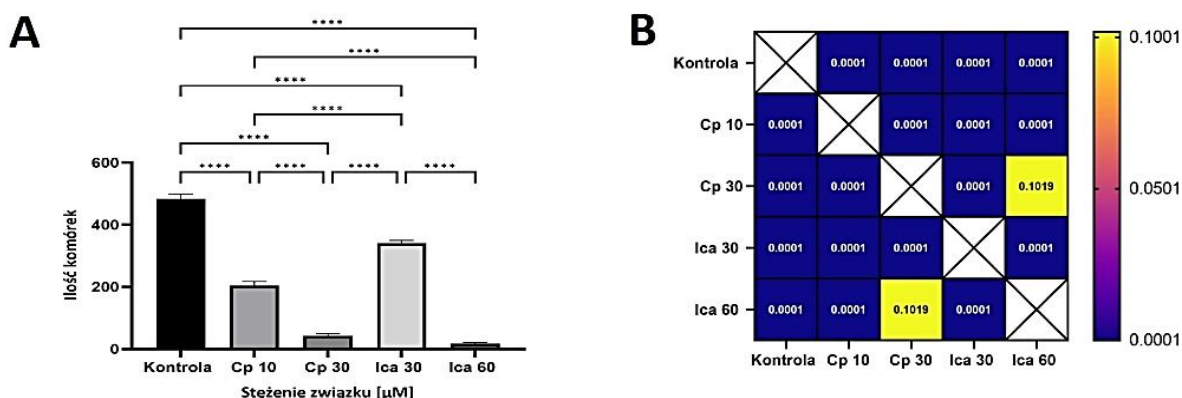
Migrację komórek niedrobnokomórkowego raka płuca linii A549 i H1299 mierzono poprzez określenie liczby komórek, które przeszły przez błonę insertów o wielkości porów 8 μm . Komórki migrują z górnej części insertu, gdzie zawieszono je w medium ubogim w FBS, na dolną część insertu, gdzie dodano medium hodowlane z 10% FBS. Wyniki przeprowadzonego testu ujawniają, że zarówno cisplatyna, jak i ikarytyna hamują zdolność migracji komórek obu linii.

4.4.2.1. Komórki linii A549

Wyniki testu migracji dla linii A549 pokazują, że liczba komórek, które przeszły przez błonę insertu w grupie kontrolnej ($483,33 \pm 12,47$) była znacznie większa w porównaniu z komórkami traktowanymi poszczególnymi dawkami cisplatyny: 10 μM ($204,66 \pm 10,34$) i 30 μM ($42 \pm 6,68$) oraz ikarytyny: 30 μM ($340,67 \pm 7,36$) i 60 μM ($17,33 \pm 3,4$) (tab. 9). Porównując grupę kontrolną z grupami komórek traktowanych istotność statystyczna zachodzi na poziomie $P < 0,0001$. Natomiast analizując istotności statystyczne między grupami, traktowanymi zarówno cisplatyną, jak i ikarytyną tylko między grupą traktowaną cisplatyną w stężeniu 30 μM oraz ikarytyną w stężeniu 60 μM występuje brak istotności statystycznej (gdzie $P = 0,1019$). Między pozostałymi grupami poziom istotności statystycznej wynosi $P < 0,0001$ (wyk. 6A/6B).

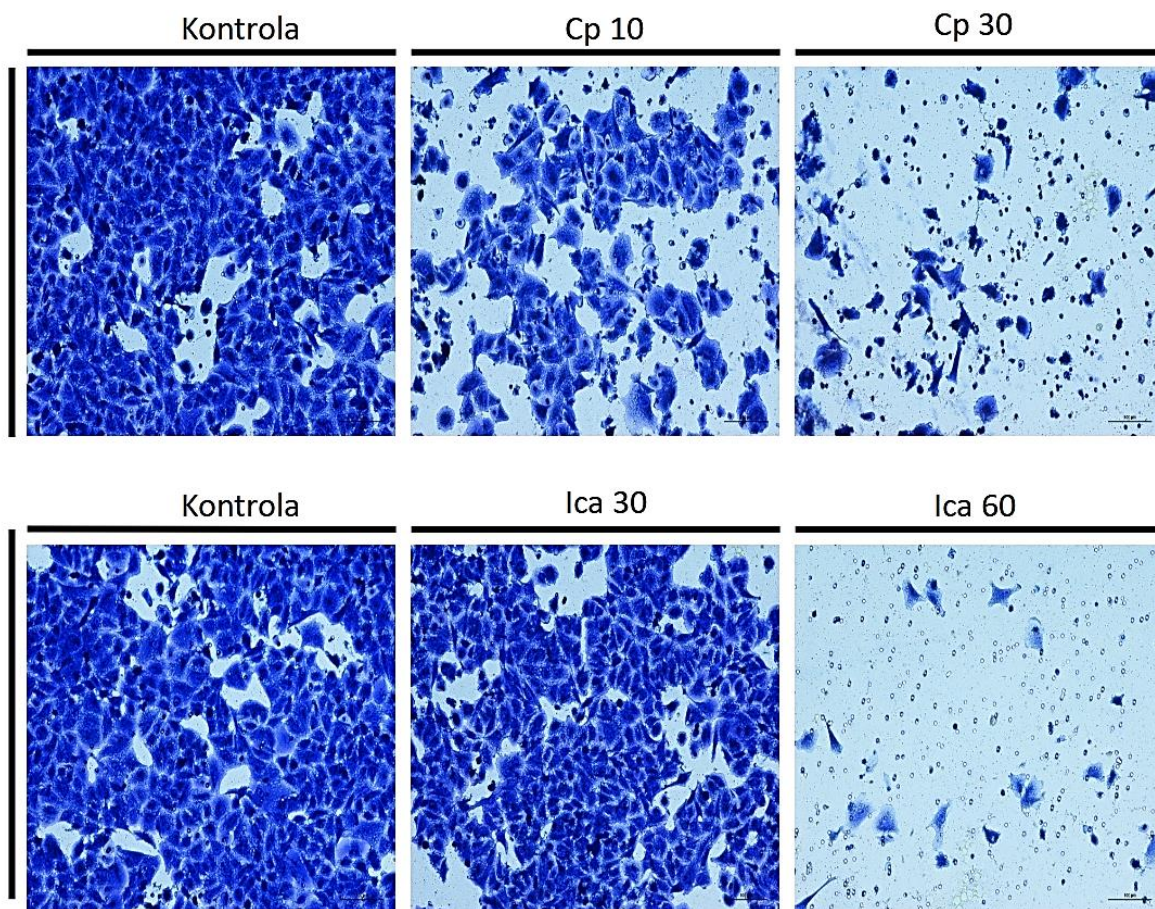
A549			
Stężenie cisplatyny [μM]	Ilość komórek	Stężenie ikarytyny [μM]	Ilość komórek
K	$483,33 \pm 12,47$	K	$483,33 \pm 12,47$
Cp 10	$204,66 \pm 10,34$	Ica 30	$340,67 \pm 7,36$
Cp 30	$42 \pm 6,68$	Ica 60	$17,33 \pm 3,4$

Tab. 9. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na migrację komórek linii A549 po 48 godzinnej inkubacji ze związkami. Wyniki poszczególnych grup przedstawiono w postaci średnich \pm odchylenie standardowe.



Wyk. 6. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na migrację komórek linii A549 po 48 godzinnej inkubacji ze związkami. (A) Ilość komórek, które przeszły przez błonę insertu. (B) Ilość komórek, które przeszły przez błonę insertu – heat mapa istotności statystycznych. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu dwuczynnowej analizy wariancji ANOVA na poziomie istotności **** - $P \leq 0,0001$.

Wyniki migracji komórek linii A549 pokazano na reprezentatywnych zdjęciach (ryc. 40).



Ryc. 40. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na migrację komórek linii A549 po 48 godzinnej inkubacji ze związkami. Wybrano jedno reprezentatywne zdjęcie z pięciu pól insertu. Widoczne: wraz ze wzrostem dawki ikarytyny i cisplatyny mniejsza ilość komórek ma zdolność do migracji przez pory insertów.

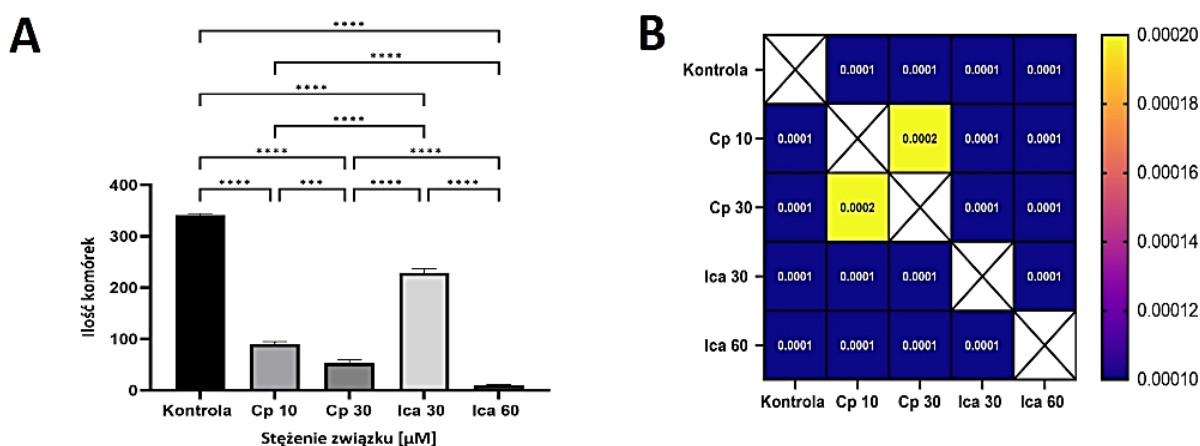
4.4.2.2. Komórki linii H1299

Wyniki badania migracji linii H1299 dla grupy kontrolnej wynosiły $341 \pm 2,94$ komórek, które przeszły przez błonę insertu oraz dla poszczególnych dawek cisplatyny (10 μM oraz 30 μM) i ikarytyny (30 μM oraz 60 μM) odpowiednio: $90,33 \pm 3,68$; $52,66 \pm 5,73$; $228,67 \pm 6,65$; $10 \pm 0,82$ komórek (tab. 10). Poziom istotności statystycznej między kontrolą, a poszczególnymi grupami wynosił $P < 0,001$, co wskazuje na hamowanie zdolności do migracji komórek linii H1299 po traktowaniu związkiem cytostatycznym. Można zauważyć również, że wraz ze wzrostem stężenia cisplatyny i ikarytyny mniejsza ilość komórek miała zdolność do przejścia przez pory insertów. Analizując wyniki między poszczególnymi grupami komórek

traktowanych można zauważyć, że tylko między grupą komórek traktowanych cisplatyną w stężeniu 10 μM , a grupą komórek traktowanych cisplatyną w stężeniu 30 μM poziom istotności wynosił $P < 0,001$. Natomiast między pozostałymi grupami komórek traktowanych wynosił $P < 0,0001$. Różnice w wynikach między linią H1299, a linią A549 mogą wynikać z cech charakterystycznych danej linii komórkowej (wyk. 7A/7B).

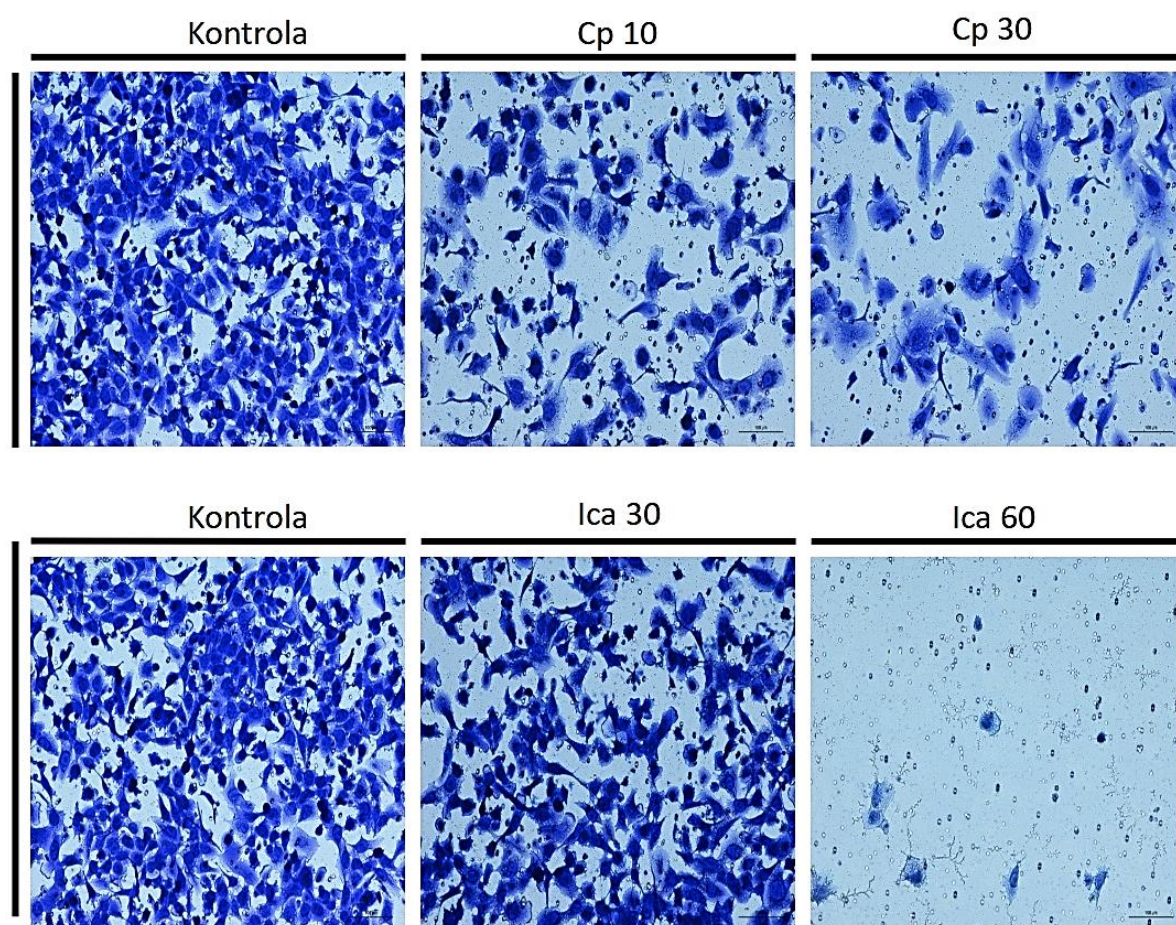
H1299			
Stężenie cisplatyny [μM]	Ilość komórek	Stężenie ikarytyny [μM]	Ilość komórek
K	$341 \pm 2,94$	K	$341 \pm 2,94$
Cp 10	$90,33 \pm 3,68$	Ica 30	$228,67 \pm 6,65$
Cp 30	$52,66 \pm 5,73$	Ica 60	$10 \pm 0,82$

Tab. 10. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na migrację komórek linii H1299 po 48 godzinnej inkubacji ze związkami. Wyniki poszczególnych grup przedstawiono w postaci średnich \pm odchylenie standardowe.



Wyk. 7. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na migrację komórek linii H1299 po 48 godzinnej inkubacji ze związkami. (A) Ilość komórek, które przeszły przez błonę insertu. (B) Ilość komórek, które przeszły przez błonę insertu – heat mapa istotności statystycznych. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA na poziomie istotności **** - $P \leq 0,0001$; *** - $P \leq 0,001$.

Wyniki migracji komórek linii H1299 pokazano na reprezentatywnych zdjęciach (ryc. 41).



Ryc. 41. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na migrację komórek linii H1299 po 48 godzinnej inkubacji ze związkami. Wybrano jedno reprezentatywne zdjęcie z pięciu pól insertu. Widoczne: wraz ze wzrostem dawki ikarytyny i cisplatyny mniejsza ilość komórek ma zdolność do migracji przez pory insertów.

4.4.3. Ocena tempa migracji komórek

Tempo migracji komórek zbadano, przy użyciu mikroskopu odwróconego w czasie 48 godzin. Zdjęcia wykonywano w hodowli przyżyciowej w interwale 10 minut po upływie jednej godziny od momentu potraktowania komórek. Na podstawie zebranych wyników obliczono odległość zakumulowaną, odległość euklidesową oraz prędkość komórek obu linii komórkowych traktowanych cisplatyną i ikarytyną w wybranych stężeniach.

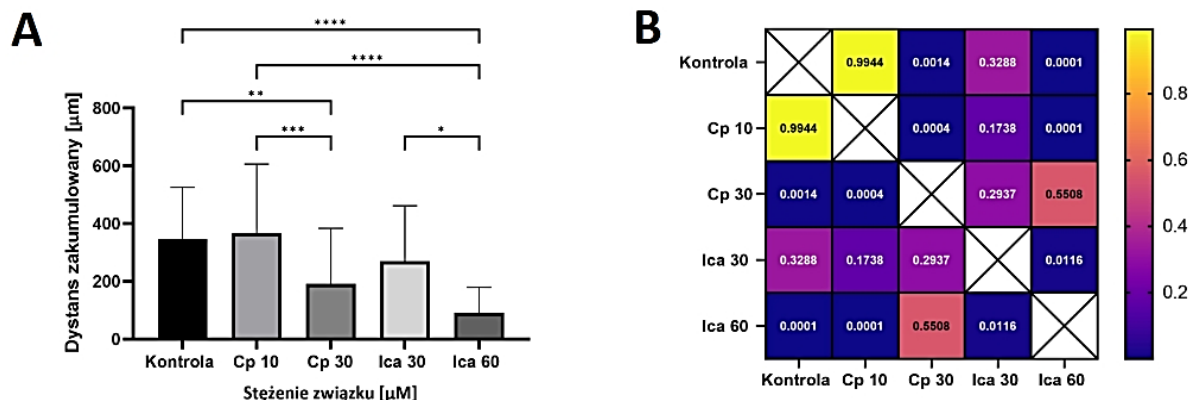
4.4.3.1. Komórki linii A549

1. Odległość zakumulowana

Odległość zakumulowana jest to całkowita odległość pokonana przez jedną komórkę. Wyliczona została na podstawie wyników analizy pokonanej odległości przez minimum 15 komórek w czasie 48 godzin z czterech pól jednego dołka. W przypadku komórek kontrolnych linii A549 średnia odległość zakumulowana wynosiła $346,42 \pm 176,89 \mu\text{m}$. Po zastosowaniu cisplatyny w stężeniu 10 i $30 \mu\text{M}$ średnia odległość zakumulowana wynosiła odpowiednio $379,44 \pm 219,78$ oraz $190,85 \pm 193,14 \mu\text{m}$, natomiast dla pierwszej i drugiej dawki ikarytyny wynosiła $308,47 \pm 290,71$ oraz $94,18 \pm 88,34 \mu\text{m}$ (tab. 11). Analiza statystyczna wykazała istotność, gdzie $P < 0,0001$ między grupą komórek kontrolnych, a grupą komórek potraktowanych ikarytyną w stężeniu $60 \mu\text{M}$. W przypadku zastosowania cisplatyny w najwyższym stężeniu tj. $30 \mu\text{M}$ istotność statystyczna między tymi grupami komórek, a grupą komórek kontrolnych wynosiła $P = 0,0014$ (wyk. 8A/8B). Można zauważyć, że wraz ze wzrostem stężenia związków zmniejsza się odległość zakumulowana pokonana przez komórki.

A549			
Stężenie cisplatyny [μM]	Odległość zakumulowana [μm]	Stężenie ikarytyny [μM]	Odległość zakumulowana [μm]
K	$346,42 \pm 176,89$	K	$346,42 \pm 176,89$
Cp 10	$379,44 \pm 219,78$	Ica 30	$308,47 \pm 290,71$
Cp 30	$190,85 \pm 193,14$	Ica 60	$94,18 \pm 88,34$

Tab. 11. Wpływ poszczególnych dawek cisplatyny i ikarytyny na odległość zakumulowaną pokonaną przez komórki linii A549. Wyniki poszczególnych grup przedstawiono w postaci średnich \pm odchylenie standardowe.



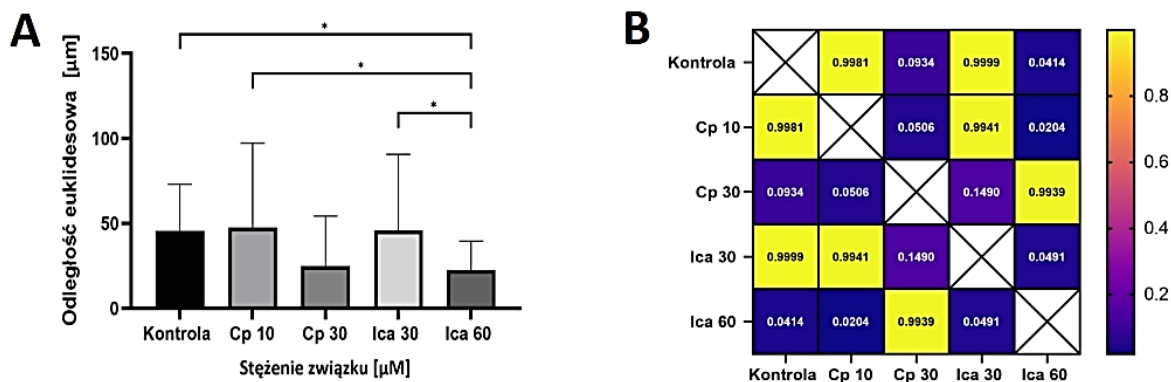
Wyk. 8. Wpływ poszczególnych dawek cisplatyny i ikarytyny na odległość zakumulowaną pokonaną przez komórki linii A549. (A) Odległość zakumulowana pokonana przez komórki. (B) Odległość zakumulowana pokonana przez komórki – heat mapa istotności statystycznych. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA na poziomie istotności, gdzie **** - $P \leq 0,0001$; *** - $P \leq 0,001$; ** - $P \leq 0,01$; * - $P \leq 0,05$. Na podstawie minimum 3 niezależnych doświadczeń.

2. Odległość euklidesowa

Odległość euklidesowa jest to odległość między punktem A drogi pokonanej w czasie 48 godzin przez komórkę, a punktem B w linii prostej. Dla komórek kontrolnych linii A549 odległość euklidesowa wynosiła $45,62 \pm 27,21 \mu\text{m}$, natomiast dla pierwszej i drugiej dawki cisplatyny oraz ikarytyny wynosiła odpowiednio $40,68 \pm 46,61$; $25,24 \pm 29,35$ oraz $54,25 \pm 64,18$; $23,54 \pm 16,55 \mu\text{m}$ (tab. 12). Istotne statystycznie zmiany w odległości euklidesowej wyznaczono tylko pomiędzy grupą komórek kontrolnych, a grupą komórek traktowanych ikarytyną w stężeniu $60 \mu\text{M}$, gdzie $P=0,0414$ (wyk. 9A/9B).

A549			
Stężenie cisplatyny [μM]	Odległość euklidesowa [μm]	Stężenie ikarytyny [μM]	Odległość euklidesowa [μm]
K	$45,62 \pm 27,21$	K	$45,62 \pm 27,21$
Cp 10	$40,68 \pm 46,61$	Ica 30	$54,25 \pm 64,18$
Cp 30	$25,24 \pm 29,35$	Ica 60	$23,54 \pm 16,55$

Tab. 12. Wpływ poszczególnych dawek cisplatyny i ikarytyny na odległość euklidesową pokonaną przez komórki linii A549. Wyniki poszczególnych grup przedstawiono w postaci średnich \pm odchylenie standardowe.



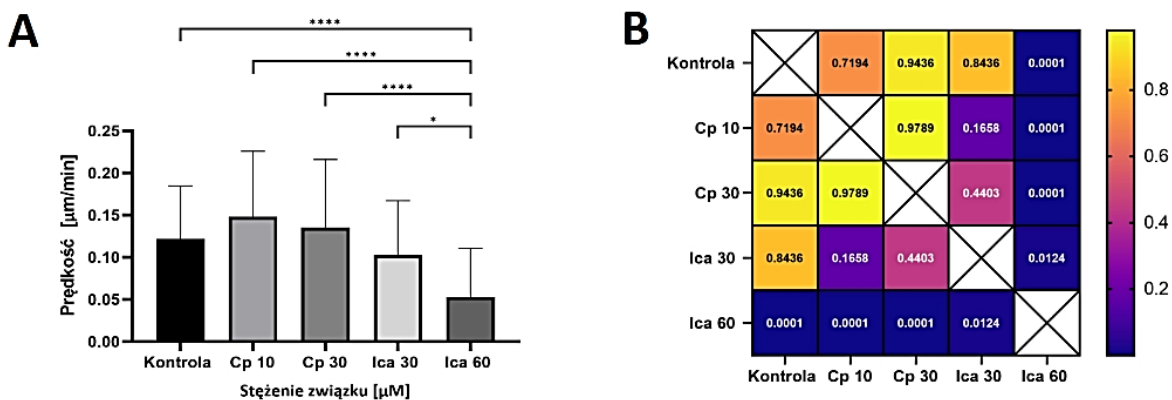
Wyk. 9. Wpływ poszczególnych dawek cisplatyny i ikarytyny na odległość euklidesową pokonaną przez komórki linii A549. (A) Odległość euklidesowa pokonaną przez komórki. (B) Odległość euklidesowa pokonaną przez komórki – heatmapa istotności statystycznych. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA na poziomie istotności, gdzie * - $P \leq 0,05$. Na podstawie minimum 3 niezależnych doświadczeń.

3. Prędkość komórek

Przy użyciu mikroskopu kontrastowo-fazowego z hodowlą przyżyciową, zmierzono również prędkość komórek w $\mu\text{m}/\text{min}$. Średnia prędkość dla komórek kontrolnych wynosiła $0,1207 \mu\text{m}/\text{min}$. Dla komórek traktowanych cisplatyną w stężeniu $10 \mu\text{M}$ prędkość wynosiła $0,1578 \mu\text{m}/\text{min}$, a dla komórek traktowanych cisplatyną w stężeniu $30 \mu\text{M}$ – $0,1355 \mu\text{m}/\text{min}$. Dla grupy komórek, gdzie zastosowano $30 \mu\text{M}$ ikarytyny średnia prędkość wynosiła $0,1121 \mu\text{m}/\text{min}$, natomiast dla ikarytyny $60 \mu\text{M}$ prędkość komórek była najniższa spośród wszystkich wyników, czyli $0,0543 \mu\text{m}/\text{min}$ (tab. 13). Istotność statystyczna, gdzie $P < 0,0001$, występowała tylko między grupą komórek kontrolnych, a grupą komórek traktowanych ikarytyną w stężeniu $60 \mu\text{M}$ (wyk. 10A/10B).

A549			
Stężenie cisplatyny [µM]	Prędkość [µm/min]	Stężenie ikarytyny [µM]	Prędkość [µm/min]
K	0,1207	K	0,1207
Cp 10	0,1578	Ica 30	0,1121
Cp 30	0,1355	Ica 60	0,0543

Tab. 13. Wpływ poszczególnych dawek cisplatyny i ikarytyny na prędkość komórek linii A549. Wyniki poszczególnych grup przedstawiono w postaci średnich.



Wyk. 10. Wpływ poszczególnych dawek cisplatyny i ikarytyny na prędkość komórek linii A549. (A) Prędkość komórek. (B) Prędkość komórek – heat mapa istotności statystycznych. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA na poziomie istotności, gdzie **** - $P \leq 0,0001$; * - $P \leq 0,05$. Na podstawie minimum 3 niezależnych doświadczeń.

4.4.3.2. Komórki linii H1299

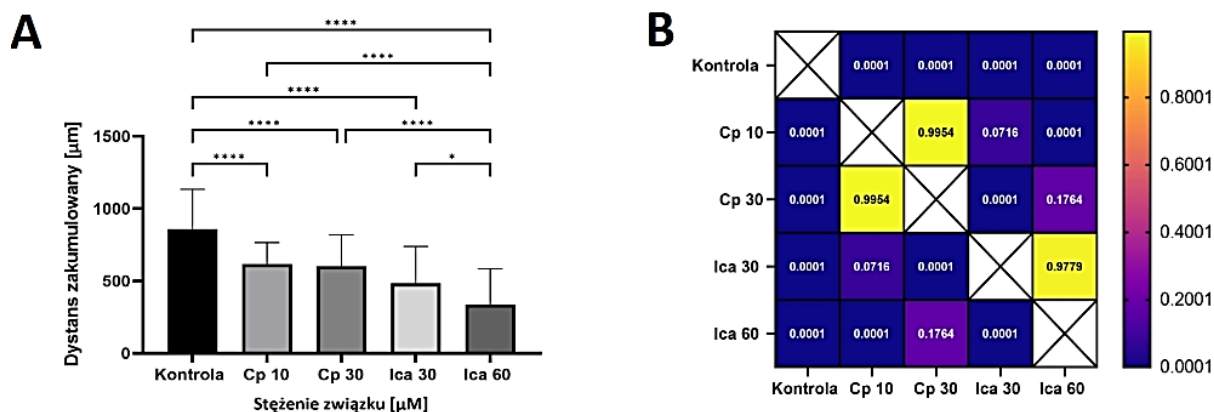
1. Odległość zakumulowana

Dla komórek linii H1299 odległość zakumulowana osiągała wyższe wartości w porównaniu z linią A549, co może mieć związek z charakterystyką linii przerzutowej. Dla kontroli całkowita odległość pokonana przez komórki, która wynosiła $902,73 \pm 288,54 \mu\text{m}$, była 3-krotnie wyższa w porównaniu z linią A549. Wyższe wyniki średniej pokonanej odległości uzyskały również komórki traktowane cisplatyną oraz ikarytyną. Dla pierwszej i drugiej dawki cisplatyny wynosiły odpowiednio $618,61 \pm 145,2$ i $602,22 \pm 214,74 \mu\text{m}$, a dla pierwszej i drugiej dawki ikarytyny $489,91 \pm 235,72$ oraz $352,8 \pm 254,127 \mu\text{m}$ (tab. 14).

A549			
Stężenie cisplatyny [µM]	Odległość zakumulowana [µm]	Stężenie ikarytyny [µM]	Odległość zakumulowana [µm]
K	$902,73 \pm 288,54$	K	$902,73 \pm 288,54$
Cp 10	$618,61 \pm 145,2$	Ica 30	$489,91 \pm 235,72$
Cp 30	$602,22 \pm 214,74$	Ica 60	$352,8 \pm 254,127$

Tab. 14. Wpływ poszczególnych dawek cisplatyny i ikarytyny na odległość zakumulowaną pokonaną przez komórki linii H1299. Wyniki poszczególnych grup przedstawiono w postaci średnich \pm odchylenie standardowe.

Istotności statystyczne, gdzie $P < 0,0001$, występowały między grupą kontrolną, a wszystkimi zastosowanymi dawkami. Natomiast w przypadku analizy statystycznej między poszczególnymi dawkami zastosowanych związków istotność występowała między komórkami traktowanymi cisplatyną w stężeniu $10 \mu\text{M}$, a traktowanymi ikarytyną w stężeniu $60 \mu\text{M}$ oraz między $30 \mu\text{M}$ cisplatyny, a $60 \mu\text{M}$ ikarytyny ($P < 0,0001$) (wyk. 11A/11B).



Wyk. 11. Wpływ poszczególnych dawek cisplatyny i ikarytyny na odległość zakumulowaną pokonaną przez komórki linii H1299. (A) Odległość zakumulowana pokonana przez komórki. (B) Odległość zakumulowana pokonana przez komórki – heat mapa istotności statystycznych. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA na poziomie istotności, gdzie **** - $P \leq 0,0001$; * - $P \leq 0,05$. Na podstawie minimum 3 niezależnych doświadczeń.

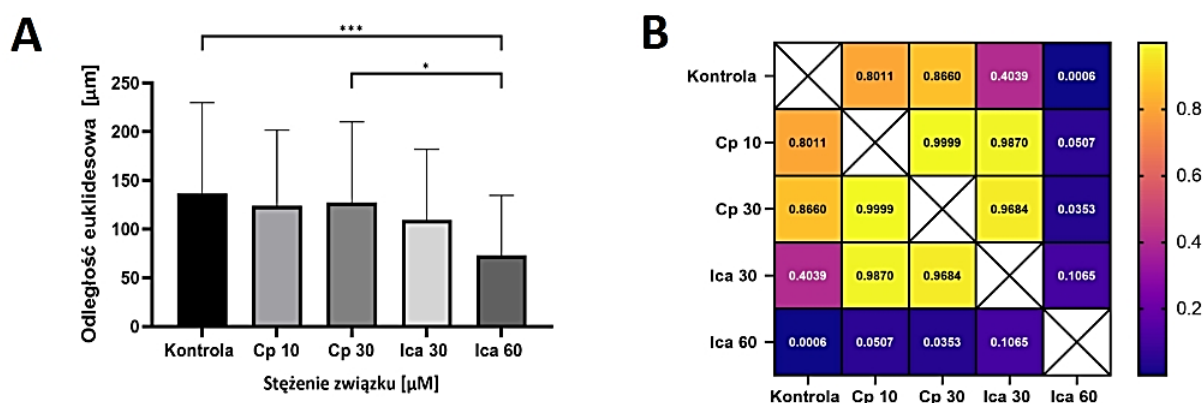
2. Odległość euklidesowa

Podobnie jak w przypadku odległości zakumulowanej, odległość euklidesowa w komórkach linii H1299 również osiągała wyższe wartości w porównaniu z linią A549. Dla porównania dla grupy kontrolnej komórek linii A549 odległość euklidesowa w czasie 48 godzin wynosiła $45,62 \pm 27,21 \mu\text{m}$, natomiast dla komórek linii H1299 wynosiła $141,48 \pm 93,05 \mu\text{m}$, co daje 3,1-krotny wzrost pokonanej odległości komórek linii H1299 (tab. 12; tab. 15). Po zastosowaniu związków indukujących śmierć komórek odległość euklidesowa spada. Dla komórek traktowanych cisplatyną w stężeniu $10 \mu\text{M}$ wynosi $124,14 \pm 76,56 \mu\text{m}$, natomiast dla komórek traktowanych cisplatyną w stężeniu $30 \mu\text{M}$ wynosi $127,155 \pm 82,16 \mu\text{m}$. W przypadku ikarytyny można zauważyć, że wraz ze wzrostem stężenia związku zmniejsza się odległość euklidesowa, gdzie dla ikarytyny $30 \mu\text{M}$ wynosi $116,02 \pm 76,64 \mu\text{m}$, a dla ikarytyny $60 \mu\text{M}$ - $74,28 \pm 62,29 \mu\text{m}$ (tab. 15).

H1299			
Stężenie cisplatyny [μM]	Odległość euklidesowa [μm]	Stężenie ikarytyny [μM]	Odległość euklidesowa [μm]
K	141,48 \pm 93,05	K	141,48 \pm 93,05
Cp 10	124,14 \pm 76,56	Ica 30	116,02 \pm 76,64
Cp 30	127,155 \pm 82,16	Ica 60	74,28 \pm 62,29

Tab. 15. Wpływ poszczególnych dawek cisplatyny i ikarytyny na odległość euklidesową pokonaną przez komórki linii H1299. Wyniki poszczególnych grup przedstawiono w postaci średnich \pm odchylenie standardowe.

Analiza statystyczna wykazała zmiany istotne statystycznie tylko między grupą komórek kontrolnych, a grupą komórek traktowanych ikarytyną w najwyższym stężeniu, gdzie $P=0,0507$ oraz między najwyższą dawką cisplatyny i najwyższą dawką ikarytyny, gdzie $P=0,0353$ (wyk. 12A/12B).



Wyk. 12. Wpływ poszczególnych dawek cisplatyny i ikarytyny na odległość euklidesową pokonaną przez komórki linii H1299. (A) Odległość euklidesowa pokonaną przez komórki. (B) Odległość euklidesowa pokonaną przez komórki – heat mapa istotności statystycznych. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA na poziomie istotności, gdzie *** - $P \leq 0,001$; * - $P \leq 0,05$. Na podstawie minimum 3 niezależnych doświadczeń.

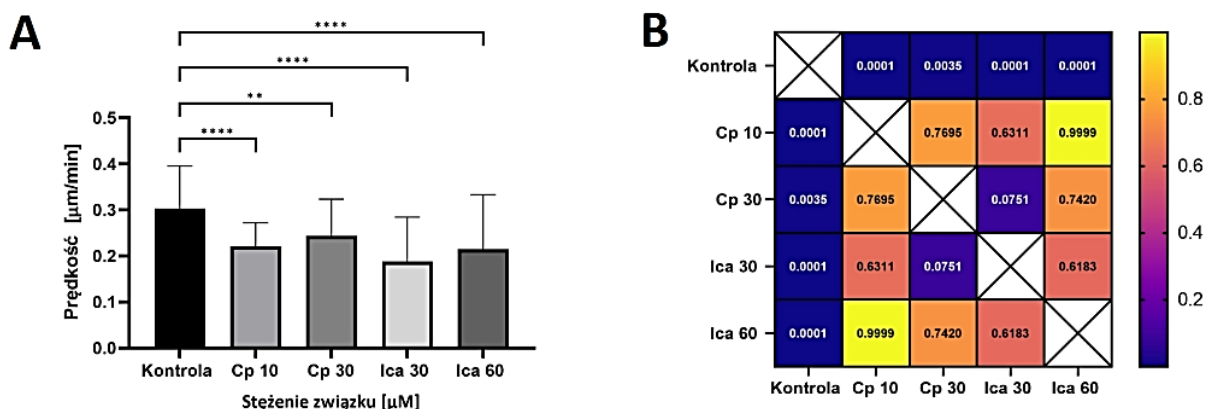
3. Prędkość komórek

Prędkość komórek linii H1299 wyliczono również na podstawie wyników z mikroskopu kontrastowo-fazowego z hodowlą przyżyciową. Prędkość komórek z grupy kontrolnej wynosiła 0,3109 $\mu\text{m}/\text{min}$, natomiast zastosowanie związków cytotoksycznych spowodowało zmniejszenie prędkości komórek traktowanych. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 16.

H1299			
Stężenie cisplatyny [μM]	Prędkość [$\mu\text{m}/\text{min}$]	Stężenie ikarytyny [μM]	Prędkość [$\mu\text{m}/\text{min}$]
K	0,3109	K	0,3109
Cp 10	0,2207	Ica 30	0,1926
Cp 30	0,2419	Ica 60	0,2079

Tab. 16. Wpływ poszczególnych dawek cisplatyny i ikarytyny na prędkość komórek linii H1299. Wyniki poszczególnych grup przedstawiono w postaci średnich \pm odchylenie standardowe.

Wyniki analizy statystycznej wykazały zmiany istotne statystycznie, które zaobserwowano tylko między grupą kontrolą, a poszczególnymi dawkami. Istotność statystyczna, gdzie $P < 0,0001$ występowały pomiędzy kontrolą, a obiema dawkami ikarytyny oraz najniższą dawką cisplatyny zastosowaną w badaniach. Natomiast istotność, gdzie $P = 0,0035$, odnotowano między grupą kontrolą, a grupą komórek traktowaną cisplatyną w stężeniu $30 \mu\text{M}$ (wyk. 13A/13B).



Wyk. 13. Wpływ poszczególnych dawek cisplatyny i ikarytyny na prędkość komórek linii H1299. (A) Prędkość komórek. (B) Prędkość komórek – heat mapa istotności statystycznych. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA na poziomie istotności, gdzie **** - $P \leq 0,0001$; ** - $P \leq 0,01$. Na podstawie minimum 3 niezależnych doświadczeń.

4.5. Ocena rodzaju indukowanej śmierci komórek

W celu oceny rodzaju indukowanej śmierci komórek linii A549 i H1299 po zastosowaniu leków cytostatycznych wykonano metodę podwójnego barwienia aneksyną V (Alexa Fluor 488) oraz jodkiem propidyny (PI). Aneksyna V skoniugowana z fluoresceiną łączy się z fosfatydyloseryną. W komórkach prawidłowych fosfatydyloseryna znajduje się po wewnętrznej stronie błony komórkowej, natomiast podczas procesu apoptozy następuje jej translokacja do warstwy zewnętrznej, co stanowi jeden z markerów apoptozy. Jodek propidyny interkaluje do DNA, ale jest to tylko możliwe w komórkach, które utraciły integralność błony komórkowej. Występuje to głównie w przypadku komórek późno-apoptotycznych oraz nekrotycznych. Detekcję sygnałów zobrazowano przy użyciu cytometru przepływowego.

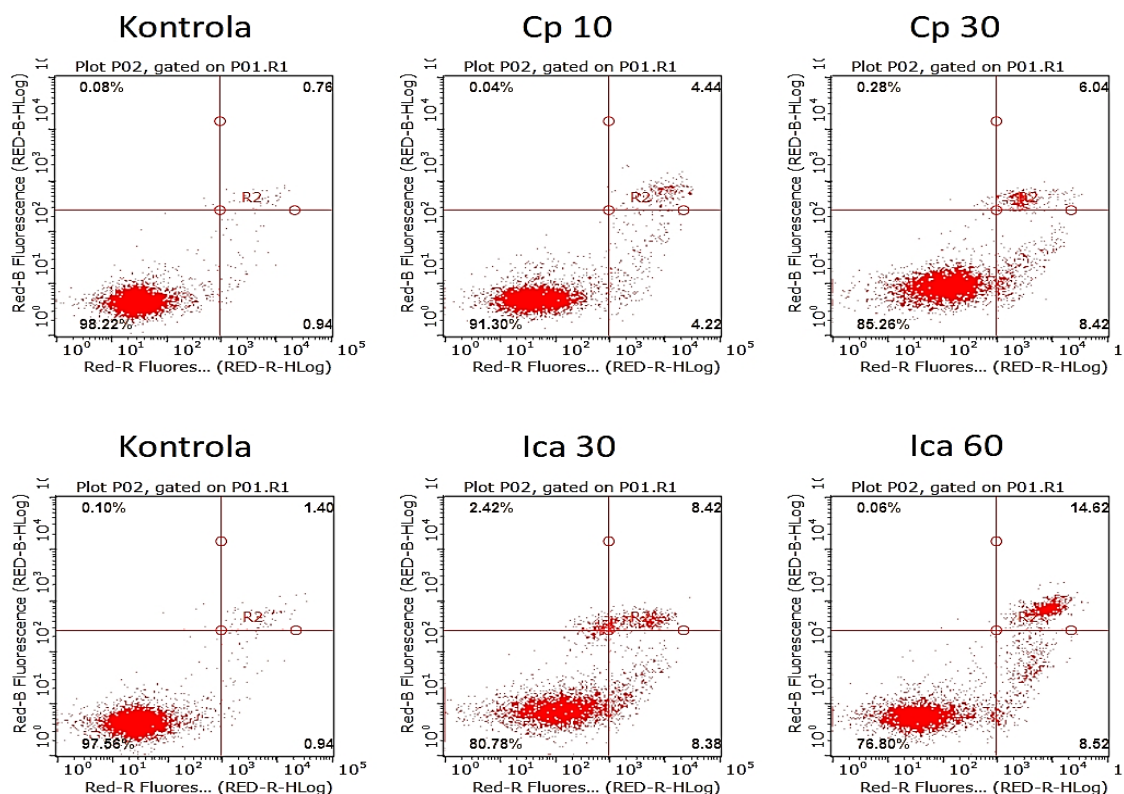
4.5.1. Komórki linii A549

W komórkach linii A549 zaobserwowano zmiany w odsetku komórek poszczególnych grup (tab. 17). Istotne statystycznie zmiany występują w odsetku komórek żywych pod wpływem działania wszystkich użytych stężeń cisplatyny i ikarytyny (wyk. 14A/14B). W przypadku komórek wczesno-apoptotycznych oraz późno-apoptotycznych zmiany istotne statystycznie występowały tylko pod wpływem działania ikarytyny (wyk. 14C/14D i 14E/14F). Natomiast w komórkach nekrotycznych nie zaobserwowano zmian istotnych statystycznie (wyk. 14G/14H).

Stężenie związku [μM]	% komórek			
	Żywe	Wczesna apoptoza	Późna apoptoza	Nekroza
K	97,49 ± 0,62	0,99 ± 0,08	1,46 ± 0,60	0,89 ± 0,01
Cp 10	89,86 ± 2,68	5,04 ± 1,85	5,03 ± 0,87	0,07 ± 0,04
Cp 30	87,83 ± 2,09	7,81 ± 1,62	4,21 ± 1,39	0,15 ± 0,1
Ica 30	82,18 ± 3,01	8,51 ± 3,28	8,47 ± 0,45	0,85 ± 1,11
Ica 60	75,97 ± 1,61	13,54 ± 5,35	10,4 ± 3,16	0,09 ± 0,04

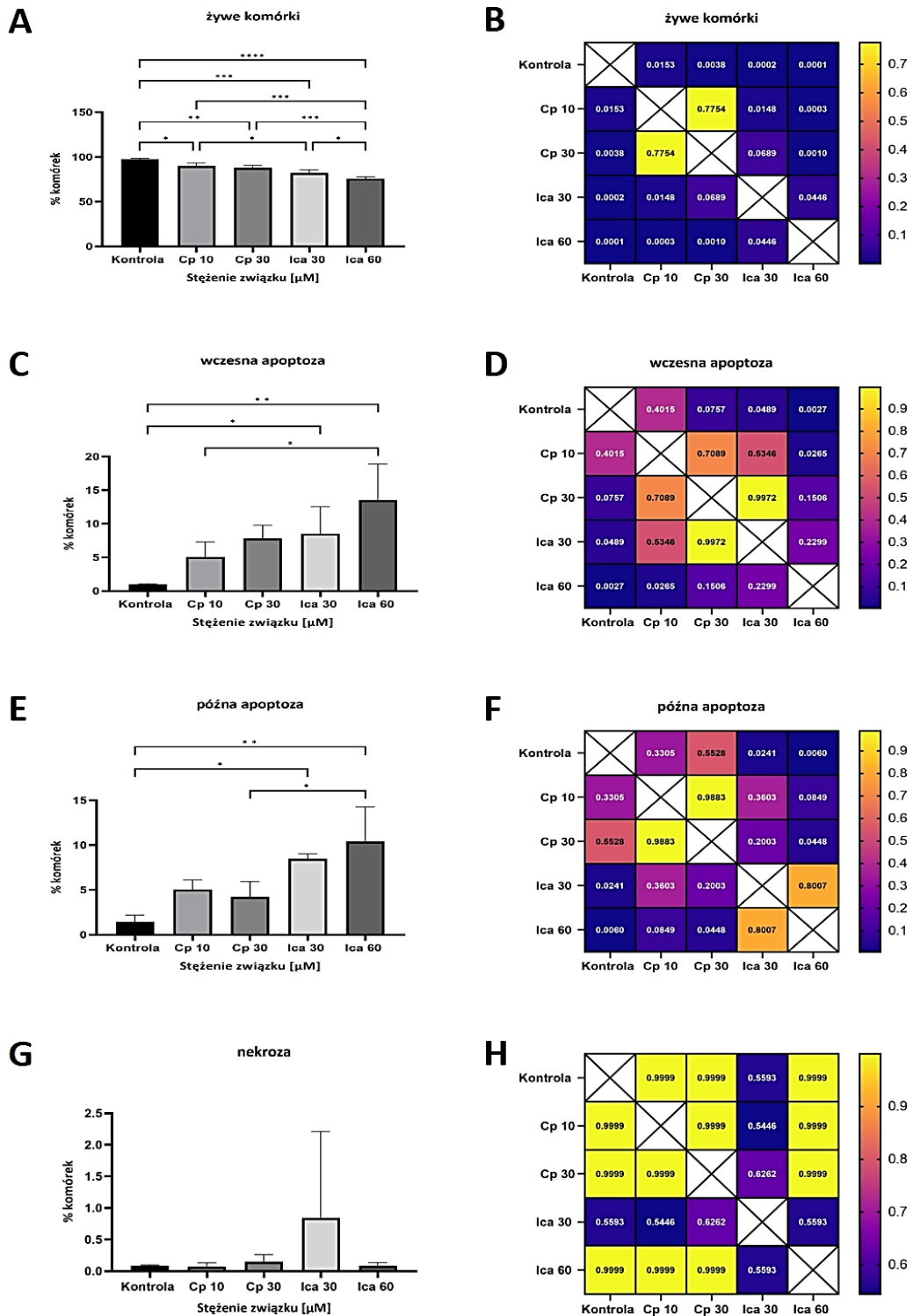
Tab.17. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na indukcję śmierci komórek linii A549 po 48 godzinnej inkubacji ze związkami. Wyniki poszczególnych grup przedstawiono w postaci średnich ± odchylenie standardowe.

Wyniki rodzaju indukowanej śmierci komórek z cytometru przepływowego pokazano na reprezentatywnych wykresach (ryc. 42).



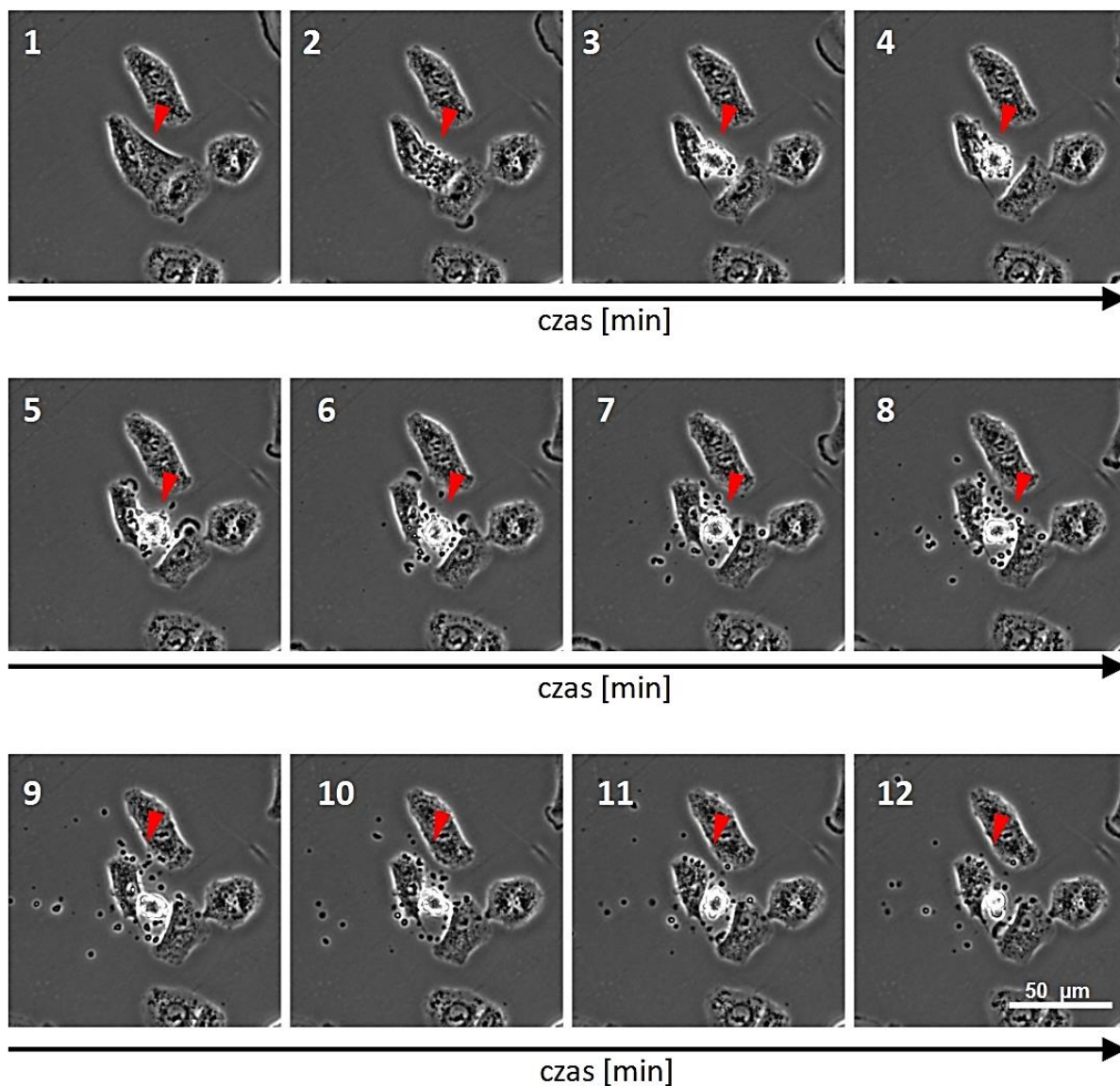
Ryc. 42. Wykresy przedstawiające zmiany w ilości komórek linii A549 w poszczególnych populacjach śmierci komórki. Oś X – intensywność fluorescencji, oś Y – ilość komórek. Wybrano jeden reprezentatywny wykres dla każdego stężenia związku na podstawie minimum 3 niezależnych doświadczeń.

Analiza porównawcza wyników linii A549 przy użyciu cytometrii przepływowej wykazała, że zastosowanie cisplatyny w stężeniu 10 i 30 μM oraz ikarytyny w stężeniu 30 i 60 μM przyczyniło się do istotnego statystycznie obniżenia odsetka komórek żywych w stosunku do komórek kontrolnych. Odsetek komórek żywych w kontroli wynosił 97,49%, natomiast 89,86% ($P=0,0153$); 87,83% ($P=0,0038$); 82,18% ($P=0,0002$); 75,97% ($P<0,0001$) odpowiednio dla Cp 10, Cp 30, Ica 30 oraz Ica 60 μM (tab. 17; wyk. 14A/14B). W odsetku komórek wczesno-apoptotycznych istotne statystycznie zmiany między grupą kontrolną, a dawkami związków użytych w badaniach zaobserwowano po zastosowaniu ikarytyny w stężeniu 30 μM (gdzie $P=0,0489$) oraz 60 μM (gdzie $P=0,0027$) (tab. 17; wyk. 14C/14D). Podobna sytuacja miała miejsce w komórkach późno-apoptotycznych, gdzie między kontrolą, a 30 μM ikarytyny $P=0,0241$, natomiast między kontrolą, a 60 μM ikarytyny $P=0,0060$ (wyk. 14E/14F).



Wyk. 14. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na indukcję śmierci komórek linii A549 po 48 godzinnej inkubacji ze związkami. (A) Żywe komórki. (B) Żywe komórki – heat mapa istotności statystycznych. (C) Wczesna apoptoza. (D) Wczesna apoptoza – heat mapa istotności statystycznych. (E) Późna apoptoza. (F) Późna apoptoza - heat mapa istotności statystycznych. (G) Nekroza. (H) Nekroza – heat mapa istotności statystycznych. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA na poziomie istotności, gdzie **** - $P \leq 0,0001$; *** - $P \leq 0,001$; ** - $P \leq 0,01$; * - $P \leq 0,05$. Na podstawie minimum 3 niezależnych doświadczeń.

Przebieg procesu apoptozy przedstawiono na ryc. 43. przy użyciu zdjęć poklatkowych wykonanych z zastosowaniem mikroskopu kontrastowo-fazowego.



Ryc. 43. Zdjęcia reprezentatywne przebiegu procesu apoptozy w pojedynczej komórce linii A549. Zdjęcia wykonywane w hodowli przyżyciowej, w interwale 10 minut przy użyciu mikroskopu kontrastowo-fazowego. Pierwsze zdjęcie wykonano po 1 godzinie i 50 minutach od potraktowania komórek ikarytyną w stężeniu 60 μM .

4.5.2. Komórki linii H1299

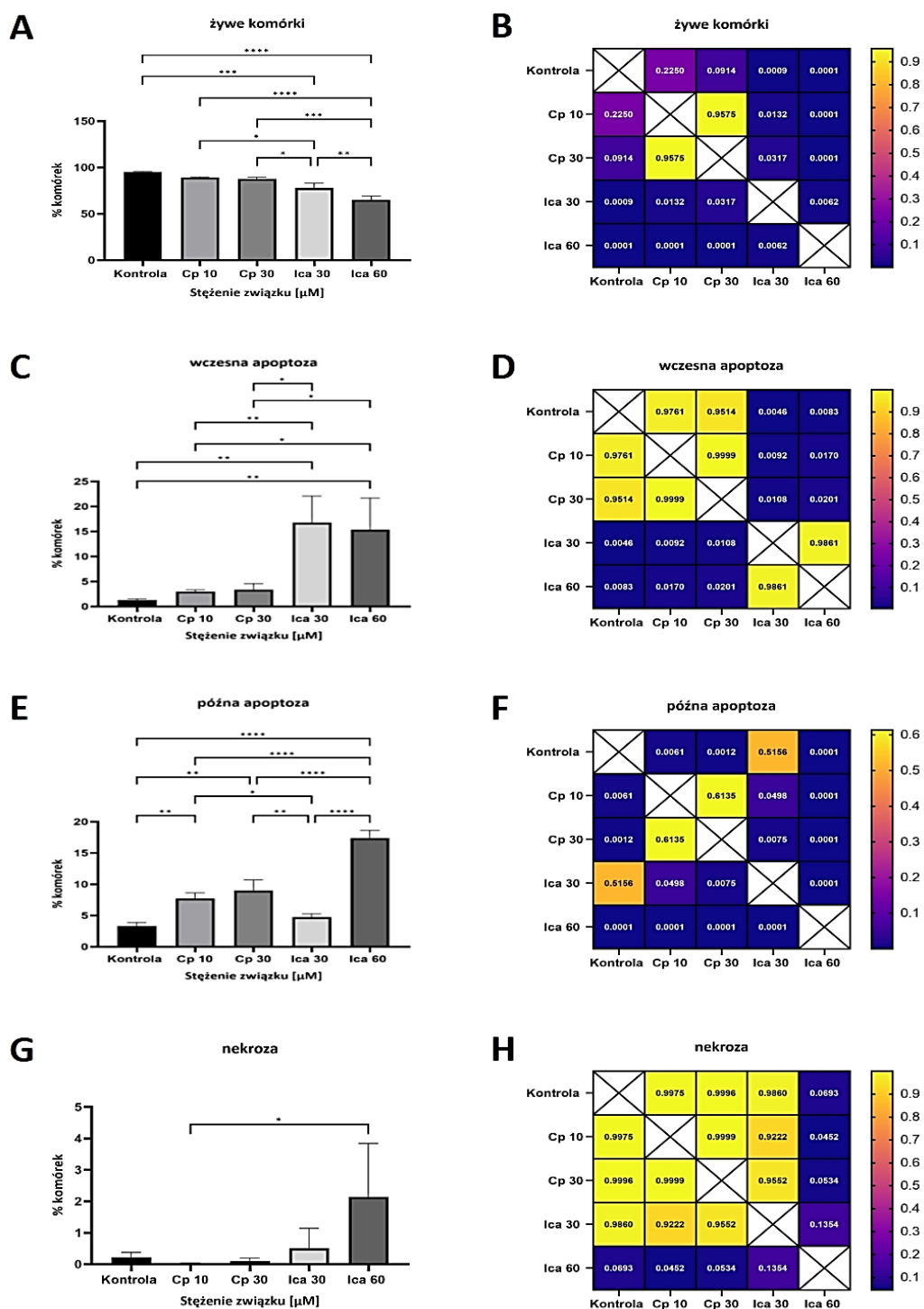
W komórkach linii H1299 można zaobserwować zmiany w odsetku komórek poszczególnych grup (tab. 18) W odsetku komórek żywych oraz wczesno-apoptotycznych tylko po zastosowaniu ikarytyny zaobserwowano statystycznie istotne zmiany między kontrolą, a

poszczególnymi dawkami (wyk. 15A/15B; 15C/15D). W przypadku komórek późno-apoptotycznych zmiany istotne statystycznie występują między kontrolą, a dawkami cisplatyny oraz najwyższą zastosowaną dawką ikarytyny (wyk. 15E/15F). Natomiast w odsetku komórek nekrotycznych między komórkami z grupy kontrolnej, a komórkami traktowanymi cisplatyną oraz ikarytyną nie występują zmiany istotne statystycznie (wyk. 15G/15H).

Stężenie związku [μM]	% komórek			
	Żywe	Wczesna apoptoza	Późna apoptoza	Nekroza
K	95,22 ± 0,33	1,32 ± 0,19	3,33 ± 0,45	0,22 ± 0,13
Cp 10	89,28 ± 0,50	2,97 ± 0,28	7,71 ± 0,75	0,03 ± 0,01
Cp 30	87,58 ± 1,38	3,35 ± 1	8,97 ± 1,43	0,11 ± 0,07
Ica 30	77,96 ± 4,31	16,79 ± 4,34	4,74 ± 0,44	0,51 ± 0,52
Ica 60	65,11 ± 3,34	15,36 ± 5,16	17,39 ± 1	2,14 ± 1,39

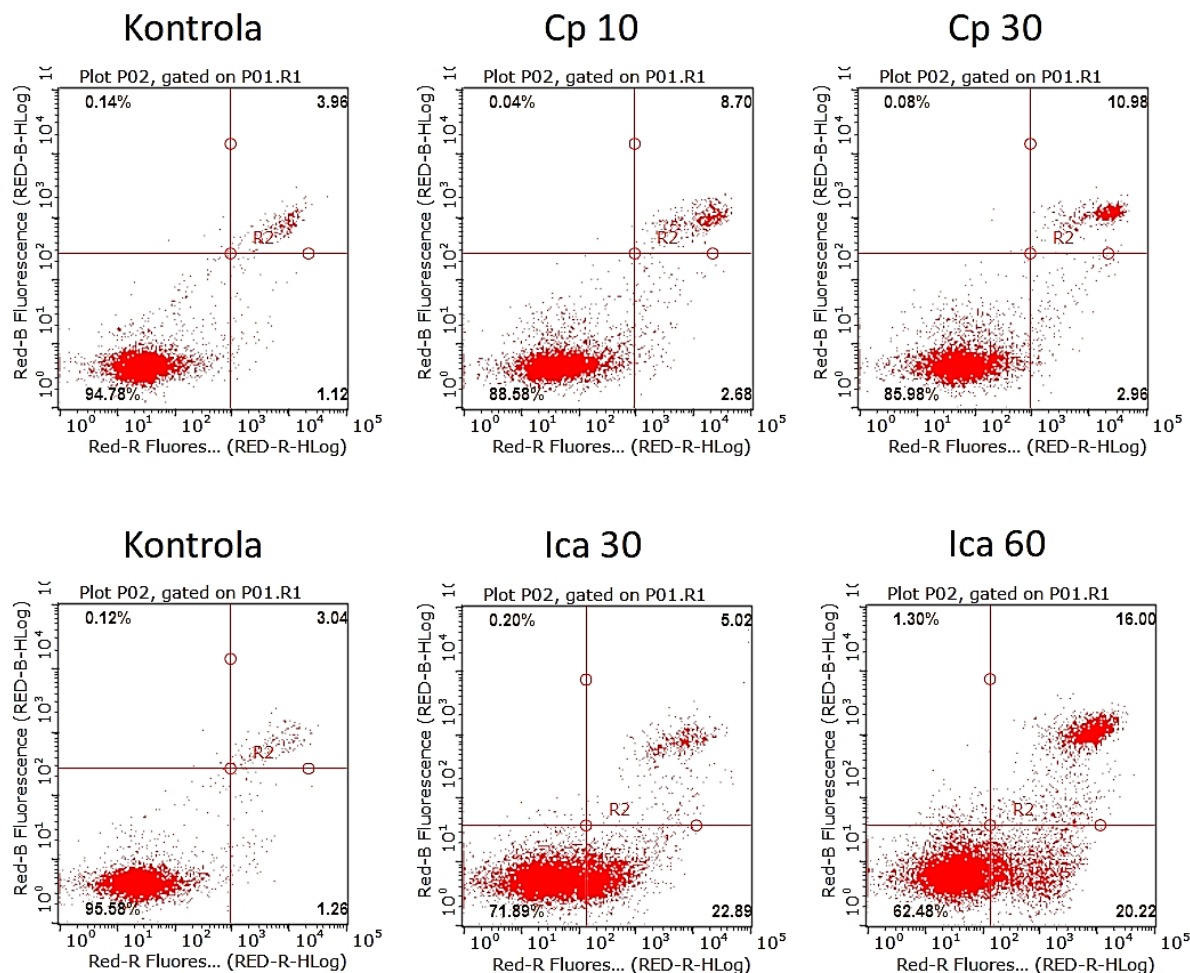
Tab. 18. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na indukcję śmierci komórek linii H1299 po 48 godzinnej inkubacji ze związkami. Wyniki poszczególnych grup przedstawiono w postaci średnich ± odchylenie standardowe.

Szczegółowa analiza statystyczna wykazała, że w przypadku komórek żywych nastąpił spadek ich odsetka z 95,22% w kontroli do 77,96% ($P=0,0009$) oraz 65,11% ($P<0,0001$) po traktowaniu ikarytyną odpowiednio w stężeniu 30 i 60 μM. Po traktowaniu komórek cisplatyną w stężeniu 10 μM i 30 μM nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w odsetku komórek (Kontrola vs Cp 10 – $P=0,2250$; kontrola vs Cp 30 – $P=0,0914$) (tab. 18; wyk. 15A/15B). W odsetku komórek wczesno-apoptotycznych zaobserwowano wzrost ich odsetka z 1,32 % w kontroli do 16,79 % (gdzie $P=0,0046$) po zastosowaniu ikarytyny w stężeniu 30 μM oraz 15,36 % (gdzie $P=0,0083$) po zastosowaniu ikarytyny w stężeniu 60 μM. Po zastosowaniu obu stężeń cisplatyny, tak samo jak w przypadku odsetka komórek żywych, nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian między kontrolą a dawkami (tab. 18; wyk. 15C/15D). W odsetku komórek późno-apoptotycznych największy wzrost w odniesieniu do kontroli zaobserwowano w grupie komórek traktowanych ikarytyną w stężeniu 60 μM z 3,33% do 17,39% (gdzie $P<0,0001$), natomiast po zastosowaniu cisplatyny w stężeniu 10 μM i 30 μM zaobserwowano wzrost odpowiednio do 7,71% ($P=0,0061$) oraz do 8,97% ($P=0,012$) (tab. 18; wyk. 15E/15F).



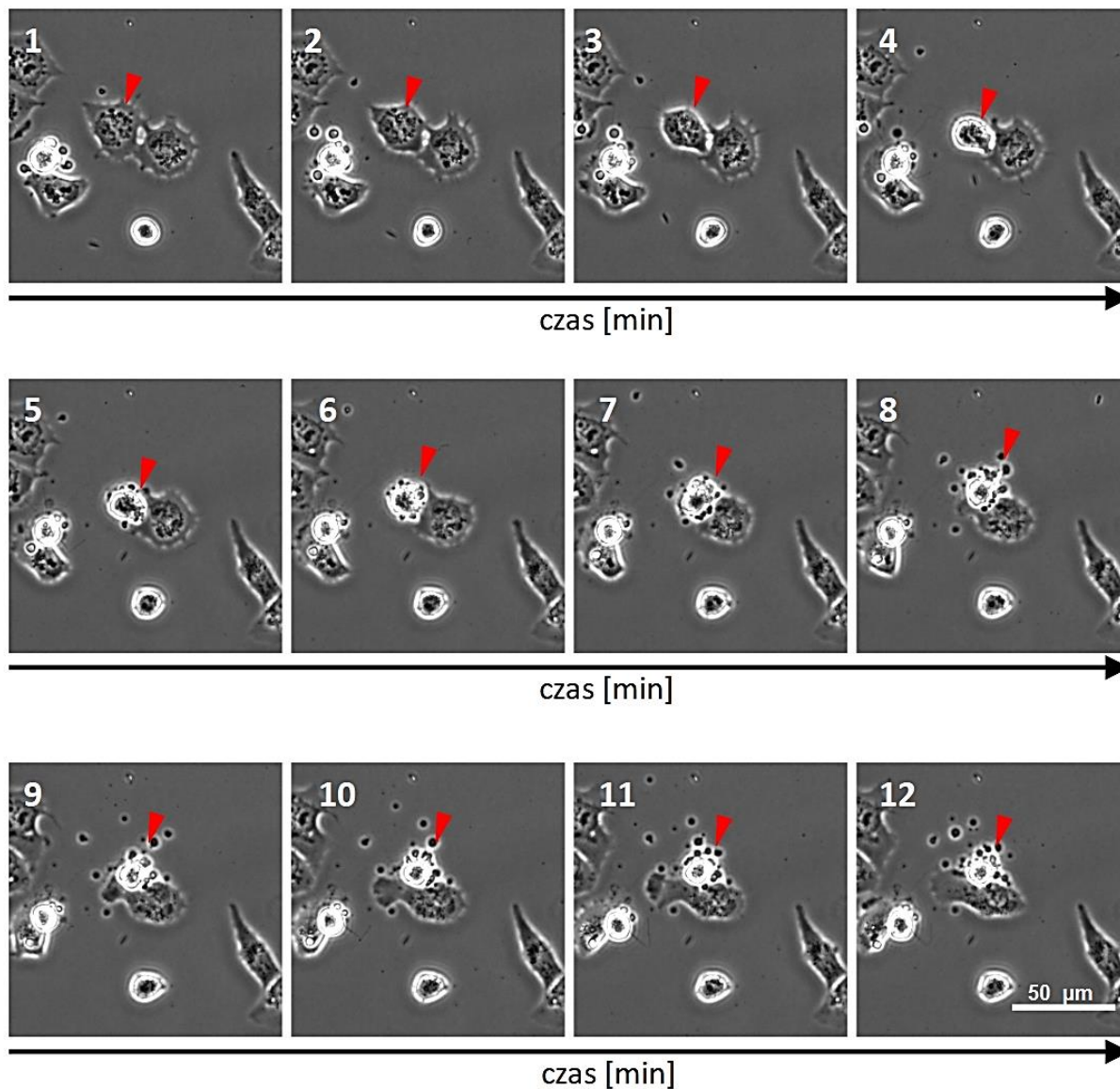
Wyk. 15. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na indukcję śmierci komórek linii H1299 po 48 godzinnej inkubacji ze związkami. (A) Żywe komórki. (B) Żywe komórki – heat mapa istotności statystycznych. (C) Wczesna apoptoza. (D) Wczesna apoptoza – heat mapa istotności statystycznych. (E) Późna apoptoza. (F) Późna apoptoza – heat mapa istotności statystycznych. (G) Nekroza. (H) Nekroza – heat mapa istotności statystycznych. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA na poziomie istotności, gdzie **** - $P \leq 0,0001$; *** - $P \leq 0,001$; ** - $P \leq 0,01$; * - $P \leq 0,05$. Na podstawie minimum 3 niezależnych doświadczeń.

Wyniki rodzaju indukowanej śmierci komórek linii H1299 z cytometru przepływowego pokazano na reprezentatywnych wykresach (ryc. 44).



Ryc. 44. Wykresy przedstawiające zmiany w ilości komórek linii H1299 w poszczególnych populacjach różnych rodzajów śmierci komórki. Oś X – intensywność fluorescencji, oś Y – ilość komórek. Wybrano jeden reprezentatywny wykres dla każdego stężenia związku na podstawie minimum 3 niezależnych doświadczeń.

Przebieg procesu apoptozy przedstawiono na ryc. 45 przy użyciu zdjęć poklatkowych wykonanych z zastosowaniem mikroskopu kontrastowo-fazowego.



Ryc. 45. Zdjęcia reprezentatywne przebiegu procesu apoptozy w pojedynczej komórce linii H1299. Zdjęcia wykonywane w hodowli przyżyciowej, w interwale 10 minut przy użyciu mikroskopu kontrastowo-fazowego. Pierwsze zdjęcie wykonano po 1 godzinie i 50 minutach od potraktowania komórek ikarytyną w stężeniu 60 µM.

4.6. Ocena ekspresji cykliny Y

W niniejszej rozprawie doktorskiej poziom ekspresji cykliny Y zbadano z zastosowaniem dwóch metod pomiarowych. Przy zastosowaniu cytometrii przepływowej po 48 godzinach inkubacji ze związkami uzyskano wartości liczbowe, które przedstawione zostały w postaci średniej arytmetycznej \pm odchylenie standardowe, a następnie wykonano analizę statystyczną. W drugiej części badań przeprowadzono barwienie immunofluorescencyjne komórek obu linii traktowanych cisplatyną i ikarytyną. W celu obserwacji zmian ekspresji badanego białka w czasie, barwienie wykonano w 5 punktach czasowych od momentu potraktowania komórek.

4.6.1. Ocena ekspresji cykliny Y przy użyciu cytometrii przepływowej

W celu oceny wpływu związków indukujących śmierć komórki na ekspresję cykliny Y w liniach niedrobnokomórkowego raka płuca A549 oraz H1299 jedną z zastosowanych metod pomiarów była cytometria przepływowa. Detektory fluorescencyjne w cytometrze przepływowym służą do określania ilości fluorescencji emitowanej przez komórki, co wskazuje poziom ekspresji wyznakowanego białka.

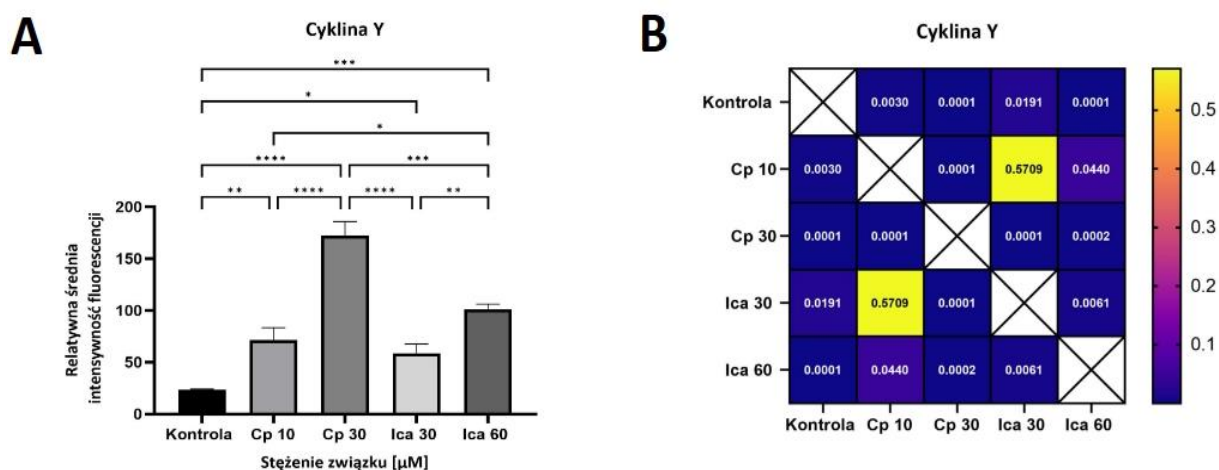
4.6.1.1. Komórki linii A549

Wyniki relatywnej średniej intensywności fluorescencji poziomu ekspresji cykliny Y w linii A549 z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, wykazały wzrost poziomu badanego białka po zastosowaniu cisplatyny i ikarytyny (tab. 19; wyk. 16A/16B). Zauważono, że wraz ze wzrostem dawki obu związków wzrasta poziom cykliny Y. W grupie komórek kontrolnych poziom cykliny Y wynosił $23,58 \pm 0,42$. Przy zastosowaniu dawki cisplatyny w stężeniu $10 \mu\text{M}$ ekspresja cykliny Y w porównaniu z kontrolą wzrasta prawie 4-krotnie ($71,52 \pm 9,73$, gdzie $P < 0,0001$), natomiast przy stężeniu $30 \mu\text{M}$ cisplatyny wzrost ekspresji cykliny Y jest już 7-krotny ($172,03 \pm 11,35$; $P < 0,0001$). W przypadku zastosowania ikarytyny wzrost ekspresji cykliny nie jest aż tak znaczny. Relatywna średnia fluorescencji dla ikarytyny w stężeniu $30 \mu\text{M}$ i $60 \mu\text{M}$ wynosi odpowiednio $58,64 \pm 7,35$ (gdzie $P < 0,0001$) oraz $101,33 \pm 4,01$ ($P < 0,0001$) (tab. 19; wyk. 16A/16B).

Stężenie związku [μM]	Relatywna średnia intensywność fluorescencji
K	23,58 \pm 0,42
Cp 10	71,52 \pm 9,73
Cp 30	172,03 \pm 11,35
Ica 30	58,64 \pm 7,35
Ica 60	101,33 \pm 4,01

Tab. 19. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na ekspresję cykliny Y w komórkach linii A549. Wyniki poszczególnych grup przedstawiono w postaci średnich \pm odchylenie standardowe.

Wyniki istotności statystycznych między dawkami, gdzie $P < 0,0001$, występują między dawką 30 μM cisplatyny, a dawką 10 μM cisplatyny oraz dawką 30 μM cisplatyny, a ikarytyną w stężeniu 30 μM . Natomiast mniejsza różnica (gdzie $P < 0,001$) w poziomie ekspresji cykliny Y zachodzi między dawką 30 μM cisplatyny w porównaniu ze stężeniem ikarytyny wynoszącym 60 μM (wyk. 16A/16B).



Wyk. 16. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na ekspresję cykliny Y w komórkach linii A549. (A) Relatywna średnia intensywność fluorescencji cykliny Y. (B) Relatywna średnia intensywność fluorescencji cykliny Y – heat mapa istotności statystycznych. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA na poziomie istotności, gdzie **** - $P \leq 0,0001$; *** - $P \leq 0,001$; ** - $P \leq 0,01$; * - $P \leq 0,05$. Na podstawie minimum 3 niezależnych doświadczeń.

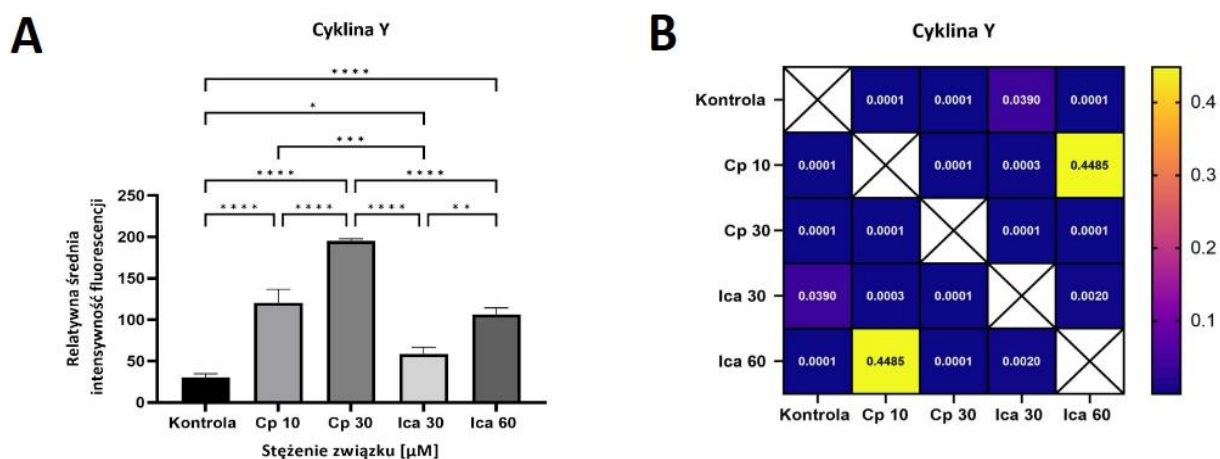
4.6.1.2. Komórki linii H1299

Przeprowadzone badanie cytometryczne dla linii H1299 również wykazało zmiany w poziomie ekspresji cykliny Y (tab. 20). W komórkach kontrolnych relatywna średnia fluorescencji cykliny Y wynosiła $30,05 \pm 3,77$ (niewiele więcej, niż w przypadku linii A549). W porównaniu z grupą komórek traktowanych cisplatyną w stężeniu $10 \mu\text{M}$ oraz $30 \mu\text{M}$ istotność statystyczna wynosiła $P < 0,0001$, a relatywna średnia fluorescencji $120,38 \pm 13,43$ i $195,39 \pm 1,81$ dla pierwszej i drugiej dawki cisplatyny. Po zastosowaniu ikarytyny w dawce $30 \mu\text{M}$ i $60 \mu\text{M}$ porównując poziom ekspresji badanego białka z grupą kontrolną otrzymane wyniki wskazały istotność statystyczną tylko w grupie komórek traktowanych dawką $60 \mu\text{M}$ ($106,48 \pm 6,40$, gdzie $P < 0,0001$), co daje nam 3-krotny wzrost ekspresji cykliny Y (tab. 20, wyk. 17A/17B.).

Analizując różnicę wzrostu ekspresji między poszczególnymi dawkami obu związków można zauważyć istotności statystyczne, gdzie $P < 0,0001$, między Cp 30, a Ica 30 oraz między Cp 30, a Ica 60. Między komórkami potraktowanymi cisplatyną w stężeniu $10 \mu\text{M}$, a ikarytyną w stężeniu $30 \mu\text{M}$ istotność statystyczna wynosiła $P < 0,0001$, natomiast dla obu dawek ikarytyny $P < 0,0001$ (wyk. 17A/17B).

Stężenie związku [μM]	Relatywna średnia fluorescencji
K	$30,05 \pm 3,77$
Cp 10	$120,38 \pm 13,43$
Cp 30	$195,39 \pm 1,81$
Ica 30	$58,64 \pm 6,61$
Ica 60	$106,48 \pm 6,40$

Tab. 20. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na ekspresję cykliny Y w komórkach linii H1299. Wyniki poszczególnych grup przedstawiono w postaci średnich \pm odchylenie standardowe.



Wyk. 17. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na ekspresję cykliny Y w komórkach linii H1299. (A) Relatywna średnia intensywność fluorescencji cykliny Y. (B) Relatywna średnia intensywność fluorescencji cykliny Y – heat mapa istotności statystycznych. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA na poziomie istotności, gdzie **** - $P \leq 0,0001$; *** - $P \leq 0,001$; ** - $P \leq 0,01$; * - $P \leq 0,05$. Na podstawie minimum 3 niezależnych doświadczeń.

Reasumując, wyniki cytometryczne relatywnej średniej fluorescencji białka cykliny Y wykazują, że traktowanie komórek niedrobnokomórkowego raka płuca linii H1299 zarówno cisplatyną, jak i ikarytyną powodowało wzrost ekspresji badanego białka. Różnice w poziomie ekspresji zależą od rodzaju użytego związku oraz jego stężenia. Zauważono, że wraz ze wzrostem stężenia związków indukujących śmierć komórki, wzrasta relatywna średnia intensywność fluorescencji cykliny Y.

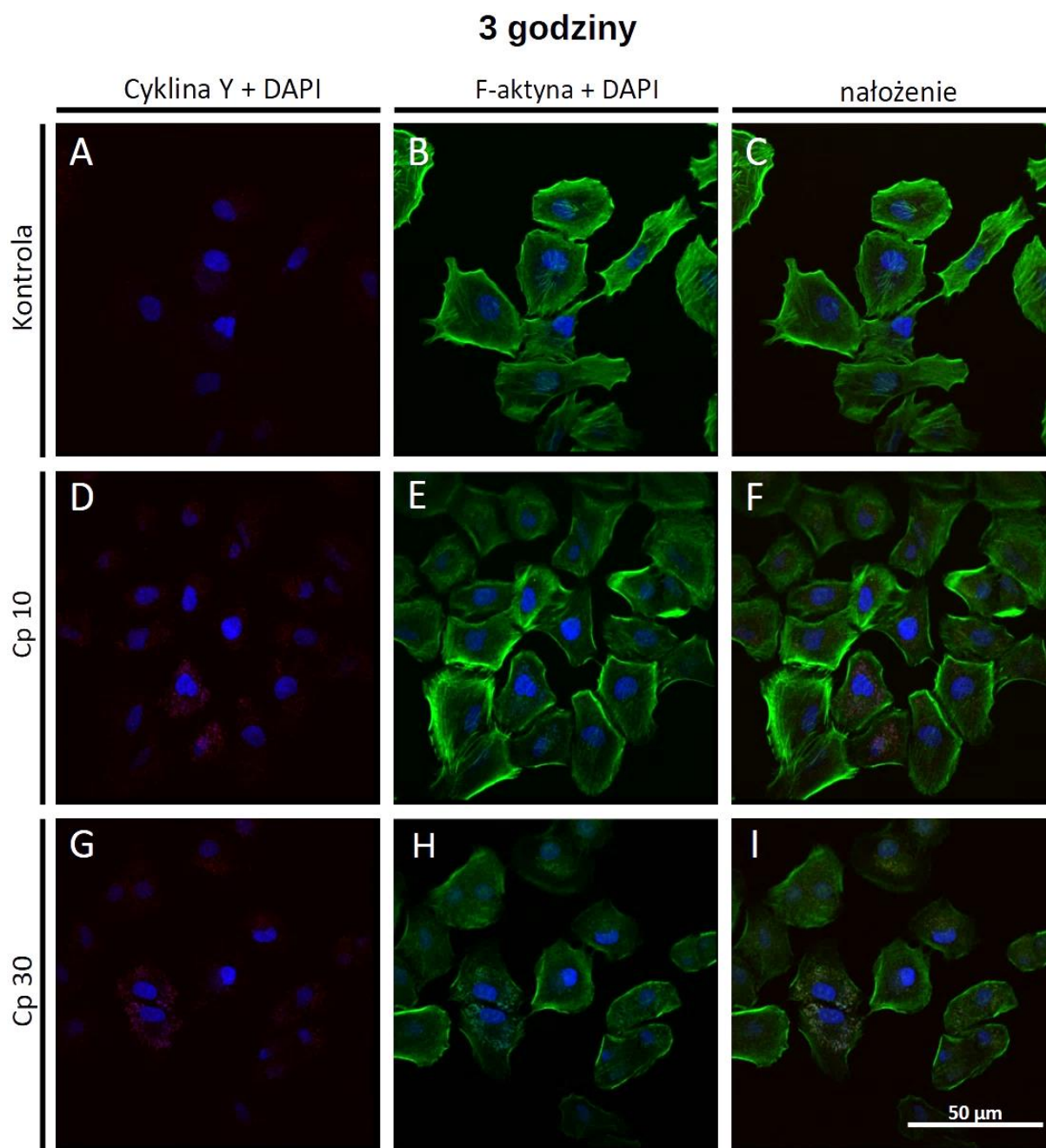
4.6.2. Ocena ekspresji cykliny Y przy użyciu metody fluorescencyjnego znakowania białek

W celu oceny wpływu czynników indukujących śmierć komórki na ekspresję cykliny Y w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuca linii A549 oraz H1299 zastosowano metodę fluorescencyjnego znakowania badanego białka. Metoda wykonana została dla 5 różnych czasów inkubacji ze związkami tj. 3, 6, 12, 24 i 48 godzin. Wyniki barwienia fluorescencyjnego analizowano przy zastosowaniu mikroskopu konfokalnego.

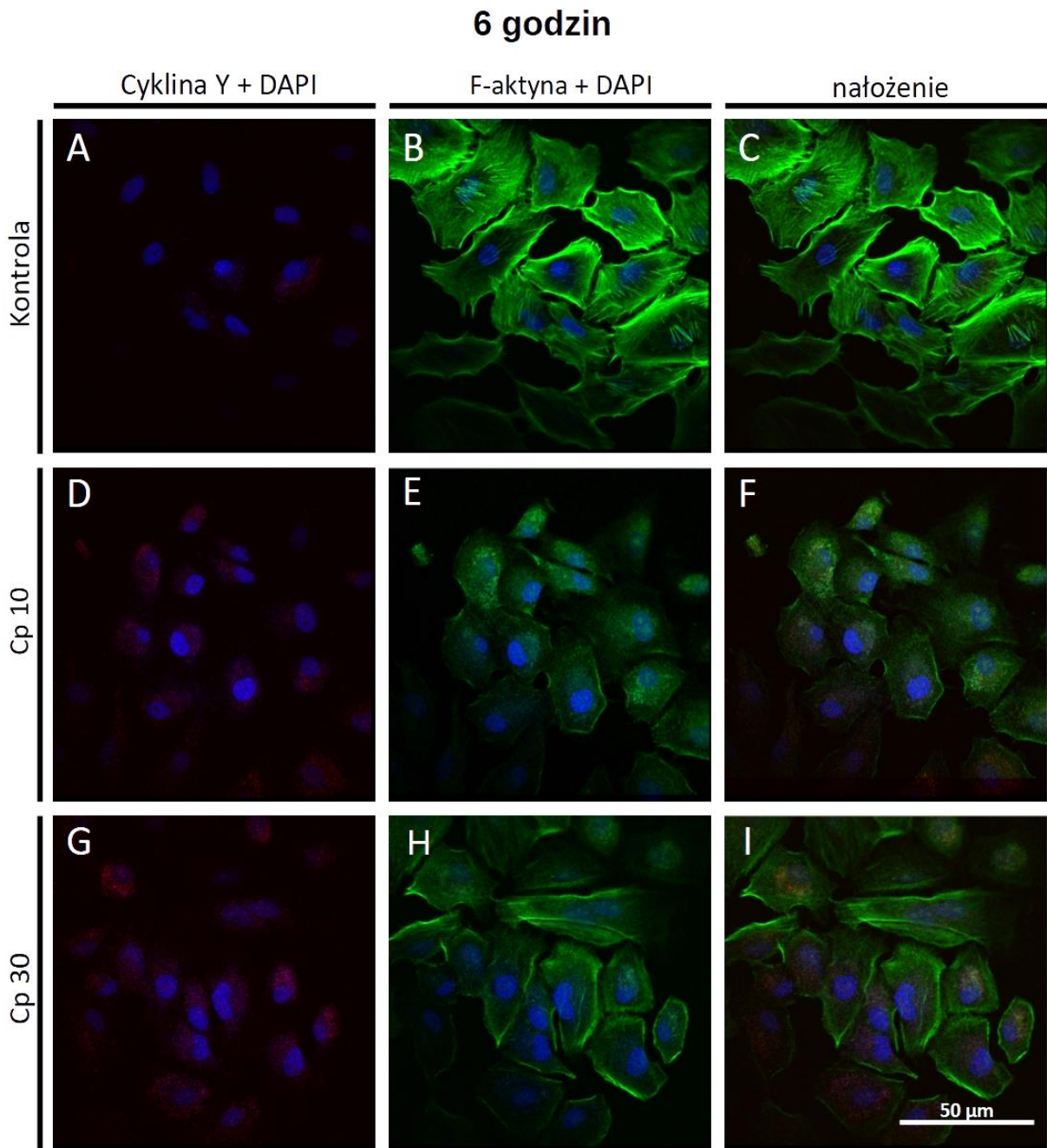
4.6.2.1. Komórki linii A549

Barwienie fluorescencyjne komórek linii A549, którego celem było określenie poziomu ekspresji cykliny Y wykonano w pięciu różnych punktach czasowych. Wykazano dawkozależny oraz czasozależny wpływ cisplatyny oraz ikarytyny na ekspresję badanego białka. Wraz ze

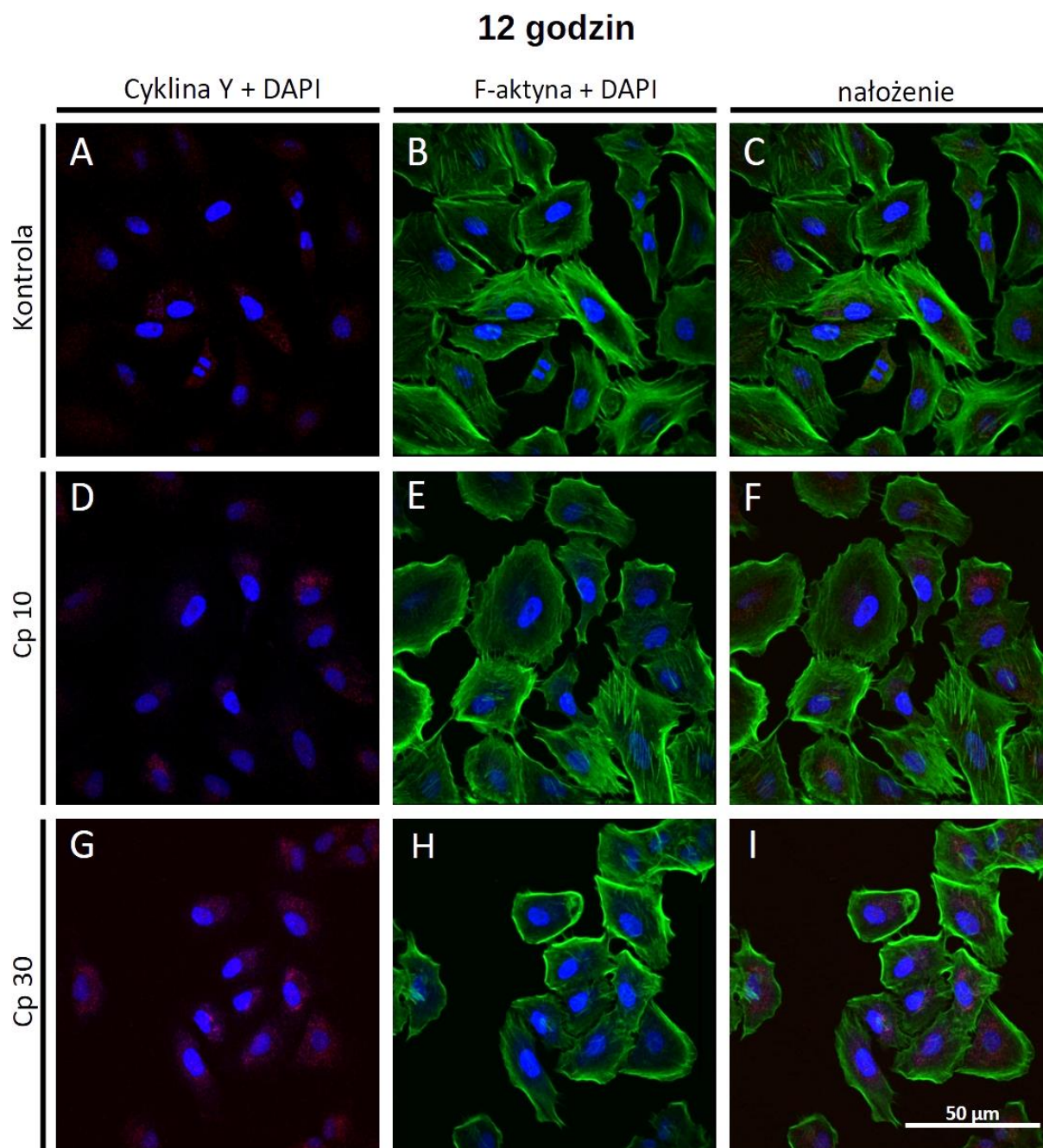
wzrostem stężenia cisplatyny oraz ikarytyny, a także wraz z dłuższym czasem inkubacji z wymienionymi związkami poziom ekspresji cykliny Y wzrastał. Najniższą ekspresję cykliny Y, zaobserwowano w komórkach kontrolnych, dodatkowo była ona niezmienna we wszystkich czasach inkubacji (ryc. 46-55). Cyklina Y lokalizowała się głównie w jądrze komórkowym, ale jej nieznaczny sygnał można zauważyć również w cytoplazmie. Po zastosowaniu cisplatyny wzrost ekspresji cykliny Y nastąpił już po 3 godzinach inkubacji ze związkiem (ryc. 46), gdzie przy zastosowaniu cisplatyny w stężeniu 30 μM immunofluorescencja białka była wyższa w porównaniu z dawką 10 μM . W czasie 6, 12, 24 oraz 48 godzin inkubacji z cisplatyną ekspresja cykliny Y wzrastała (ryc. 47-50), a najwyższy poziom uzyskała w ostatnim punkcie czasowym. Ekspresja wzrastała zarówno w jądrze komórkowym, jak i w cytoplazmie. Po zastosowaniu ikarytyny wyniki w poziomie ekspresji cykliny były analogiczne do wyników cisplatyny zakładając czasozależny oraz dawkozależny wzrost immunofluorescencji (ryc. 51-55). Natomiast poziom ekspresji cykliny Y był wyższy po zastosowaniu cisplatyny, w porównaniu z ikarytyną.



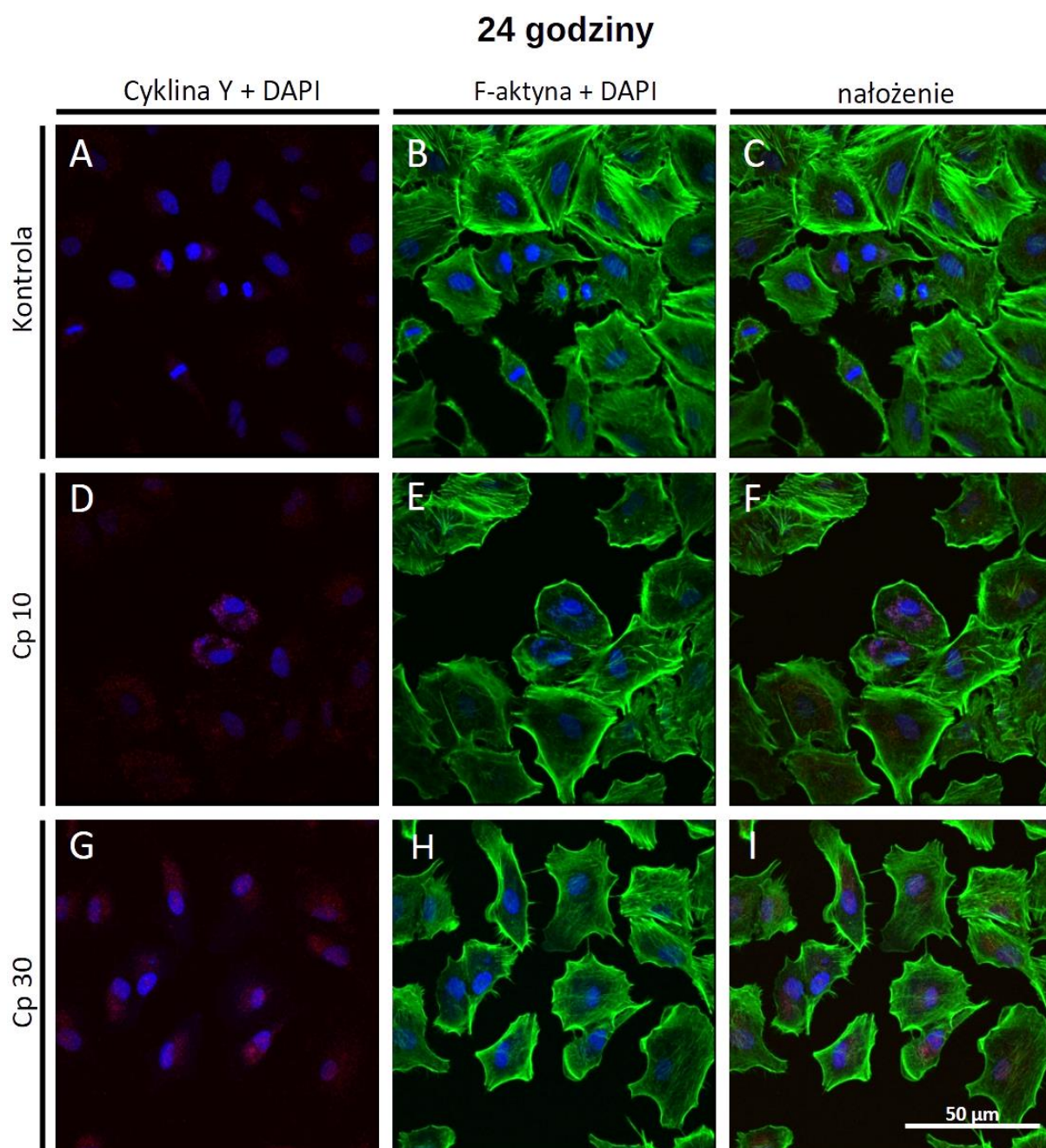
Ryc. 46. Wpływ poszczególnych dawek cisplatyny na komórki linii A549 (3 godzinna inkubacja ze związkiem). (A-C) kontrola. (D-F) Komórki traktowane cisplatyną w stężeniu 10 μM . (G-I) Komórki traktowane cisplatyną w stężeniu 30 μM . Widoczne: wraz ze wzrostem stężenia związku ekspresja cykliny Y wzrasta.



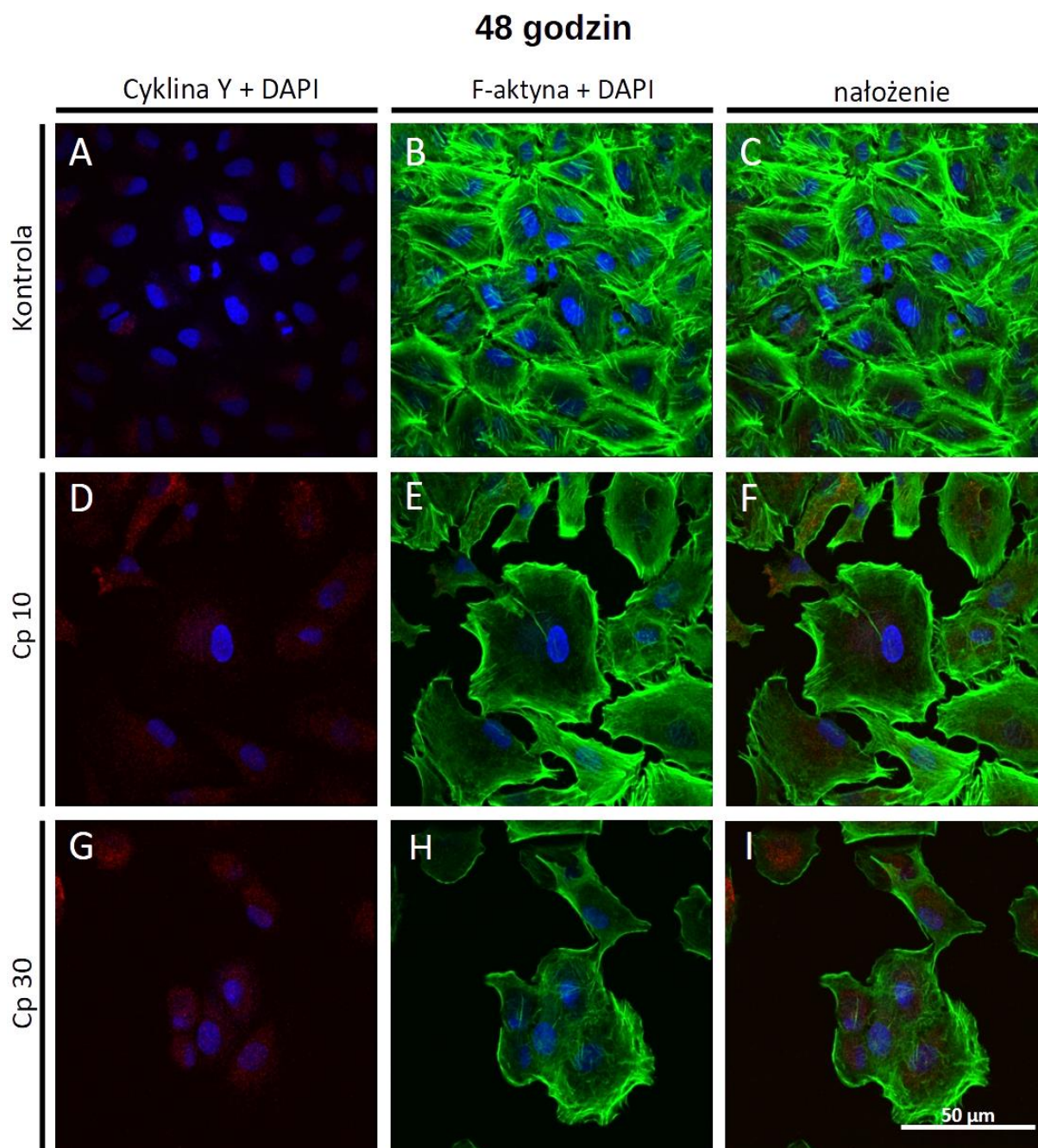
Ryc. 47. Wpływ poszczególnych dawek cisplatyny na komórki linii A549 (6 godzinna inkubacja ze związkiem). (A-C) kontrola. (D-F) Komórki traktowane cisplatyną w stężeniu 10 μM . (G-I) Komórki traktowane cisplatyną w stężeniu 30 μM . Widoczne: wraz ze wzrostem stężenia związku ekspresja cykliny Y wzrasta.



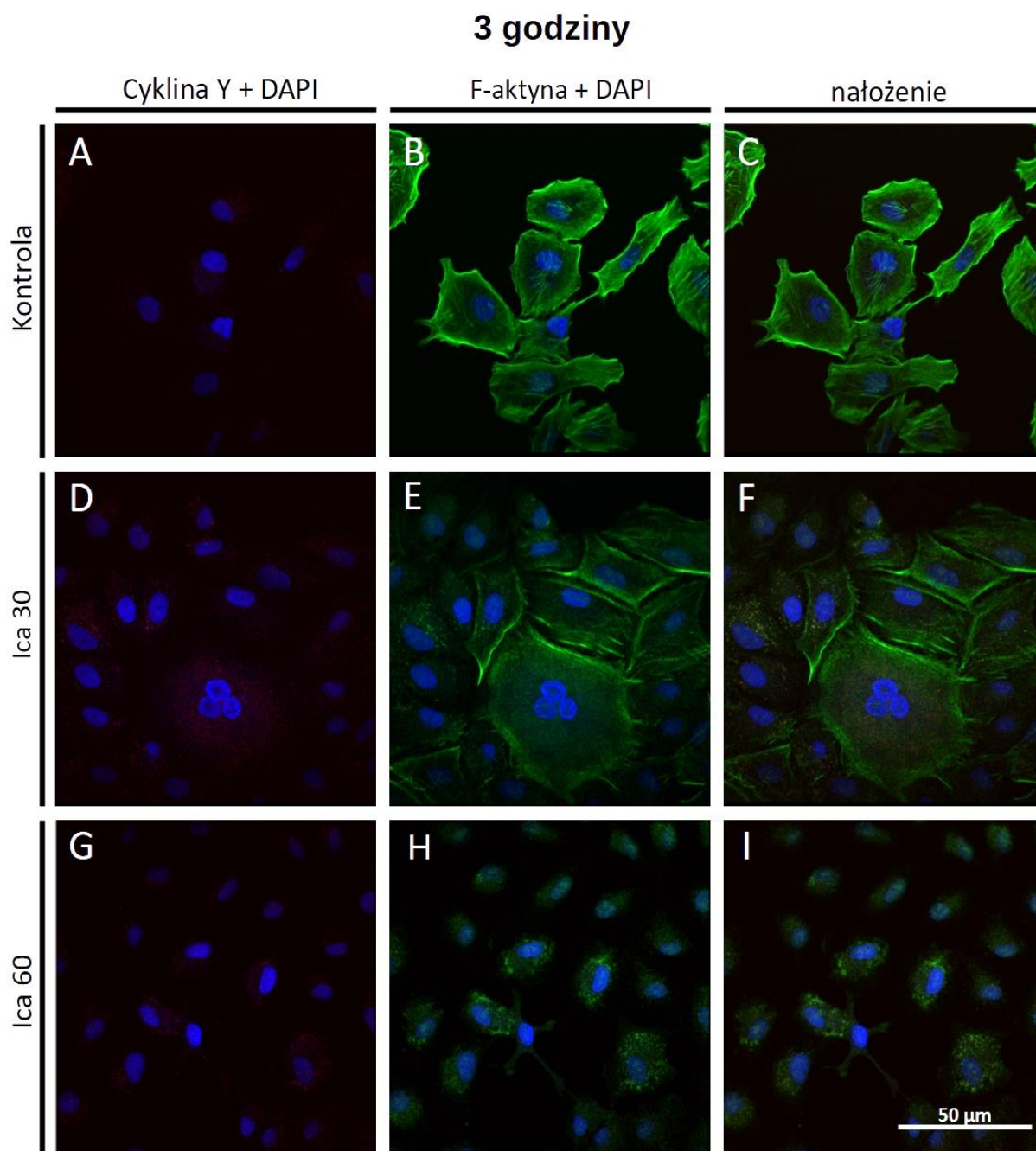
Ryc. 48. Wpływ poszczególnych dawek cisplatyny na komórki linii A549 (12 godzinna inkubacja ze związkiem). (A-C) kontrola. (D-F) Komórki traktowane cisplatyną w stężeniu 10 μM . (G-I) Komórki traktowane cisplatyną w stężeniu 30 μM . Widoczne: wraz ze wzrostem stężenia związku ekspresja cykliny Y wzrasta.



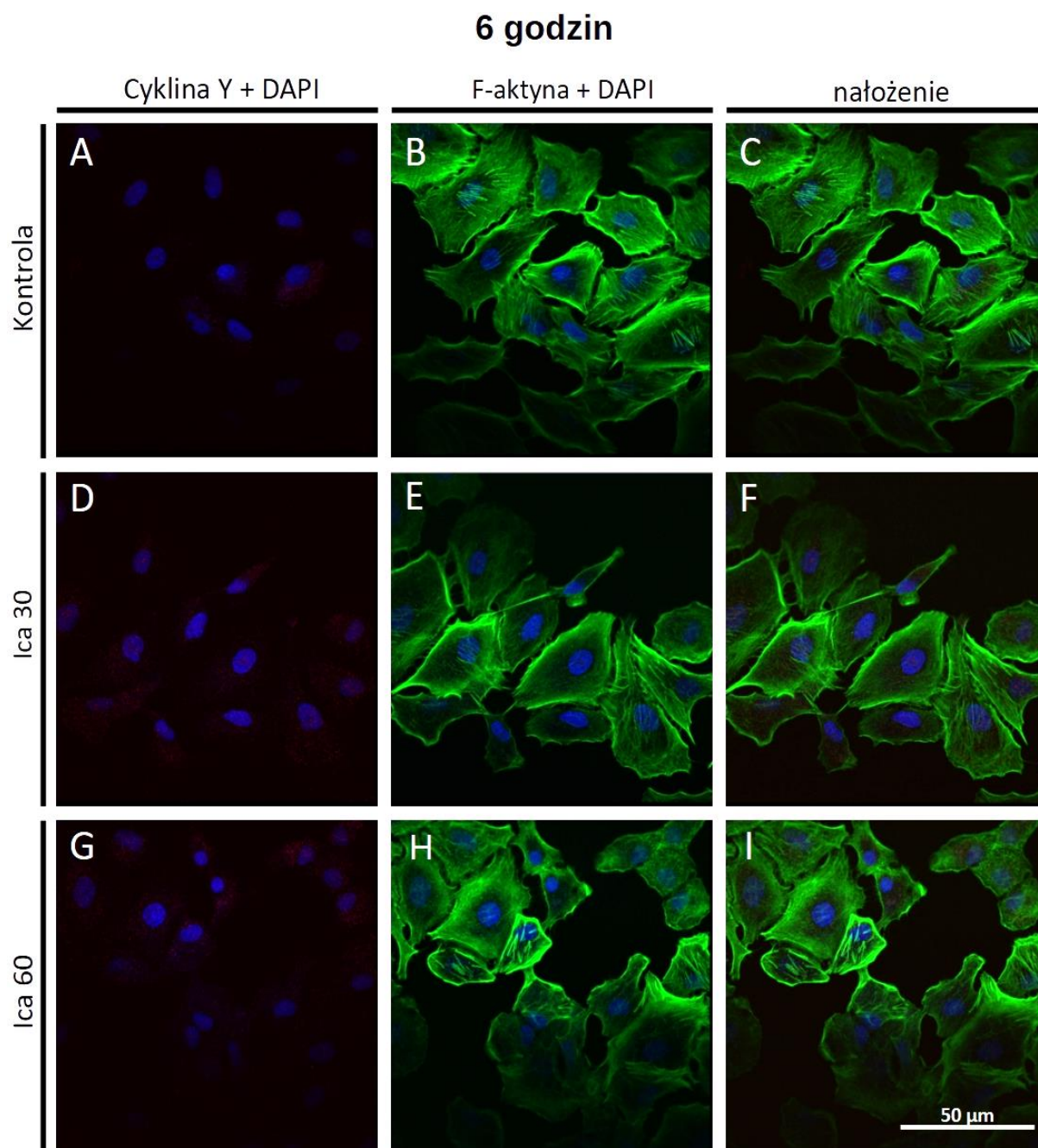
Ryc. 49. Wpływ poszczególnych dawek cisplatyny na komórki linii A549 (24 godzinna inkubacja ze związkiem). (A-C) kontrola. (D-F) Komórki traktowane cisplatyną w stężeniu 10 μM . (G-I) Komórki traktowane cisplatyną w stężeniu 30 μM . Widoczne: wraz ze wzrostem stężenia związku ekspresja cykliny Y wzrasta.



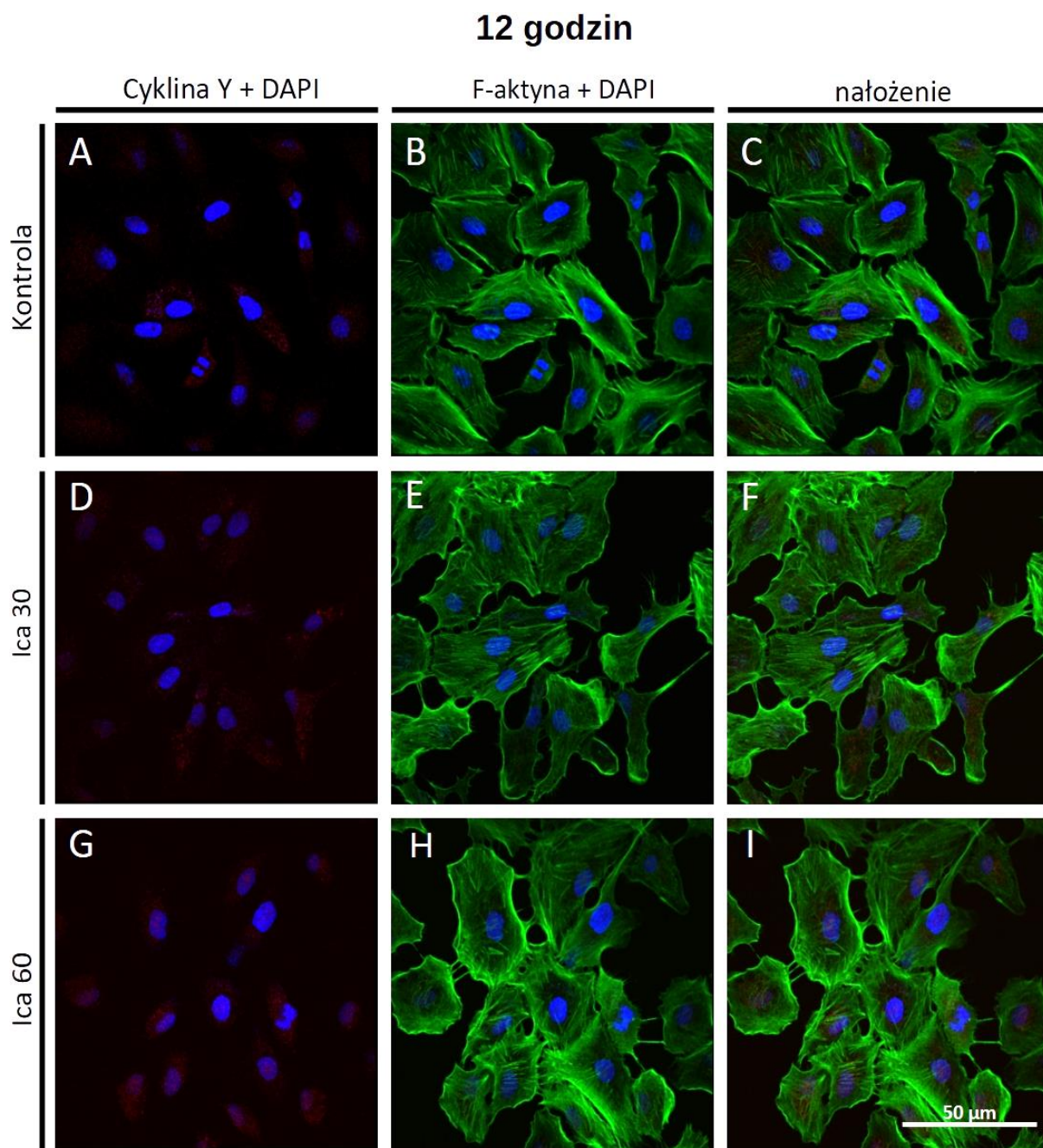
Ryc. 50. Wpływ poszczególnych dawek cisplatyny na komórki linii A549 (48 godzinna inkubacja ze związkiem). (A-C) kontrola. (D-F) Komórki traktowane cisplatyną w stężeniu 10 μM . (G-I) Komórki traktowane cisplatyną w stężeniu 30 μM . Widoczne: wraz ze wzrostem stężenia związku ekspresja cykliny Y wzrasta.



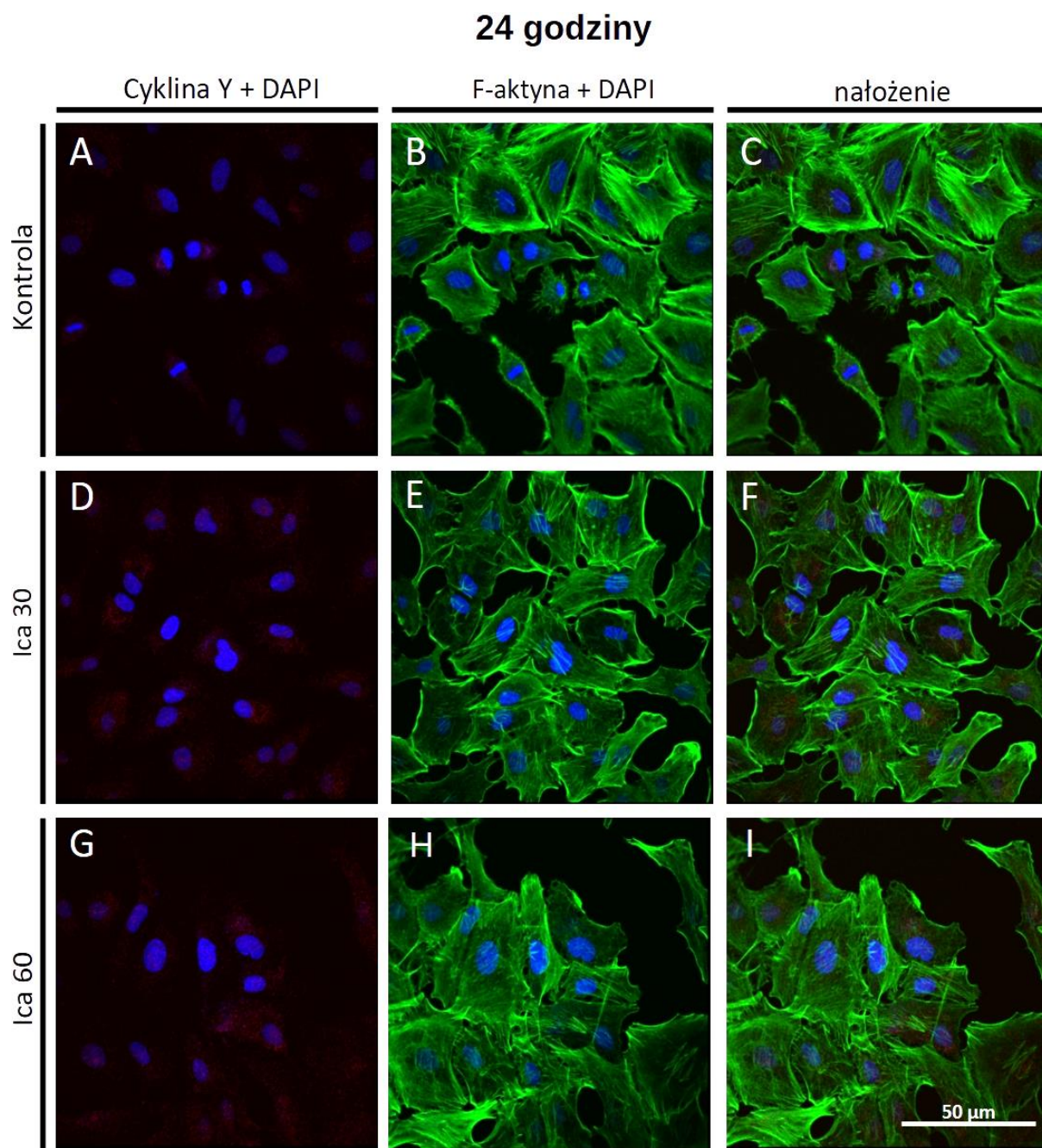
Ryc. 51. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny na komórki linii A549 (3 godzinna inkubacja ze związkiem). (A-C) kontrola. (D-F) Komórki traktowane ikarytyną w stężeniu 30 μM . (G-I) Komórki traktowane ikarytyną w stężeniu 60 μM . Widoczne: wraz ze wzrostem stężenia związku ekspresja cykliny Y wzrasta.



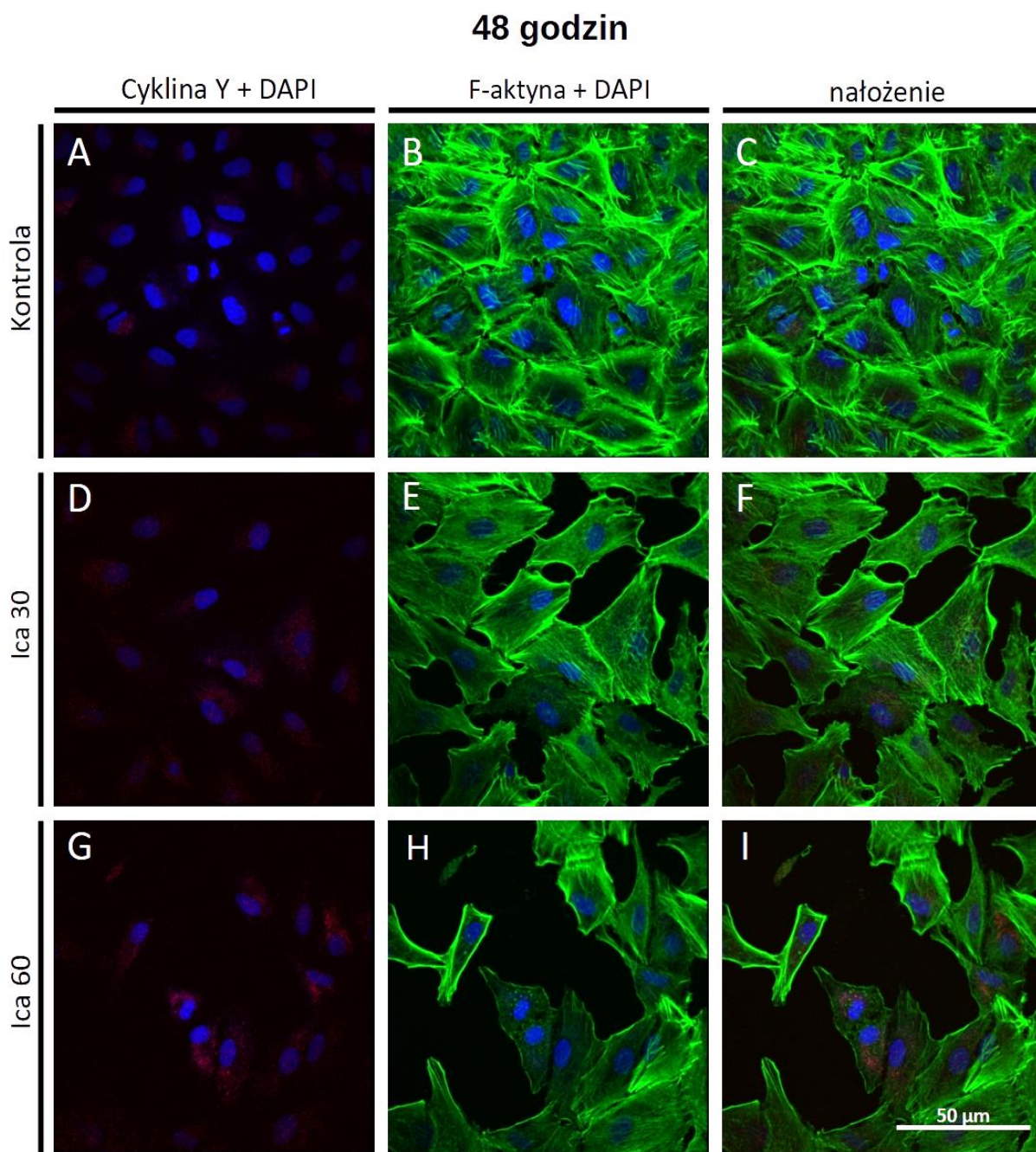
Ryc. 52. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny na komórki linii A549 (6 godzinna inkubacja ze związkiem). (A-C) kontrola. (D-F) Komórki traktowane ikarytyną w stężeniu 30 μM . (G-I) Komórki traktowane ikarytyną w stężeniu 60 μM . Widoczne: wraz ze wzrostem stężenia związku ekspresja cykliny Y wzrasta.



Ryc. 53. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny na komórki linii A549 (12 godzinna inkubacja ze związkiem). (A-C) kontrola. (D-F) Komórki traktowane ikarytyną w stężeniu 30 μM . (G-I) Komórki traktowane ikarytyną w stężeniu 60 μM . Widoczne: wraz ze wzrostem stężenia związku ekspresja cykliny Y wzrasta.



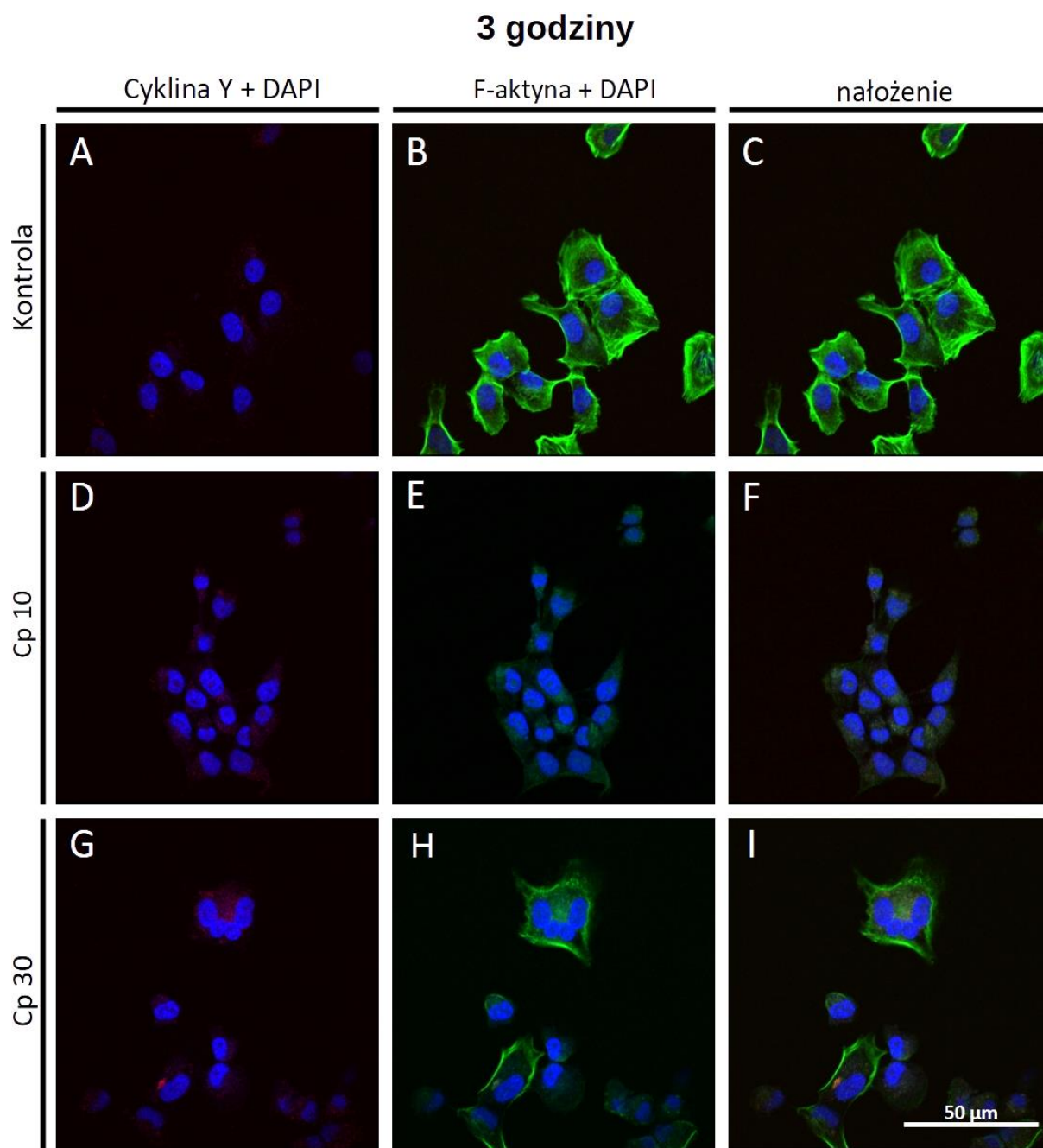
Ryc. 54. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny na komórki linii A549 (24 godzinna inkubacja ze związkiem). (A-C) kontrola. (D-F) Komórki traktowane ikarytyną w stężeniu 30 μM . (G-I) Komórki traktowane ikarytyną w stężeniu 60 μM . Widoczne: wraz ze wzrostem stężenia związku ekspresja cykliny Y wzrasta.



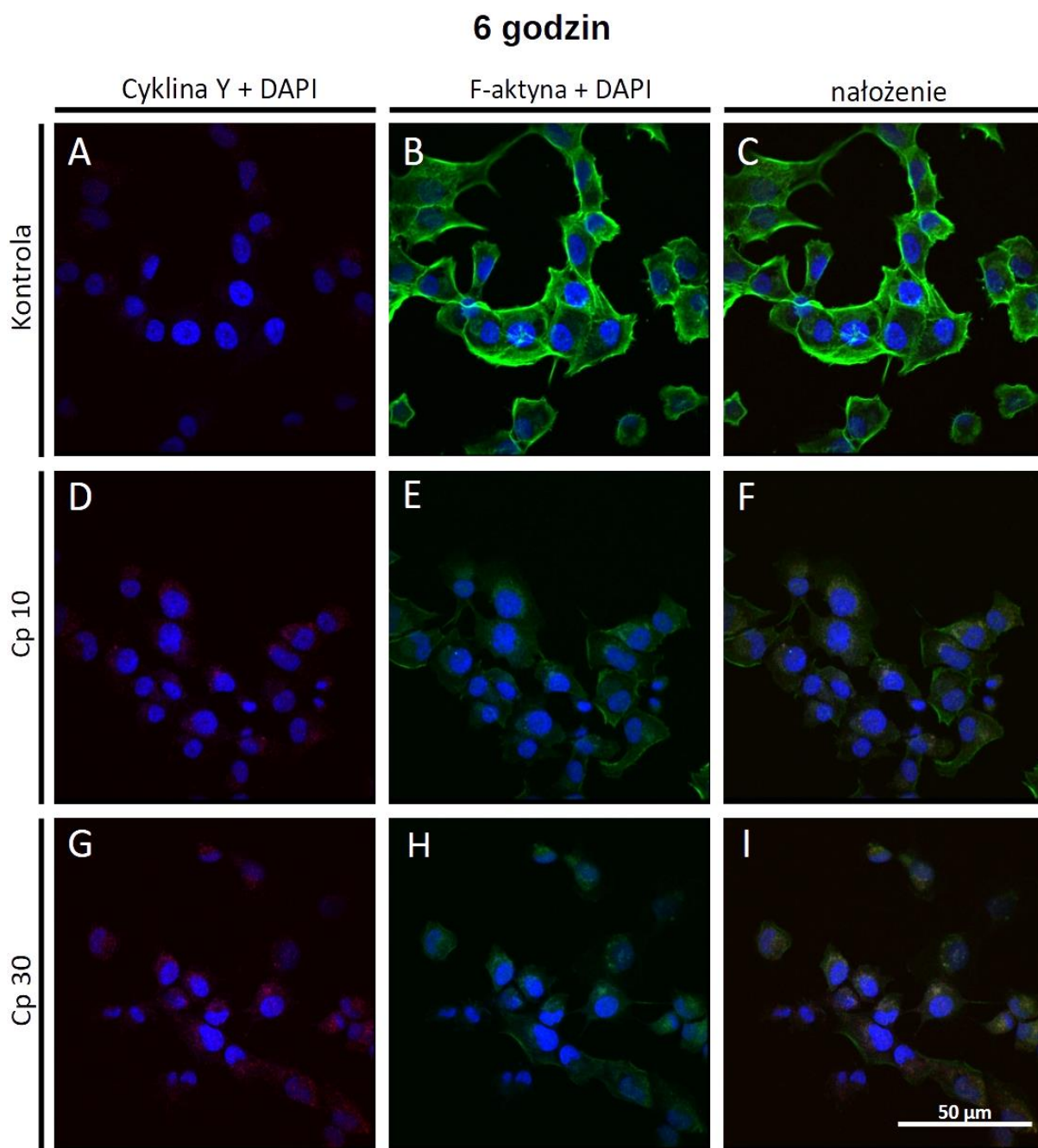
Ryc. 55. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny na komórki linii A549 (48 godzinna inkubacja ze związkiem). (A-C) kontrola. (D-F) Komórki traktowane ikarytyną w stężeniu 30 μM . (G-I) Komórki traktowane ikarytyną w stężeniu 60 μM . Widoczne: wraz ze wzrostem stężenia związku ekspresja cykliny Y wzrasta.

4.6.2.2. Komórki linii H1299

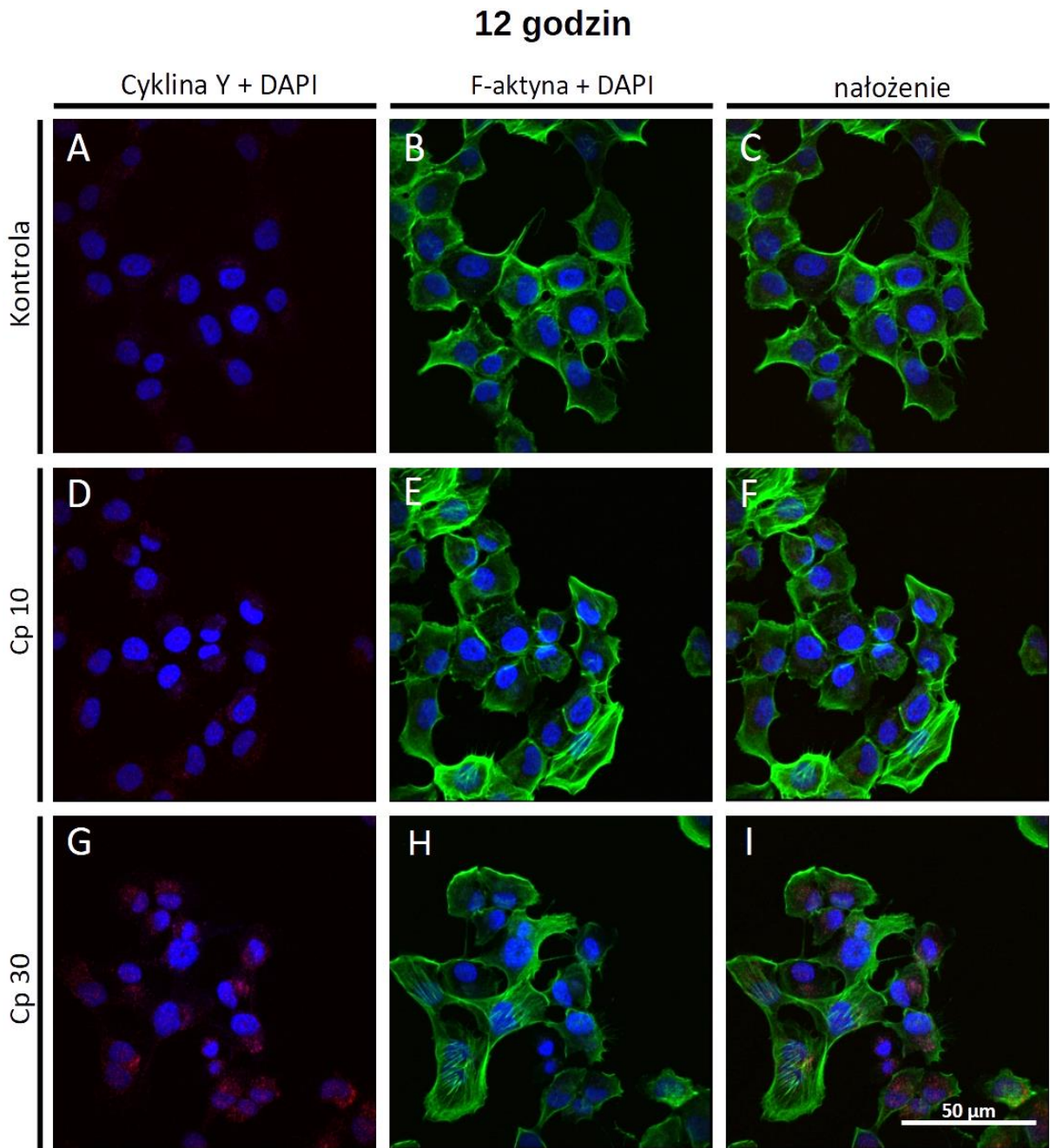
Wyniki uzyskane z barwienia immunofluorescencyjnego komórek linii H1299, tak samo jak w przypadku linii A549, wykazały wzrost ekspresji cykliny Y zależny od czasu inkubacji, a także rodzaju oraz dawki zastosowanego związku. Najniższy sygnał fluorescencji wykazywały komórki kontrolne, który nie ulegał zmianie we wszystkich punktach czasowych (ryc. 56-65). W linii H1299 lokalizacja cykliny Y również była głównie jądrowa. Wzrost ekspresji cykliny Y nastąpił już po 3 godzinie od potraktowania komórek cisplatyną i ikarytyną w najniższych stężeniach (ryc. 56; ryc. 61). Wraz z wydłużeniem czasu inkubacji zarówno z cisplatyną, jak i ikarytyną zaobserwowano wzrost ekspresji badanego białka. Najwyższy poziom ekspresji uzyskano po 48 godzinach inkubacji z cisplatyną (ryc. 60). Podczas analizy wszystkich punktów czasowych nie zaobserwowano znacznej translokacji cykliny Y z jądra komórkowego do cytoplazmy.



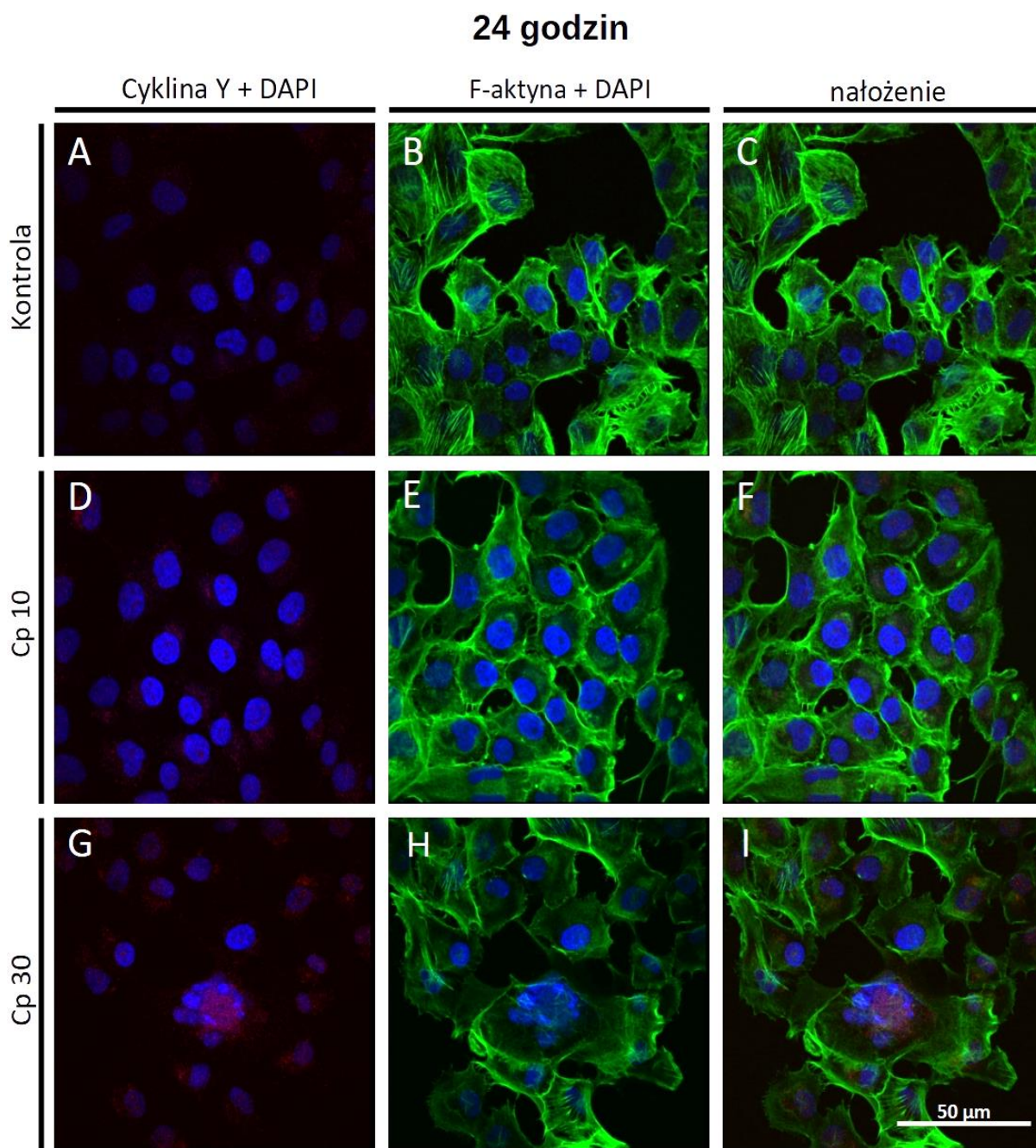
Ryc. 56. Wpływ poszczególnych dawek cisplatyny na komórki linii H1299 (3 godzinna inkubacja ze związkiem). (A-C) kontrola. (D-F) Komórki traktowane cisplatyną w stężeniu 10 μM . (G-I) Komórki traktowane cisplatyną w stężeniu 30 μM . Widoczne: wraz ze wzrostem stężenia związku ekspresja cykliny Y wzrasta.



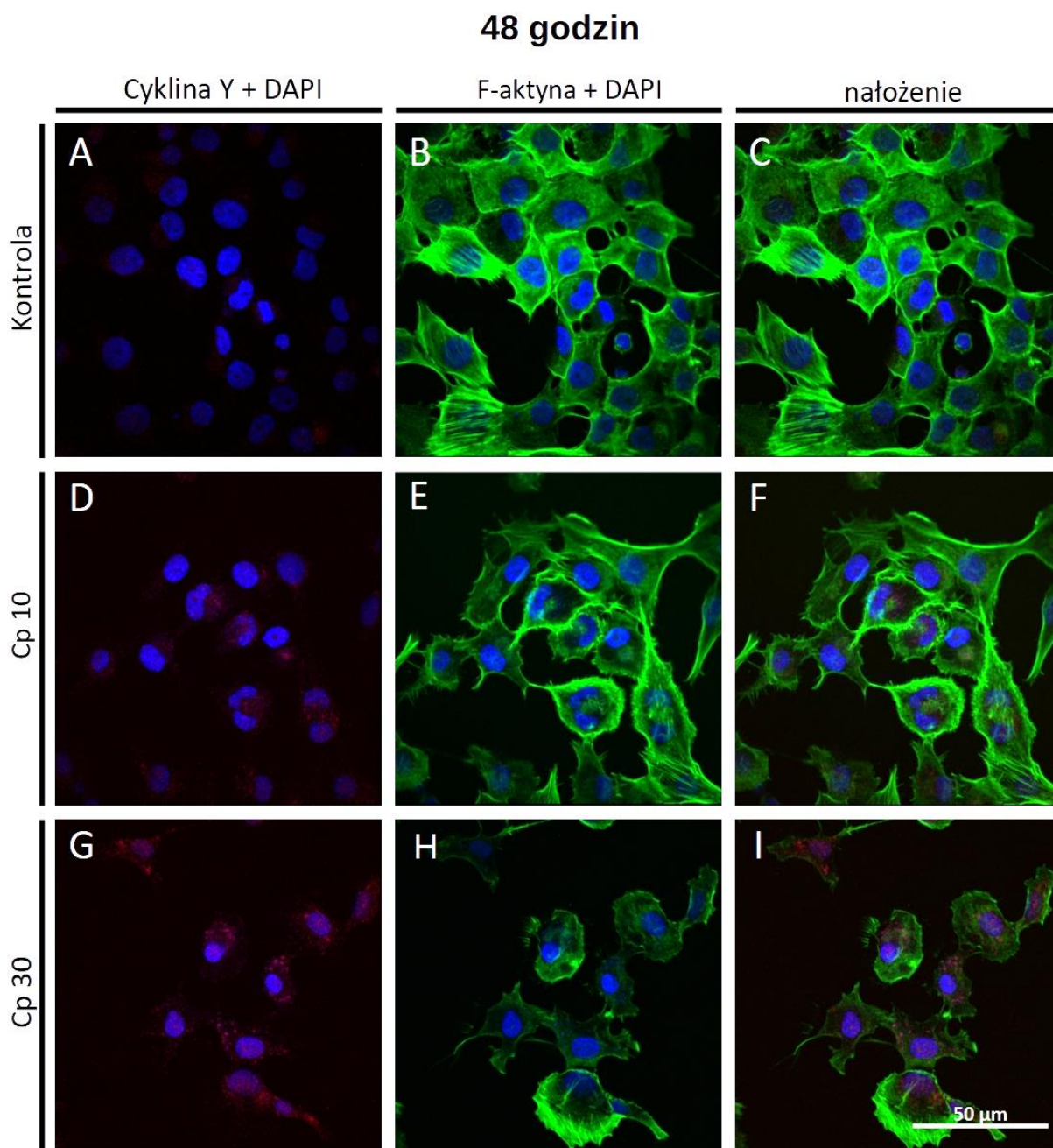
Ryc. 57. Wpływ poszczególnych dawek cisplatyny na komórki linii H1299 (6 godzinna inkubacja ze związkiem). (A-C) kontrola. (D-F) Komórki traktowane cisplatyną w stężeniu 10 μM . (G-I) Komórki traktowane cisplatyną w stężeniu 30 μM . Widoczne: wraz ze wzrostem stężenia związku ekspresja cykliny Y wzrasta.



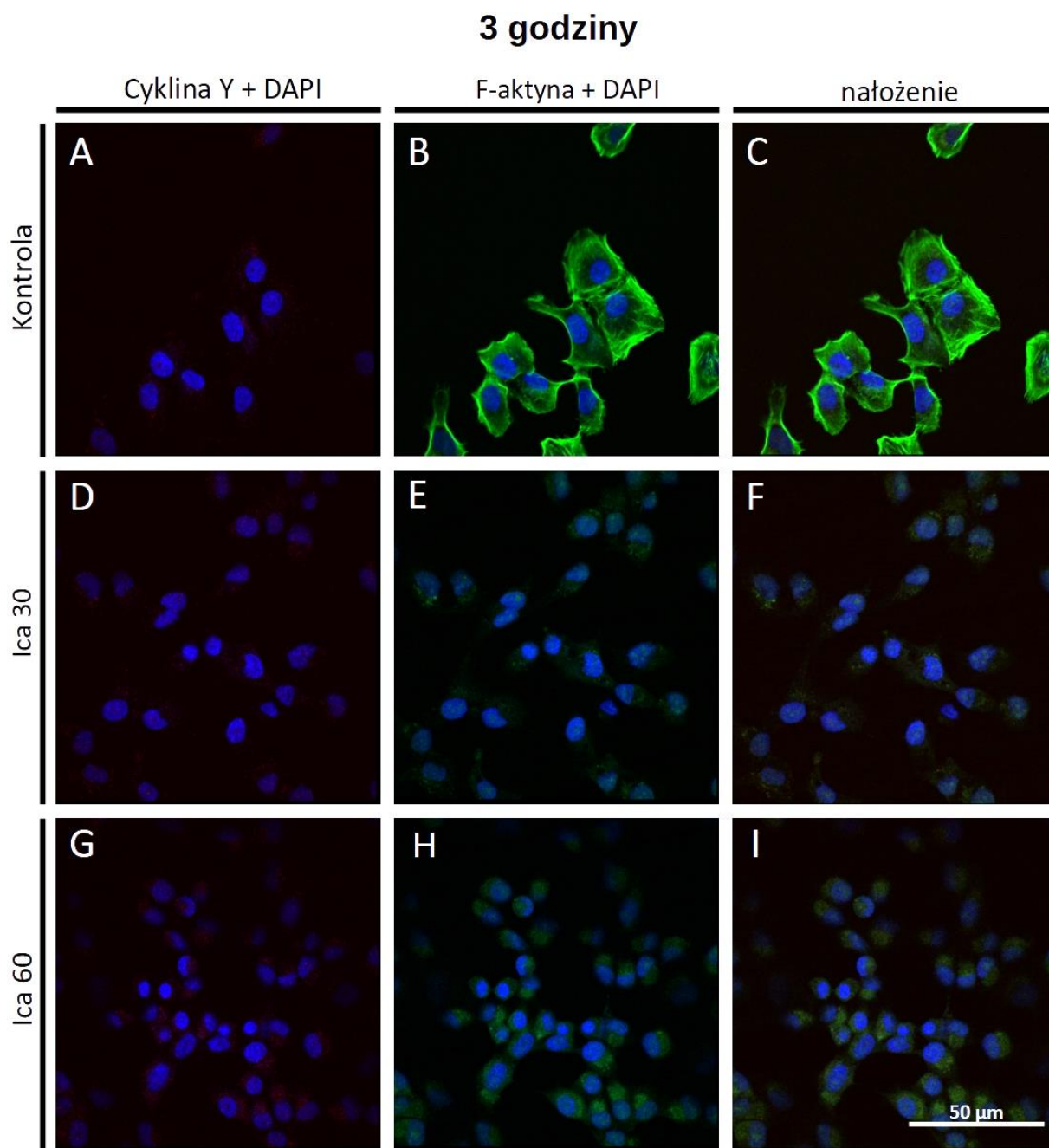
Ryc. 58. Wpływ poszczególnych dawek cisplatyny na komórki linii H1299 (12 godzinna inkubacja ze związkiem). (A-C) kontrola. (D-F) Komórki traktowane cisplatyną w stężeniu 10 μM . (G-I) Komórki traktowane cisplatyną w stężeniu 30 μM . Widoczne: wraz ze wzrostem stężenia związku ekspresja cykliny Y wzrasta.



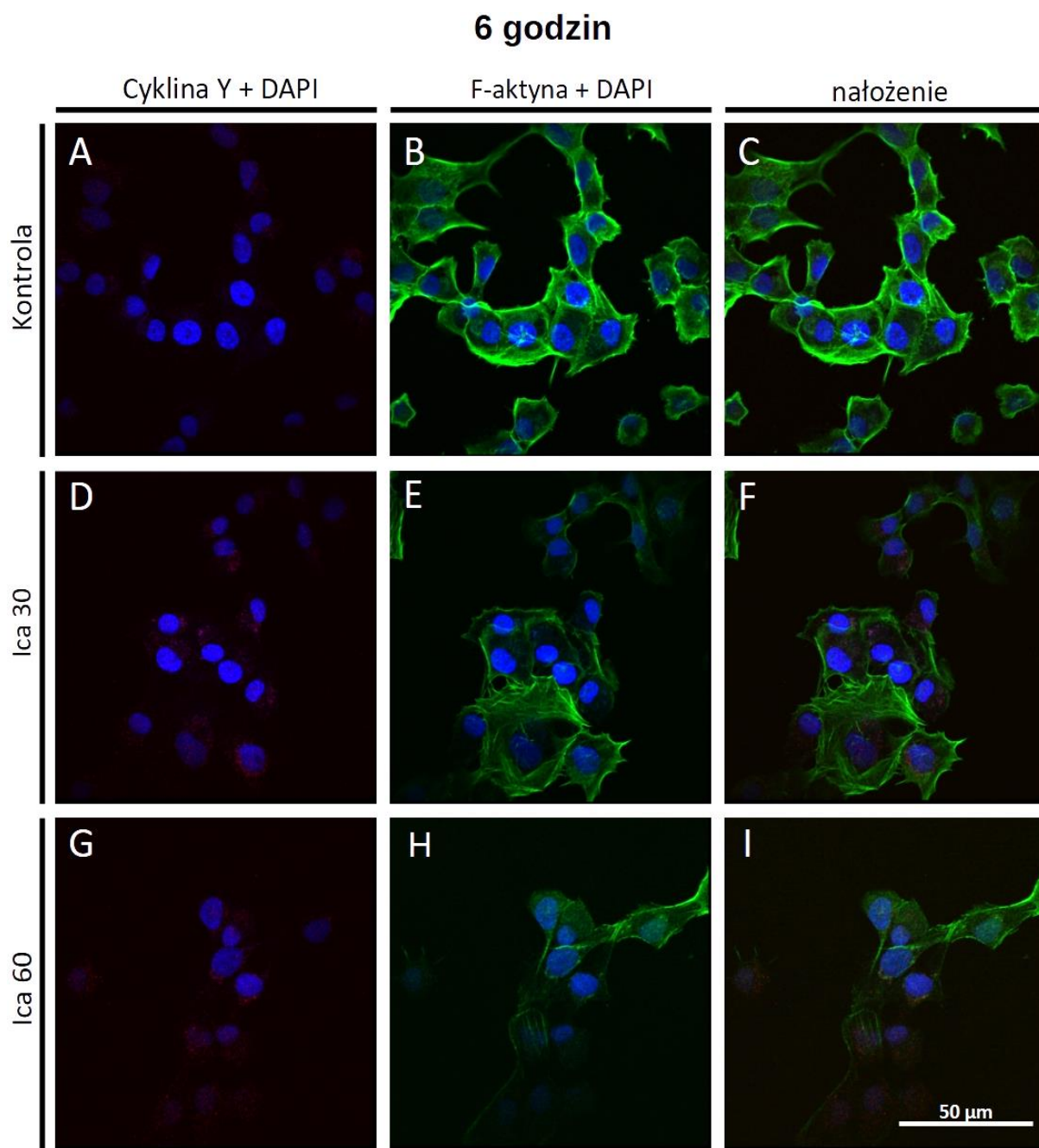
Ryc. 59. Wpływ poszczególnych dawek cisplatyny na komórki linii H1299 (24 godzinna inkubacja ze związkiem). (A-C) kontrola. (D-F) Komórki traktowane cisplatyną w stężeniu 10 μM . (G-I) Komórki traktowane cisplatyną w stężeniu 30 μM . Widoczne: wraz ze wzrostem stężenia związku ekspresja cykliny Y wzrasta.



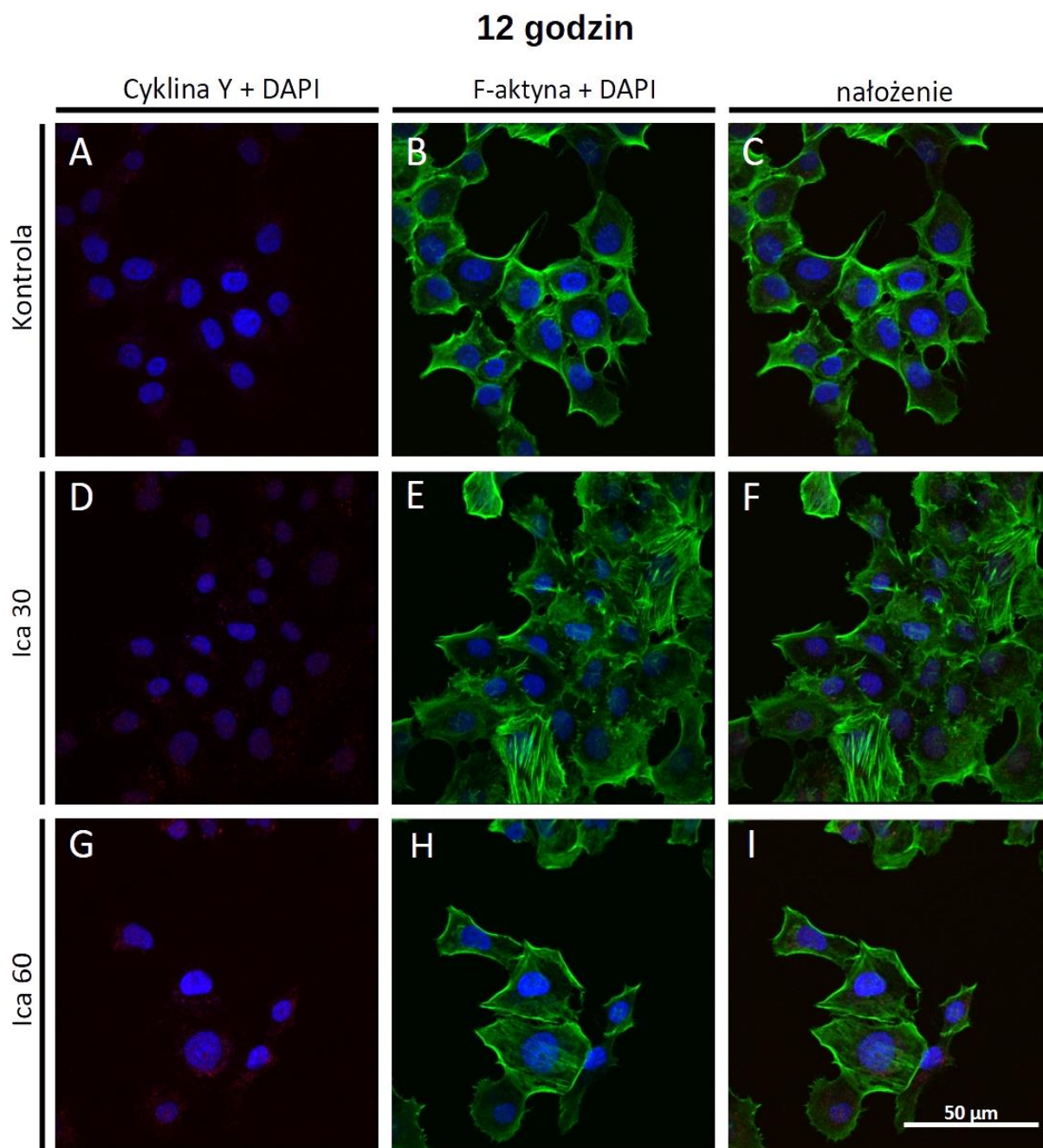
Ryc. 60. Wpływ poszczególnych dawek cisplatyny na komórki linii H1299 (48 godzinna inkubacja ze związkiem). (A-C) kontrola. (D-F) Komórki traktowane cisplatyną w stężeniu 10 μM . (G-I) Komórki traktowane cisplatyną w stężeniu 30 μM . Widoczne: wraz ze wzrostem stężenia związku ekspresja cykliny Y wzrasta.



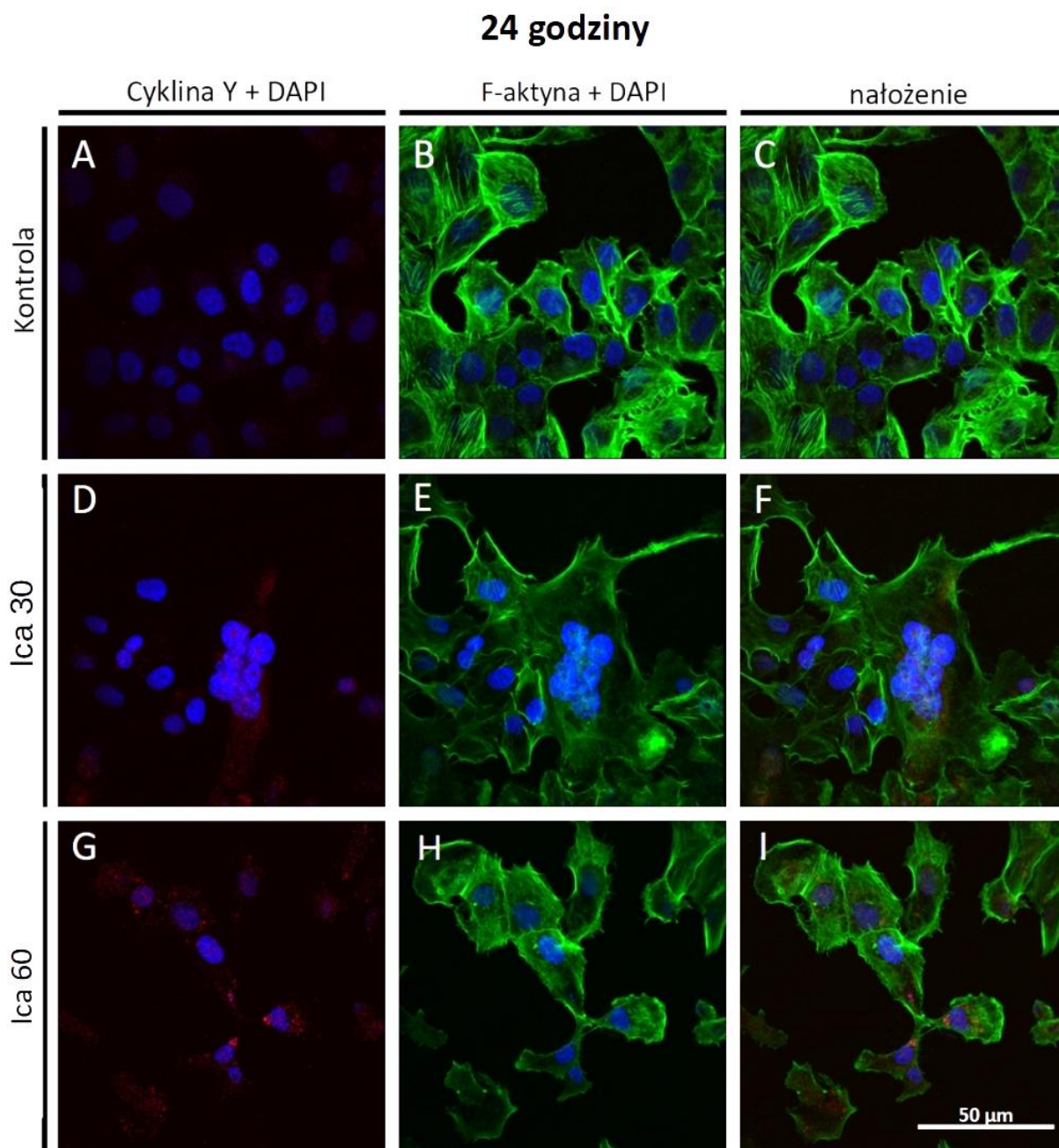
Ryc. 61. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny na komórki linii H1299 (3 godzinna inkubacja ze związkiem). (A-C) kontrola. (D-F) Komórki traktowane ikarytyną w stężeniu 30 μM . (G-I) Komórki traktowane ikarytyną w stężeniu 60 μM . Widoczne: wraz ze wzrostem stężenia związku ekspresja cykliny Y wzrasta.



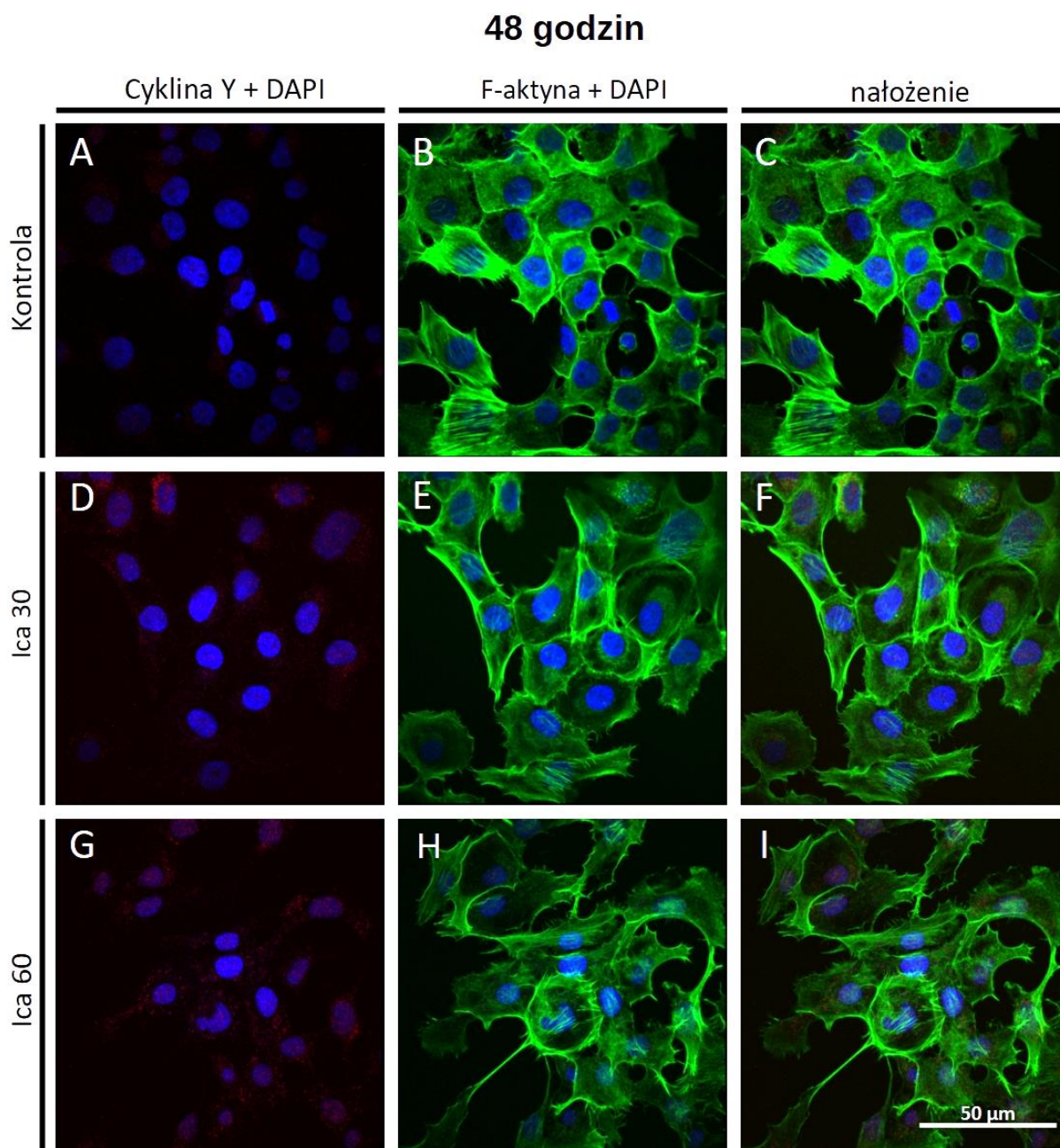
Ryc. 62. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny na komórki linii H1299 (6 godzinna inkubacja ze związkiem). (A-C) kontrola. (D-F) Komórki traktowane ikarytyną w stężeniu 30 μM . (G-I) Komórki traktowane ikarytyną w stężeniu 60 μM . Widoczne: wraz ze wzrostem stężenia związku ekspresja cykliny Y wzrasta.



Ryc. 63. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny na komórki linii H1299 (12 godzinna inkubacja ze związkiem). (A-C) kontrola. (D-F) Komórki traktowane ikarytyną w stężeniu 30 μM . (G-I) Komórki traktowane ikarytyną w stężeniu 60 μM . Widoczne: wraz ze wzrostem stężenia związku ekspresja cykliny Y wzrasta.



Ryc. 64. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny na komórki linii H1299 (24 godzinna inkubacja ze związkiem). (A-C) kontrola. (D-F) Komórki traktowane ikarytyną w stężeniu 30 μM . (G-I) Komórki traktowane ikarytyną w stężeniu 60 μM . Widoczne: wraz ze wzrostem stężenia związku ekspresja cykliny Y wzrasta.



Ryc. 65. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny na komórki linii H1299 (48 godzinna inkubacja ze związkiem). (A-C) kontrola. (D-F) Komórki traktowane ikarytyną w stężeniu 30 μM . (G-I) Komórki traktowane ikarytyną w stężeniu 60 μM . Widoczne: wraz ze wzrostem stężenia związku ekspresja cykliny Y wzrasta.

4.7. Ocena ekspresji białka RRM2 oraz β -kateniny przy użyciu metody cytometrii przepływowej

Przy użyciu metody cytometrii przepływowej zbadano również profil ekspresji innych białek tj. RRM2 (podjednostka reduktazy rybonukleotydowej M2) oraz β -kateniny.

4.7.1. Ocena ekspresji RRM2

Białko RRM2 zaangażowane jest w syntezę DNA i naprawę uszkodzeń. Odgrywa istotną rolę w wielu krytycznych procesach komórkowych, takich jak proliferacja komórek, inwazyjność, migracja i starzenie się komórek. RRM2 działa jako czynnik nowotworowy, którego nadekspresja często pojawia się w różnych nowotworach złośliwych, w tym również w raku płuca. Oceniono korelację między ekspresją RRM2, a ekspresją cykliny Y w komórkach kontrolnych oraz w komórkach traktowanych cisplatyną oraz ikarytyną obu linii niedrobnokomórkowego raka płuca.

4.7.1.1. Komórki linii A549

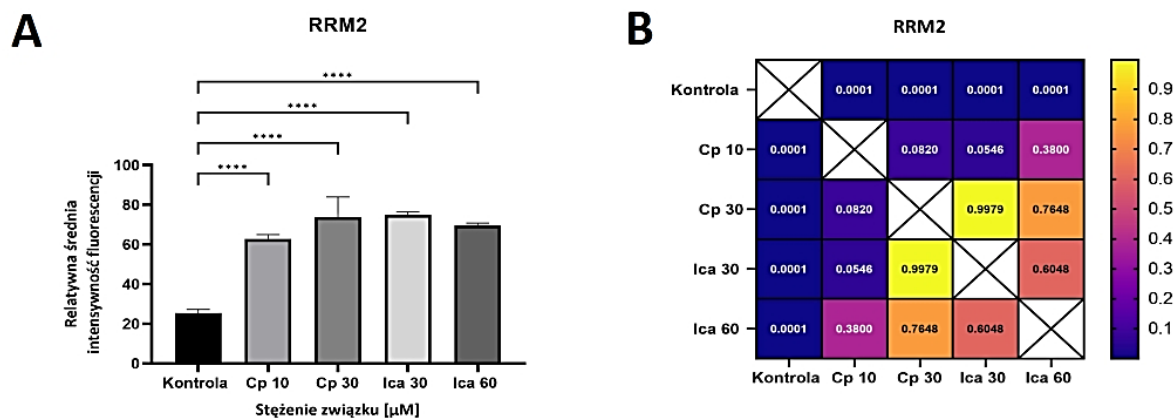
Analiza wyników cytometrii przepływowej relatywnej średniej intensywności fluorescencji białka RRM2 wykazała, że oba związki wpływają na wzrost ekspresji badanego białka, a w szczególności ikarytyna w najniższym stężeniu (tab. 21). Istotności statystyczne między kontrolą ($25,37 \pm 1,52$), a cisplatyną w stężeniu $10 \mu\text{M}$ ($62,87 \pm 1,70$) i $30 \mu\text{M}$ ($73,9 \pm 8,90$) oraz ikarytyną w stężeniu $30 \mu\text{M}$ ($74,96 \pm 1,14$) i $60 \mu\text{M}$ ($69,71 \pm 0,89$) wynoszą $P < 0,0001$ (tab. 21; wyk. 18A/18B).

Stężenie związku [μM]	Relatywna średnia intensywność fluorescencji
K	$25,37 \pm 1,52$
Cp 10	$62,87 \pm 1,70$
Cp 30	$73,9 \pm 8,90$
Ica 30	$74,96 \pm 1,14$
Ica 60	$69,71 \pm 0,89$

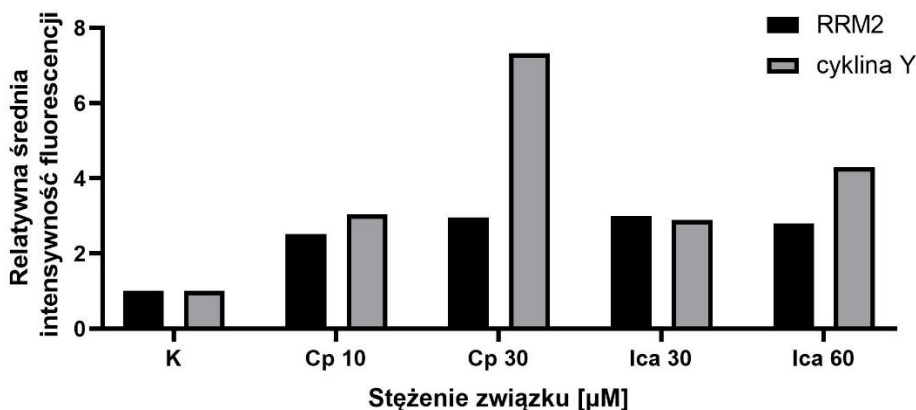
Tab. 21. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na ekspresję RRM2 w komórkach linii A549. Wyniki poszczególnych grup przedstawiono w postaci średnich \pm odchylenie standardowe.

W przypadku analizy istotności statystycznych relatywnej średniej intensywności fluorescencji białka RRM2 między poszczególnymi dawkami cisplatyny i ikarytyny najmniejszą różnicę można zauważyć, między najwyższym stężeniem cisplatyny i najniższym ikarytyny,

gdzie występuje brak istotności statystycznej ($P=0,9979$), a także między dawką 30 μM cisplatyny i 60 μM ikarytyny, gdzie $P=0,7648$ (wyk. 18A/18B).



Wyk. 18. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na ekspresję RRM2 w komórkach linii A549. (A) Relatywna średnia intensywność fluorescencji RRM2. (B) Relatywna średnia intensywność fluorescencji RRM2 – heat mapa istotności statystycznych. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA na poziomie istotności, gdzie **** - $P \leq 0,0001$. Na podstawie minimum 3 niezależnych doświadczeń.



Wyk. 19. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na ekspresję cykliny Y oraz RRM2 w komórkach linii A549.

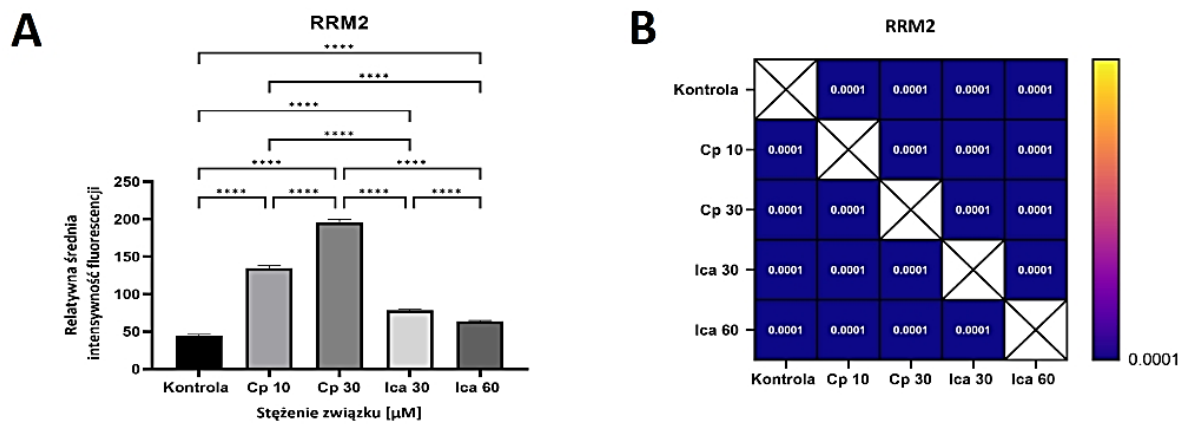
W linii A549 ekspresja RRM2 oraz cykliny Y wzrasta po traktowaniu komórek związkami indukującymi śmierć komórki. Zarówno w przypadku cykliny Y, jak i RRM2, występuje wzrost ekspresji badanych białek zależny od rodzaju i stężenia użytego związku (wyk. 19).

4.7.1.2. Komórki linii H1299

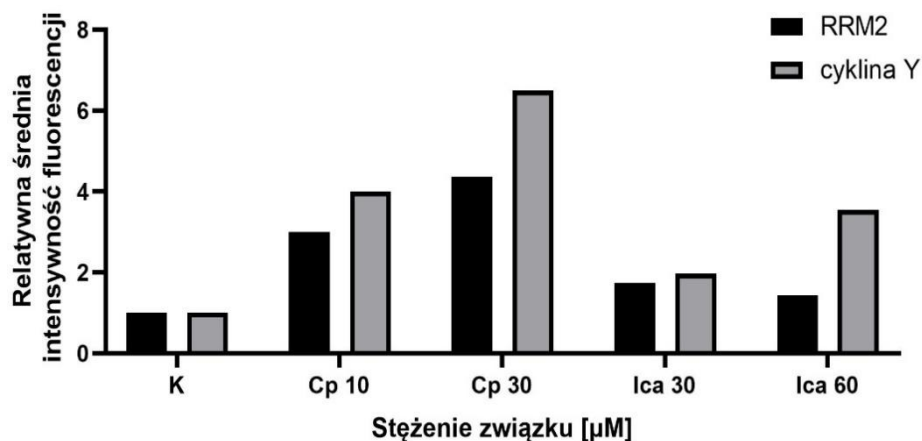
Ocena relatywnej średniej intensywności fluorescencji RRM2 w linii H1299 wykazała zmiany w ekspresji badanego białka. W przypadku grupy komórek traktowanych cisplatyną zauważalne było, że poziom intensywności wzrastał wraz ze wzrostem stężenia związku. Odwrotną tendencję obserwowano po zastosowaniu ikarytyny. Wyniki cytometryczne dla grupy kontrolnej wynosiły $44,75 \pm 1,35$, natomiast dla pierwszej i drugiej dawki cisplatyny wynosiły odpowiednio $135,16 \pm 2,41$ oraz $195,77 \pm 2,99$. W przypadku ikarytyny relatywna średnia intensywność fluorescencji dla niższej dawki wynosiła $78,46 \pm 0,93$, a dla wyższej dawki - $64,15 \pm 0,76$ (tab. 22). Istotność statystyczna między kontrolą, a dawkami cisplatyny, ale również między samymi dawkami wynosiła $P < 0,0001$ (wyk. 20A/20B). Po zastosowaniu ikarytyny wzrost ekspresji RRM2 nie był tak wysoki w linii A549, jak w przypadku komórek linii H1299. Istotność statystyczna, gdzie $P < 0,0001$, występowała między grupą kontrolną ($44,75 \pm 1,35$), a grupą komórek traktowanych ikarytyną w stężeniu 30 i 60 μM . Istotnie statystyczne różnice między dawkami cisplatyny i ikarytyny wynosiły $P < 0,0001$ (tab. 22; wyk. 20A/20B). Przedstawione wyniki zmian w poziomie ekspresji białka RRM2 wykazują 3-4,36-krotnie wyższe wartości w przypadku pomiarów intensywności fluorescencji po traktowaniu komórek cisplatyną w porównaniu z kontrolą. Natomiast w przypadku ikarytyny wyniki są 1,44-1,74-krotnie wyższe.

Stężenie związku [μM]	Relatywna średnia intensywność fluorescencji
K	$44,75 \pm 1,35$
Cp 10	$135,16 \pm 2,41$
Cp 30	$195,77 \pm 2,99$
Ica 30	$78,46 \pm 0,93$
Ica 60	$64,15 \pm 0,76$

Tab. 22. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na ekspresję RRM2 w komórkach linii H1299. Wyniki poszczególnych grup przedstawiono w postaci średnich \pm odchylenie standardowe.



Wyk. 20. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na ekspresję RRM2 w komórkach linii H1299. (A) Relatywna średnia intensywność fluorescencji RRM2. (B) Relatywna średnia intensywność fluorescencji RRM2 – heat mapa istotności statystycznych. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA na poziomie istotności, gdzie **** - $P \leq 0,0001$. Na podstawie minimum 3 niezależnych doświadczeń.



Wyk. 21. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na ekspresję cykliny Y oraz RRM2 w komórkach linii H1299. Wykres przedstawia zależności ekspresji cykliny Y i RRM2.

Analiza relatywnej średniej intensywności fluorescencji cykliny Y oraz RRM2 wykazuje, że ekspresja RRM2 koreluje z poziomem cykliny Y w grupach komórek traktowanych wybranymi stężeniami cisplatyny i ikarytyny w linii komórkowej H1299. Ekspresja badanych białek osiąga maksimum w grupie komórek traktowanych cisplatyną w stężeniu 30 μM (wyk. 21).

4.7.2. Ocena ekspresji β -kateniny

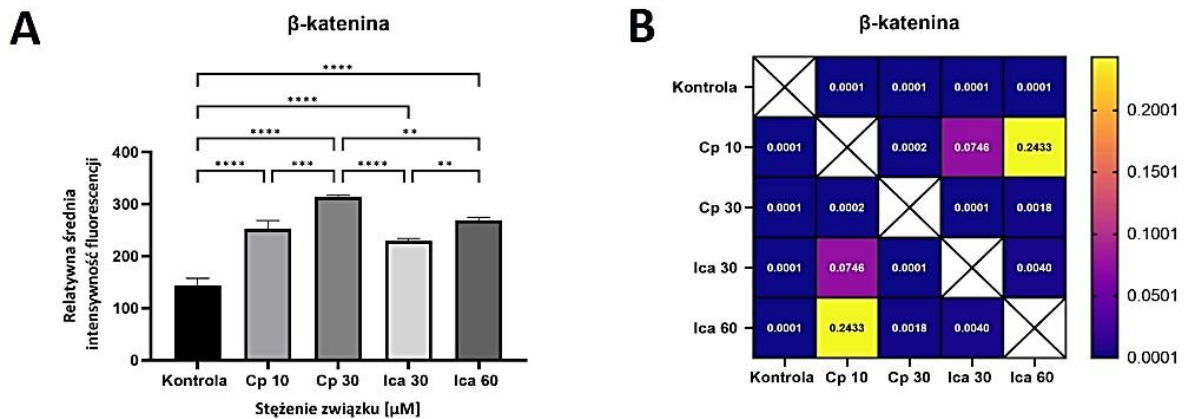
β -katenina jest wielofunkcyjnym białkiem odgrywającym kluczową rolę w homeostazie fizjologicznej. Jego nieprawidłowa ekspresja prowadzi do rozwoju różnych chorób, w tym raka. β -katenina bierze udział w szlaku sygnalizacji Wnt, w którym istotną rolę odgrywa również cyklina Y. Przy użyciu metody cytometrycznej oceniono korelację między ekspresją β -kateniny i cykliny Y w linii A549 oraz H1299.

4.7.2.1. Komórki linii A549

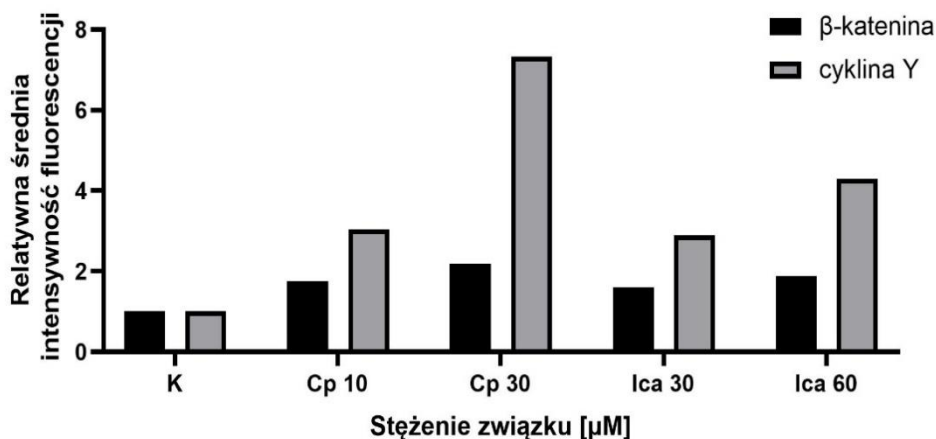
W gruczolakoraku płuca linii A549 relatywna średnia intensywność fluorescencji β -kateniny w grupie komórek kontrolnych wynosiła $143,64 \pm 11,24$ oraz odpowiednio $252,12 \pm 13,35$; $313,88 \pm 2,86$; $229,07 \pm 4,28$; $268,76 \pm 4,85$ dla grup komórek traktowanych cisplatyną w stężeniu $10 \mu\text{M}$ i $30 \mu\text{M}$, a także ikarytyną w stężeniu $30 \mu\text{M}$ i $60 \mu\text{M}$ (tab. 23). Istotność statystyczna między kontrolą, a poszczególnymi dawkami związków wynosiła $P < 0,0001$ (wyk. 22). Analiza statystyczna wyników cytometrycznych między dawkami użytych w badaniach związków wykazała mniejszą istotność statystyczną między cisplatyną $10 \mu\text{M}$, a ikarytyną $30 \mu\text{M}$ ($P = 0,0746$) oraz między cisplatyną $10 \mu\text{M}$, a ikarytyną $60 \mu\text{M}$ ($P = 0,2433$) (wyk. 22). Największy wzrost intensywności fluorescencji (2,18-krotny) obserwowany jest po zastosowaniu najwyższej dawki cisplatyny.

Stężenie związku [μM]	Relatywna średnia intensywność fluorescencji
K	$143,64 \pm 11,24$
Cp 10	$252,12 \pm 13,35$
Cp 30	$313,88 \pm 2,86$
Ica 30	$229,07 \pm 4,28$
Ica 60	$268,76 \pm 4,85$

Tab. 23. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na ekspresję β -kateniny w komórkach linii A549. Wyniki poszczególnych grup przedstawiono w postaci średnich \pm odchylenie standardowe.



Wyk. 22. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na ekspresję β-keniny w komórkach linii A549. (A) Relatywna średnia intensywność fluorescencji β-keniny. (B) Relatywna średnia intensywność fluorescencji β-keniny – heat mapa istotności statystycznych. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA na poziomie istotności, gdzie **** - $P \leq 0,0001$; *** - $P \leq 0,001$; ** - $P \leq 0,01$. Na podstawie minimum 3 niezależnych doświadczeń.



Wyk. 23. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na ekspresję cykliny Y oraz β-keniny w komórkach linii A549. Wykres przedstawia zależności ekspresji cykliny Y i β-keniny.

Analiza wykresu zależności ekspresji cykliny Y i β-keniny w linii A549 traktowanej cisplatyną oraz ikarytyną pokazuje, że zarówno cyklina Y, jak i β-kenin wykazują dawkozależny wzrost ekspresji względem zastosowanych związków. Zastosowanie obu stężeń cisplatyny i ikarytyny powodowało wzrost ekspresji analizowanych białek. Najwyższy poziom ekspresji obu białek przypadku wykazano po traktowaniu komórek cisplatyną w stężeniu 30 μM (wyk. 23).

4.7.2.2. Komórki linii H1299

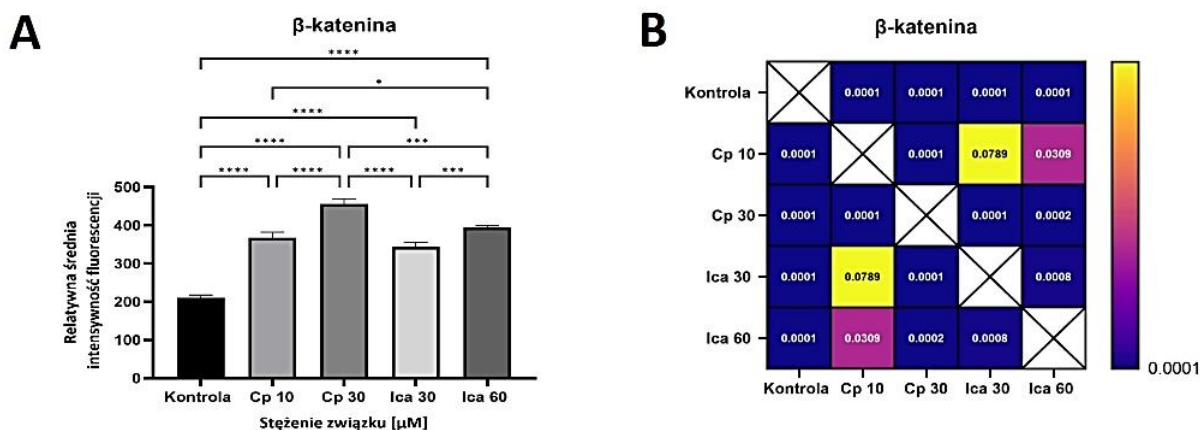
Ocena intensywności fluorescencji β -kateniny w komórkach linii H1299 wykazała jej statystycznie istotny wzrost pomiędzy grupą kontrolną komórek ($210,54 \pm 5,73$), a grupami komórek traktowanymi obiema dawkami cisplatyny i ikarytyny, które wynosiły odpowiednio $367,15 \pm 12,42$; $456,04 \pm 10,62$; $344,41 \pm 9,15$ oraz $394,92 \pm 4,26$, gdzie $P < 0,0001$ (tab. 24; wyk. 24A/24B).

Stężenie związku [μM]	Relatywna średnia intensywność fluorescencji
K	$210,54 \pm 5,73$
Cp 10	$367,15 \pm 12,42$
Cp 30	$456,04 \pm 10,62$
Ica 30	$344,41 \pm 9,15$
Ica 60	$394,92 \pm 4,26$

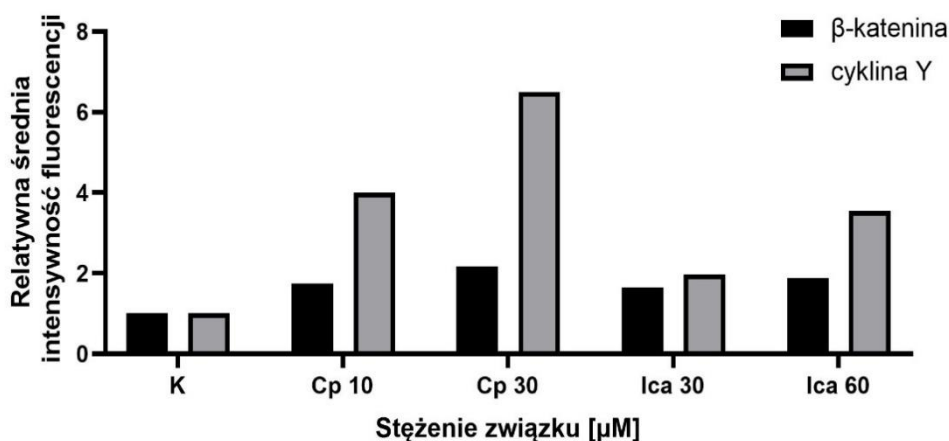
Tab. 24. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na ekspresję β -kateniny w komórkach linii H1299. Wyniki poszczególnych grup przedstawiono w postaci średnich \pm odchylenie standardowe.

Analiza wartości relatywnej średniej intensywności fluorescencji między dawkami cisplatyny oraz ikarytyny wykazała, jej statystycznie istotny wzrost, gdzie $P < 0,0001$, porównując grupę komórek traktowanych cisplatyną $30 \mu\text{M}$ z grupą komórek traktowaną ikarytyną w stężeniu $30 \mu\text{M}$ oraz pomiędzy dawkami cisplatyny. Jednakże, różnice w intensywności fluorescencji nie były już tak znaczne w zestawieniu grupy komórek traktowanych cisplatyną w stężeniu $10 \mu\text{M}$ z najwyższą dawką ikarytyny ($P=0,0309$) (wyk. 24A/24B).

Wyniki intensywności fluorescencji β -kateniny w linii A549 oraz w linii H1299 są analogiczne i potwierdzają dawkozależny wpływ związku platyny i ikarytyny stosowanych w niniejszej pracy na ekspresję badanego białka.



Wyk. 24. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na ekspresję β -kateniny w komórkach linii H1299. (A) Relatywna średnia intensywność fluorescencji β -kateniny. (B) Relatywna średnia intensywność fluorescencji β -kateniny – heat mapa istotności statystycznych. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA na poziomie istotności, gdzie **** - $P \leq 0,0001$; *** - $P \leq 0,001$; * - $P \leq 0,05$. Na podstawie minimum 3 niezależnych doświadczeń.

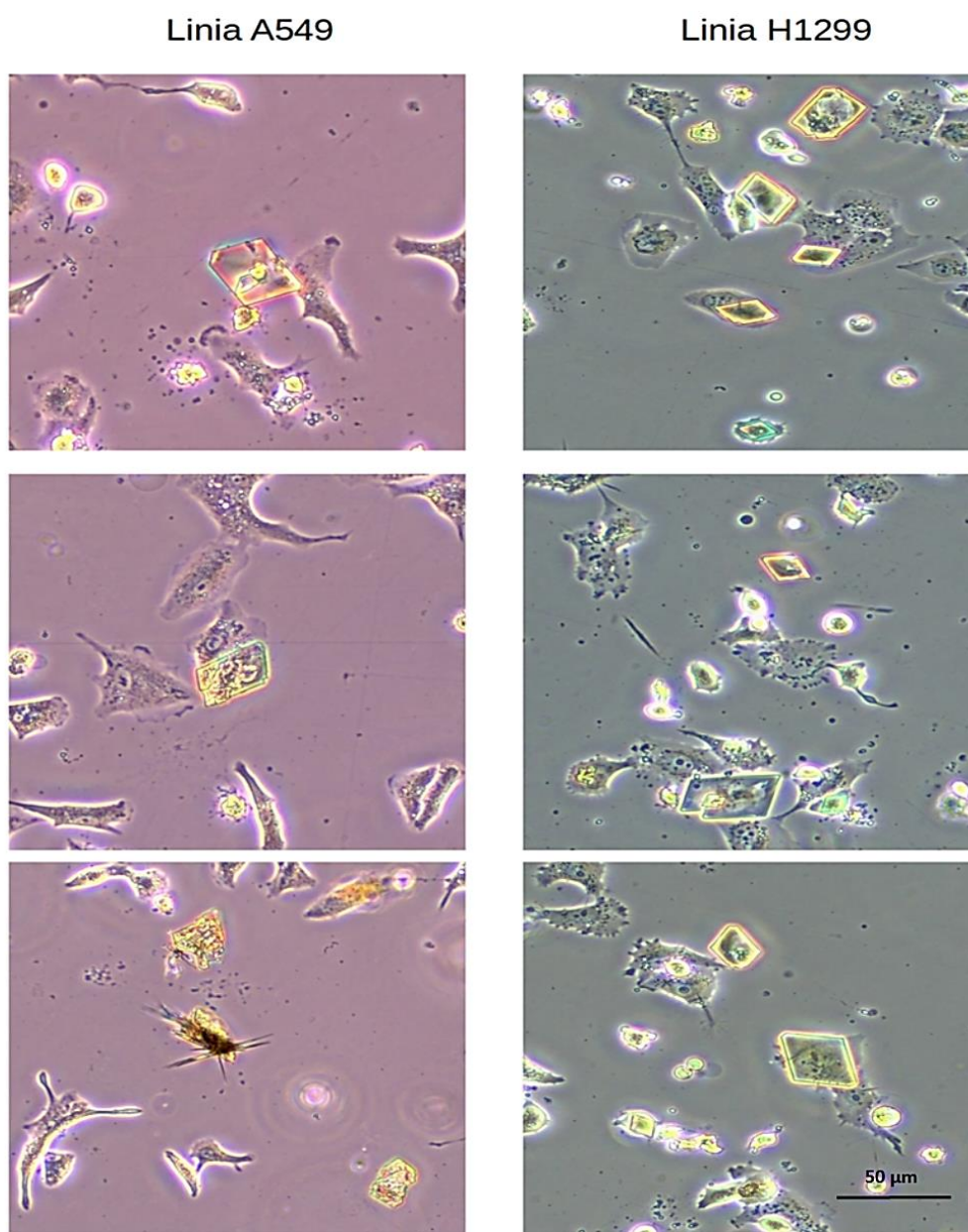


Wyk. 25. Wpływ poszczególnych dawek ikarytyny i cisplatyny na ekspresję cykliny Y oraz β -kateniny w komórkach linii H1299. Wykres przedstawia zależności ekspresji cykliny Y i β -kateniny.

Analiza porównawcza ekspresji cykliny Y i β -kateniny w linii H1299, tak samo jak w przypadku linii A549, wykazała dawkozależny wpływ obu cytostatyków na relatywną średnią intensywność fluorescencji białek. Wykazano korelację pomiędzy wzrostem cykliny Y, a β -kateniny po zastosowaniu związków indukujących śmierć komórki. Adekwatnie do wyników w linii A549 najwyższy poziom ekspresji obu białek przypada na grupę komórek traktowanych cisplatyną w stężeniu 30 μ M w linii H1299 (wyk. 25).

4.8. Kryształy ikarytyny

W trakcie wykonywania badań do niniejszej rozprawy doktorskiej już na etapie hodowli komórkowej, a dokładniej podczas 48 godzinnej inkubacji komórek obu linii z ikarytyną, zauważono tworzenie się „kryształów” (ryc. 66). Powstawanie kryształów w większej ilości oraz o bardziej równomiernym kształcie przypominającym romb zauważalne było w linii H1299.



Ryc. 66. Komórki linii A549 i H1299 traktowane 60 μM ikarytyny w trakcie 48 godzinnej inkubacji. Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu świetlnego z kamerą OLYMPUS oraz aplikacji EPview™.

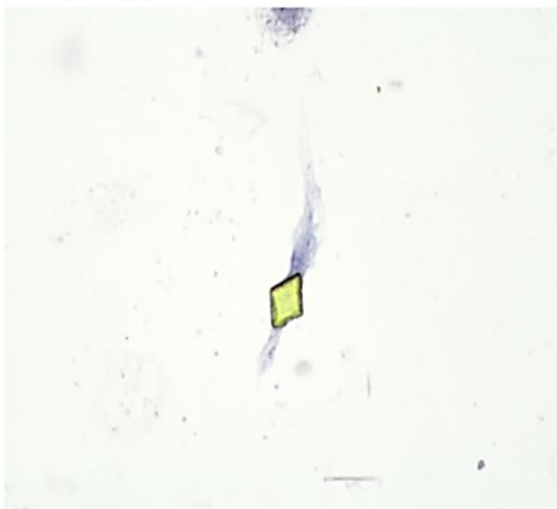
W celu oceny pochodzenia kryształów oraz ich wpływu na wyniki innych testów wykonano kilka dodatkowych badań:

1. Ocena spektrofotometryczna ikarytyny rozpuszczonej w DMSO.
2. Wybarwienie komórek obu linii (po 48 godzinach inkubacji z ikarytyną w stężeniu 60 μM) hematoksyliną i eozyną, a następnie ocena przy użyciu mikroskopu świetlnego oraz mikroskopu polaryzacyjnego.
3. Obserwacja medium hodowlanego bez dodatku ikarytyny oraz z dodatkiem ikarytyny w stężeniu 30 i 60 μM przez 48 godzin przy użyciu mikroskopu kontrastowo-fazowego.
4. Obserwacja komórek linii A549 i H1299 traktowanych ikarytyną w stężeniu 60 μM przez 48 godzin przy użyciu mikroskopu kontrastowo-fazowego.

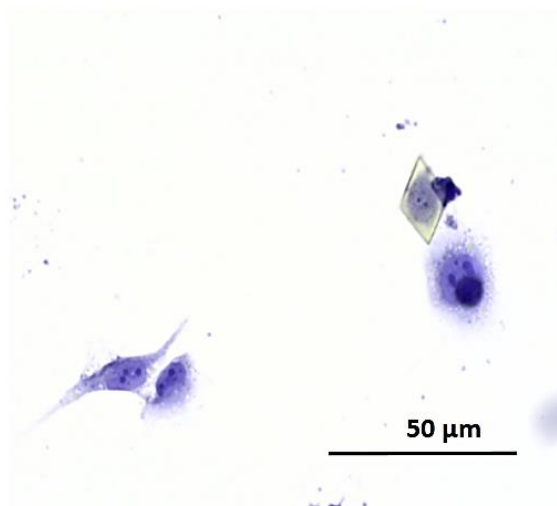
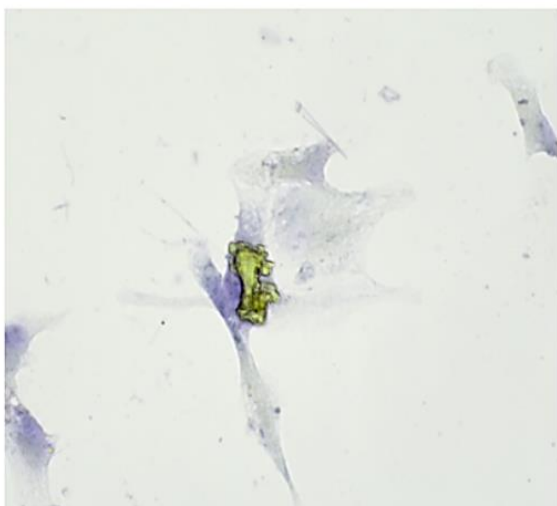
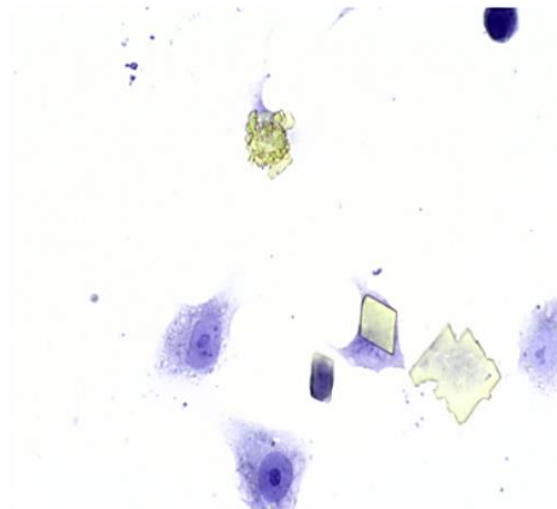
Ocena wykonanych badań dodatkowych dostarczyła następujących informacji:

1. Analiza spektrofotometryczna ikarytyny, wykonana została w celu oceny wpływu związku na intensywność światła przepuszczonego. Badanie wykonano przy długości fali 570 nm (długość fali stosowana w teście MTT). Używana w niniejszej pracy ikarytyna zakupiona została w postaci proszku i rozpuszczona w DMSO, według zaleceń producenta (5mg/ml). Na płytkę 96-dołkową do jednego dołka dodano 100 μl rozpuszczonej ikarytyny, natomiast do drugiego dołka 100 μl czystego DMSO jako próba ślepa „blank”. Przeprowadzone badanie wykazało, że w obu pomiarach ikarytyna nie wpływała na intensywność światła przepuszczonego.
2. Wybarwienie komórek hematoksyliną oraz eozyną obu linii komórkowych traktowanych ikarytyną w stężeniu 60 μM i obserwacja wyników przy użyciu mikroskopu świetlnego, wykazała powstawanie żółto-zielonych kryształów (ryc. 67). Kryształy powstawały zawsze w obrębie komórki, dlatego nie jest jednoznaczne czy budowały się one w komórce np. w siateczce śródplazmatycznej, czy na jej powierzchni.

Linia A549

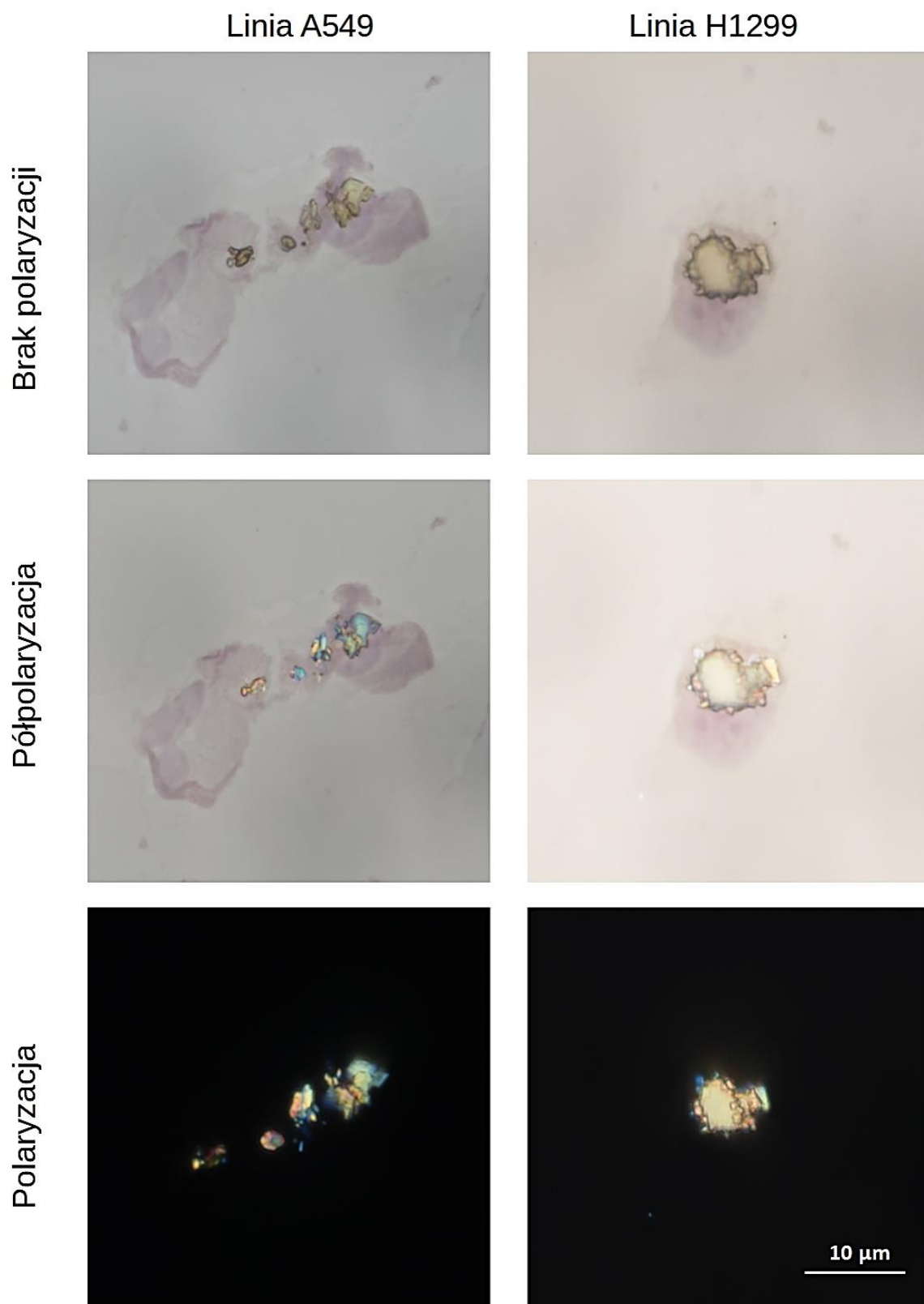


Linia H1299



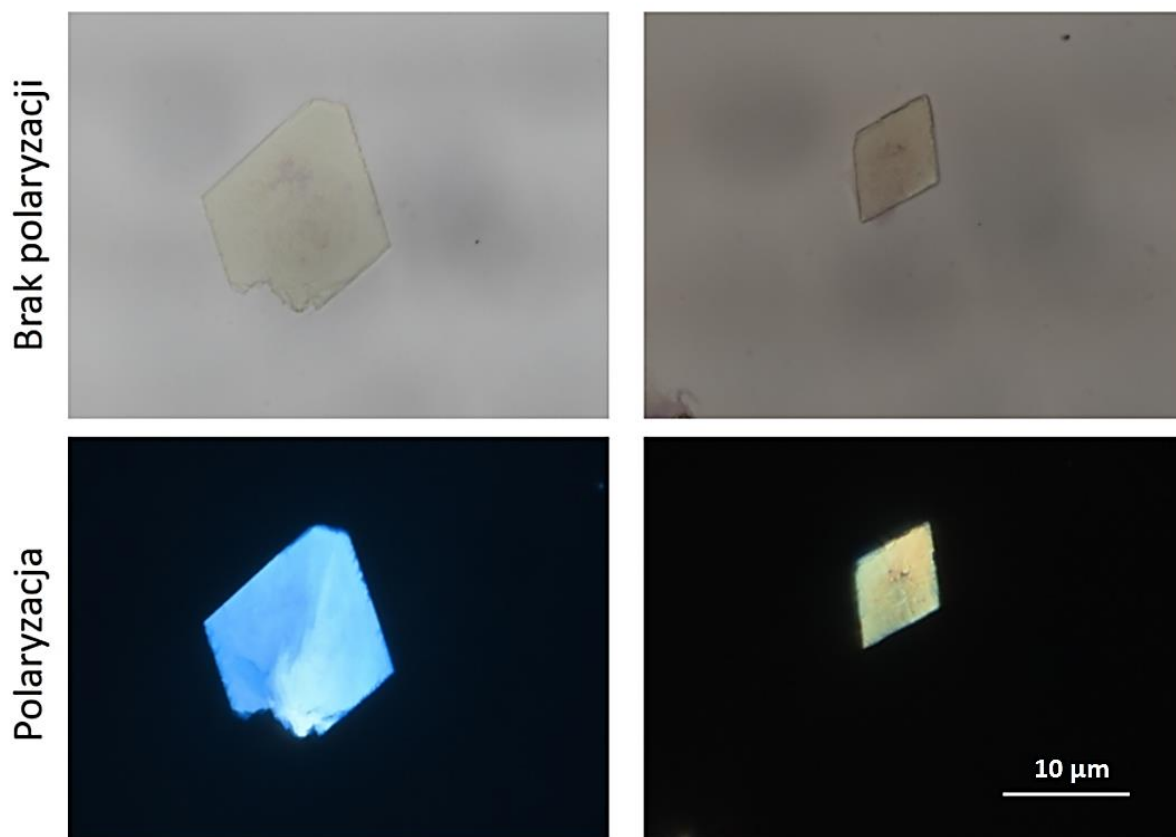
Ryc. 67. Komórki linii A549 i H1299 traktowane 60 μM ikarytyny wybarwione hematoksyliną oraz eozyną. Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu świetlnego z kamerą OLYMPUS oraz aplikacji EPview™.

Przy użyciu mikroskopu polaryzacyjnego wykonano zdjęcia w trzech różnych ustawieniach tj. zdjęcia bez polaryzacji, przy użyciu półpolaryzacji oraz przy użyciu pełnej polaryzacji. Analiza wyników wykazała świecenie kryształów, co świadczy o ich nieorganicznym charakterze i jednoznacznie sugeruje ich pochodzenie jako kryształy ikarytyny (ryc. 68; 69).



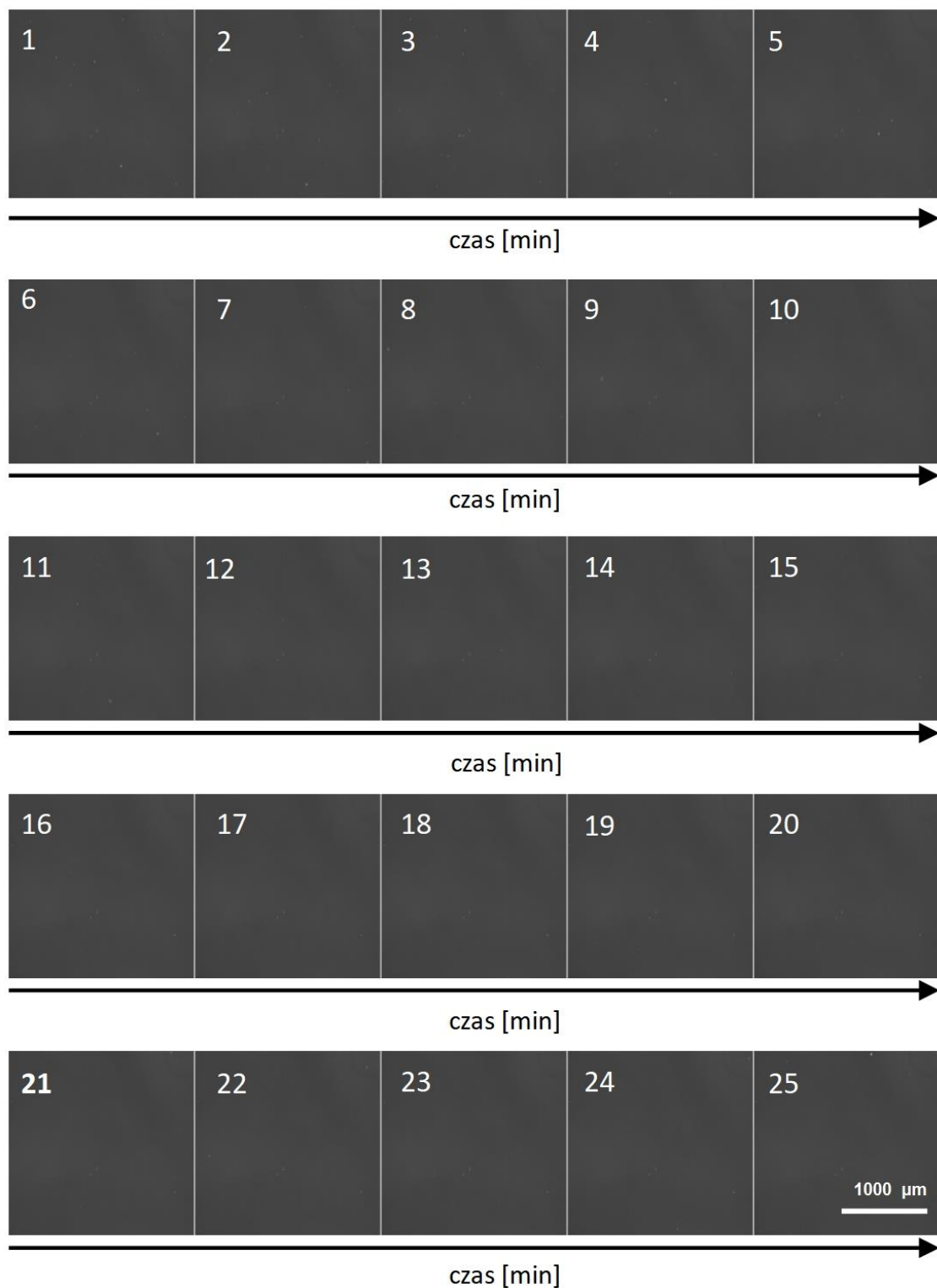
Ryc. 68. Komórki linii A549 i H1299 traktowane 60 μ M ikarytyny wybarwione hematoksyliną oraz eozyną. Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu polaryzacyjnego z zastosowaniem systemu komputerowej analizy obrazu, w oparciu o program NIS-elements 4.00 i kamerę CCD (DS.-5Mc-U, Nikon).

H1299



Ryc. 69. Powstałe kryształy ivermektyny w komórkach linii H1299. Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu polaryzacyjnego z zastosowaniem systemu komputerowej analizy obrazu, w oparciu o program NIS-elements 4.00 i kamerę CCD (DS.-5Mc-U, Nikon).

3. Obserwacja pełnego medium do hodowli komórek (tj. DMEM dla linii A549 oraz RPMI 1640 dla linii H1299; oba z 10% FBS, antybiotykami oraz L-glutaminą) oraz pełne medium z dodatkiem ivermektyny w stężeniu 30 i 60 μM wykorzystywanych w pozostałych badaniach przez 48 godzin przy użyciu przyżyciowego mikroskopu kontrastowo-fazowego, nie wykazała powstawania kryształów. Warunki w komorze mikroskopu były takie same jak w inkubatorze hodowlanym. Sugeruje się, że kryształy nie powstają w samym medium hodowlanym. Do ich wytwarzania niezbędna jest obecność komórek (ryc. 70-75).



Ryc. 70. Zdjęcia reprezentatywne kontrolnego medium DMEM do hodowli komórek linii A549 bez dodatku ikarytyny. Obserwacja medium w hodowli przyżyciowej przy użyciu mikroskopu kontrastowo-fazowego trwała 48 godzin. Pierwsze zdjęcie wykonano po 10 minutach od wstawienia medium do komory mikroskopu, kolejne w interwale 120 minut.



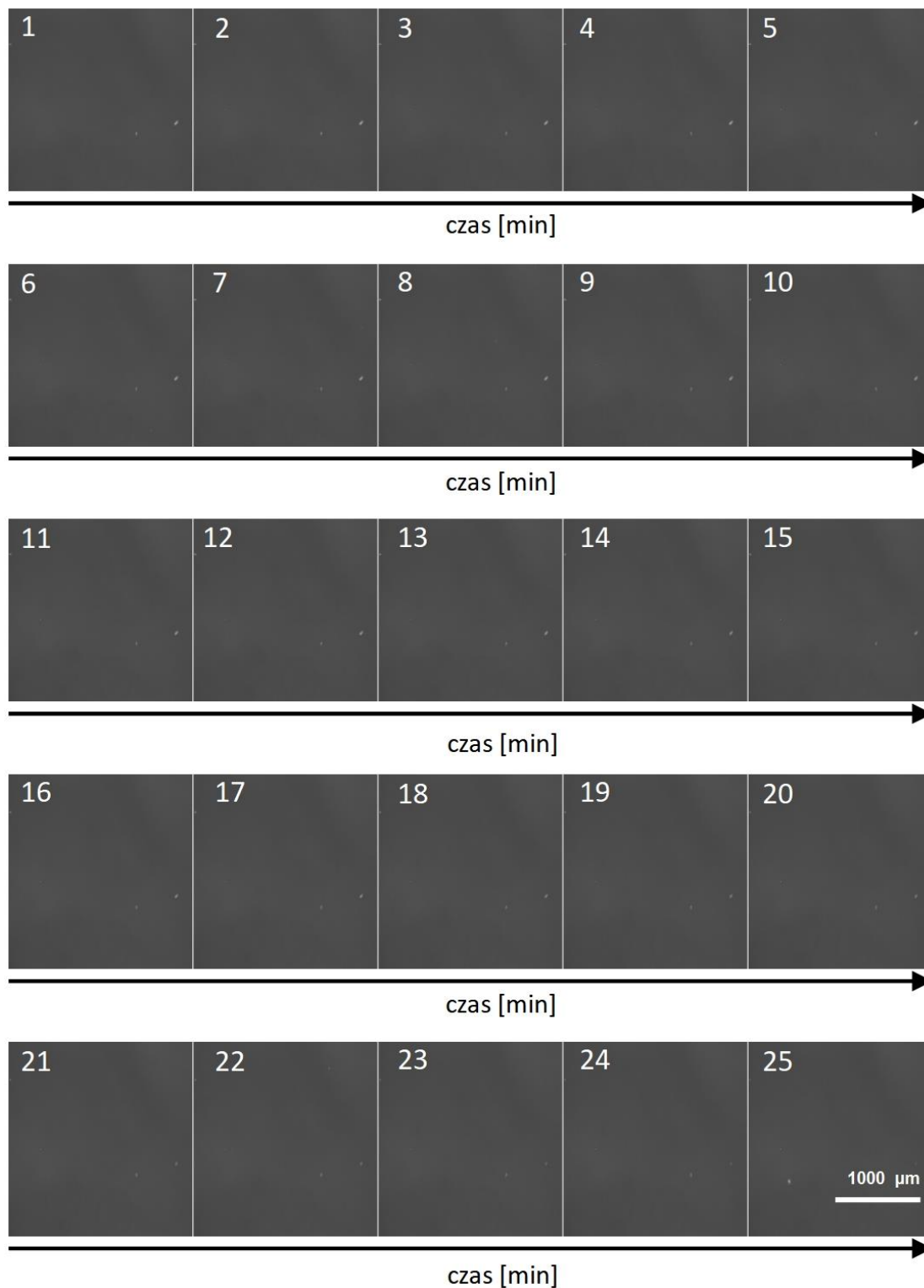
Ryc. 71. Zdjęcia reprezentatywne medium DMEM do hodowli komórek linii A549 z dodatkiem ikarytyny stężeniu 30 μM. Obserwacja medium w hodowli przyżyciowej przy użyciu mikroskopu kontrastowo-fazowego trwała 48 godzin. Pierwsze zdjęcie wykonano po 10 minutach od wstawienia medium do komory mikroskopu, kolejne w interwale 120 minut.



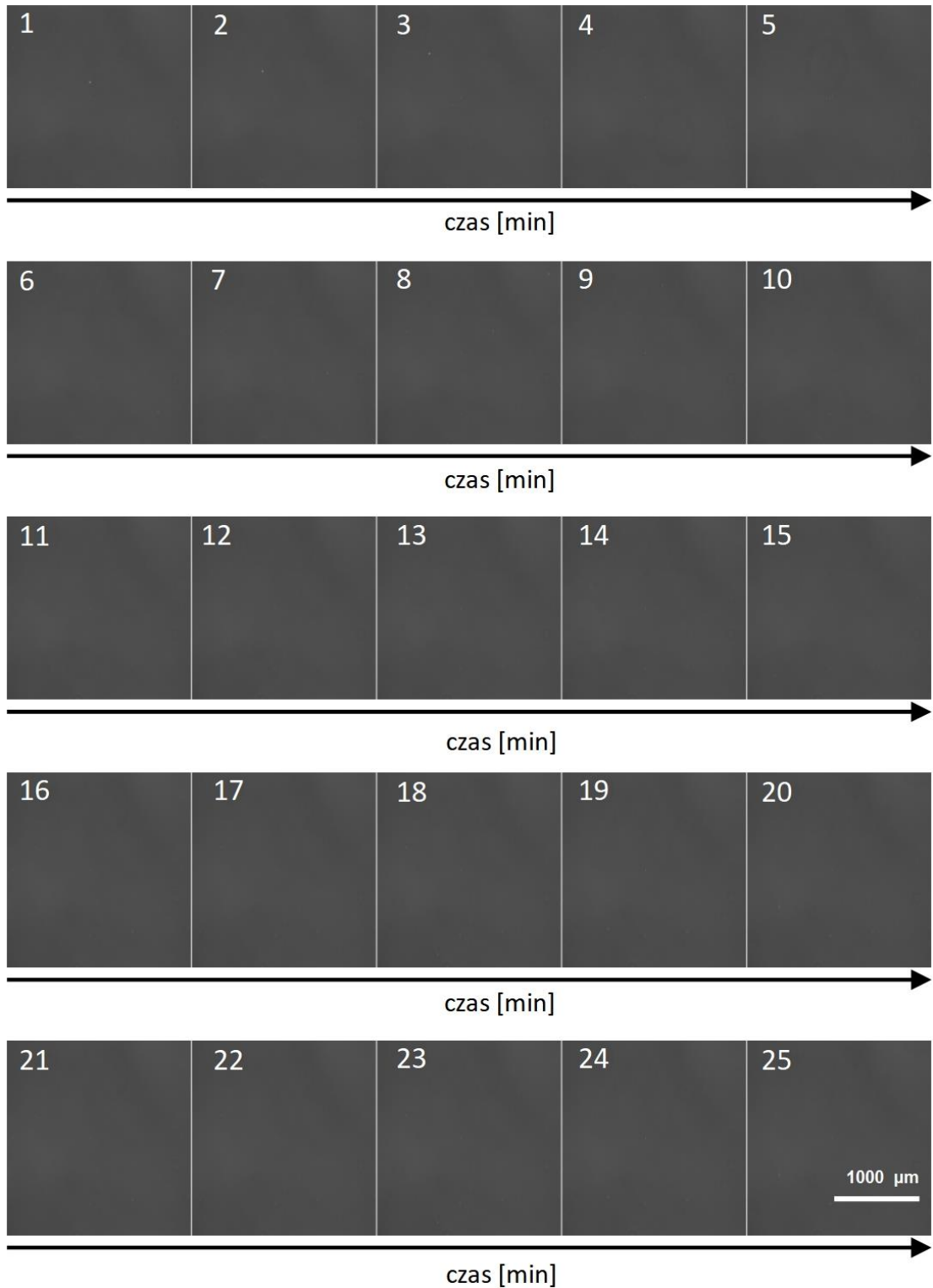
Ryc. 72. Zdjęcia reprezentatywne medium DMEM do hodowli komórek linii A549 z dodatkiem ikarytyny stężeniu 60 μM. Obserwacja medium w hodowli przyżyciowej przy użyciu mikroskopu kontrastowo-fazowego trwała 48 godzin. Pierwsze zdjęcie wykonano po 10 minutach od wstawienia medium do komory mikroskopu, kolejne w interwale 120 minut.



Ryc. 73. Zdjęcia reprezentatywne kontrolnego medium RPMI 1640 do hodowli komórek linii H1299 bez dodatku ikarytyny. Obserwacja medium w hodowli przyżyciowej przy użyciu mikroskopu kontrastowo-fazowego trwała 48 godzin. Pierwsze zdjęcie wykonano po 10 minutach od wstawienia medium do komory mikroskopu, kolejne w interwale 120 minut.

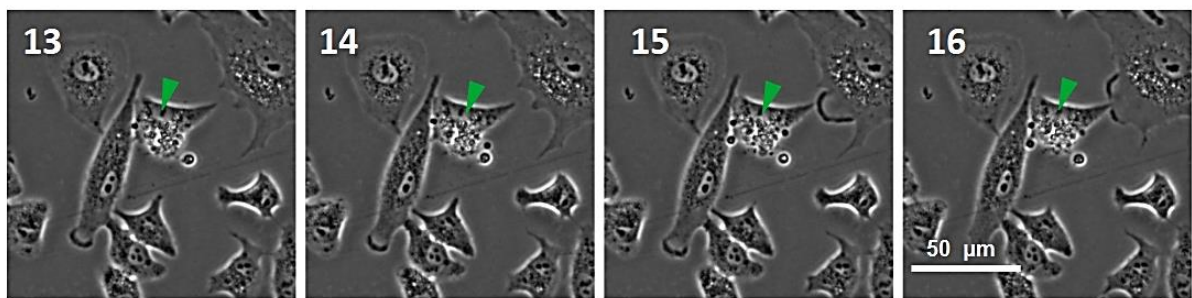
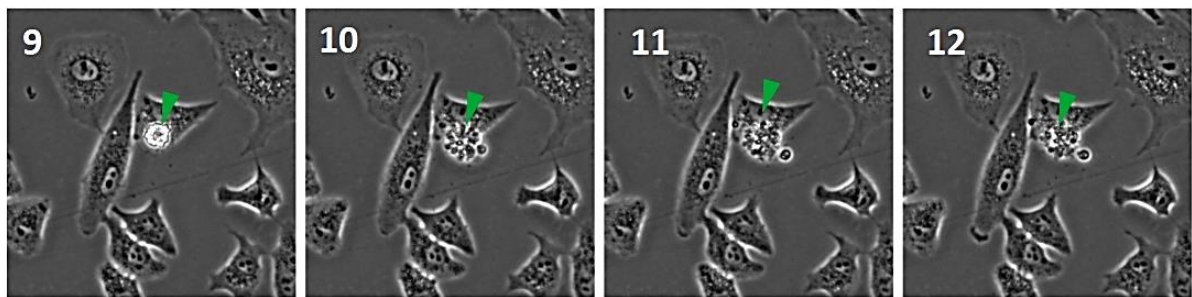
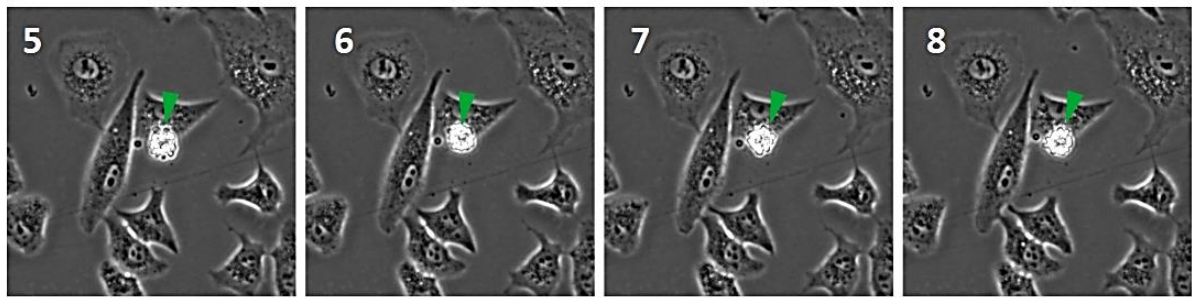
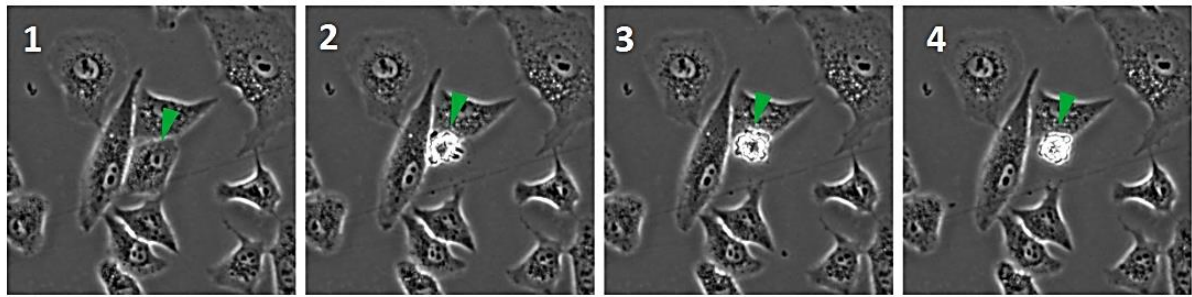


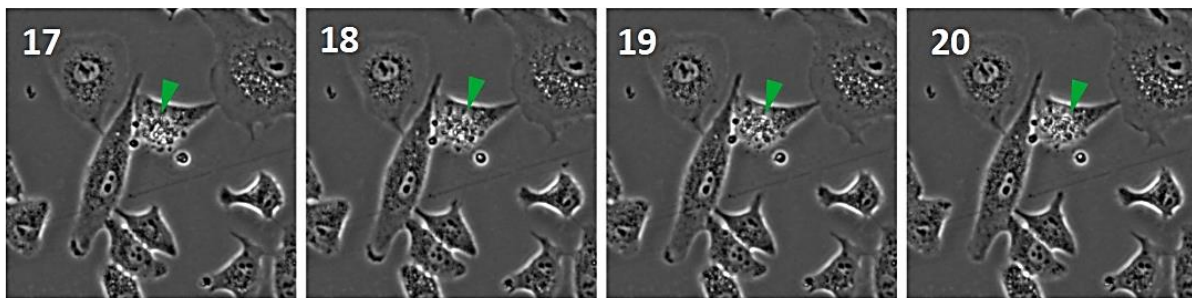
Ryc. 74. Zdjęcia reprezentatywne medium RPMI 1640 do hodowli komórek linii H1299 z dodatkiem ikarytyny stężeniu 30 μM. Obserwacja medium w hodowli przyżyciowej przy użyciu mikroskopu kontrastowo-fazowego trwała 48 godzin. Pierwsze zdjęcie wykonano po 10 minutach od wstawienia medium do komory mikroskopu, kolejne w interwale 120 minut.



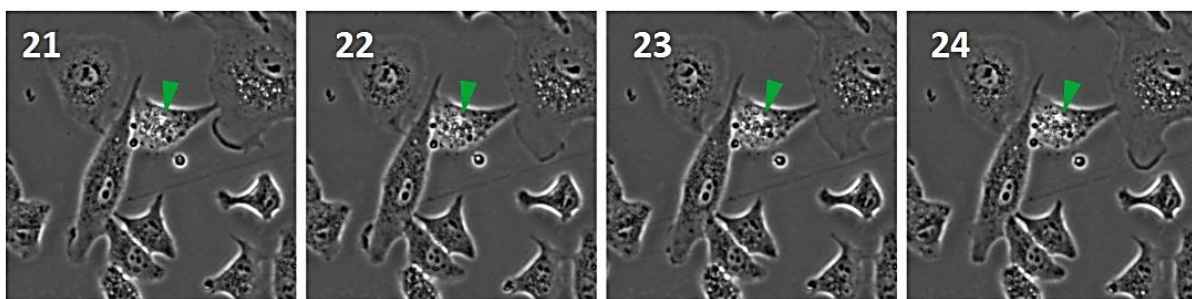
Ryc. 75. Zdjęcia reprezentatywne medium RPMI 1640 do hodowli komórek linii H1299 z dodatkiem ikarytyny stężeniu 60 μM. Obserwacja medium w hodowli przyżyciowej przy użyciu mikroskopu kontrastowo-fazowego trwała 48 godzin. Pierwsze zdjęcie wykonano po 10 minutach od wstawienia medium do komory mikroskopu, kolejne w interwale 120 minut.

4. W trakcie obserwacji komórek linii A549 oraz H1299 traktowanych ikarytyną w stężeniu 60 μM przez 48h przy użyciu mikroskopu kontrastowo-fazowego oraz wykonywaniu zdjęć poklatkowych w interwale 10 minutowym zauważono powstawanie kryształów już po 1 godzinie i 10 minutach od momentu potraktowania komórek. Wszystkie obserwowane kryształy miały bezpośrednią styczność z komórkami linii A549 i H1299, a nawet sugeruje się, że powstawały one w komórkach (ryc. 76-77).

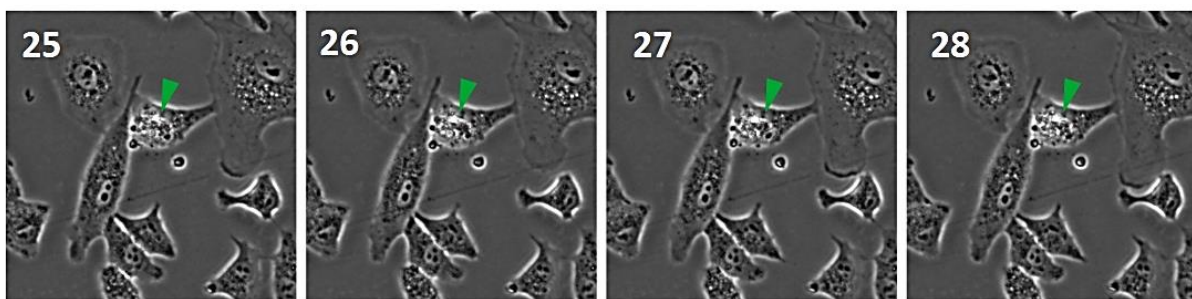




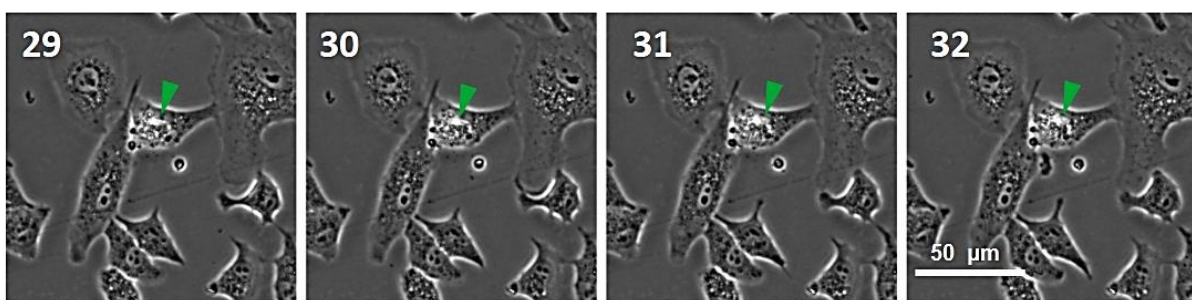
czas [min]



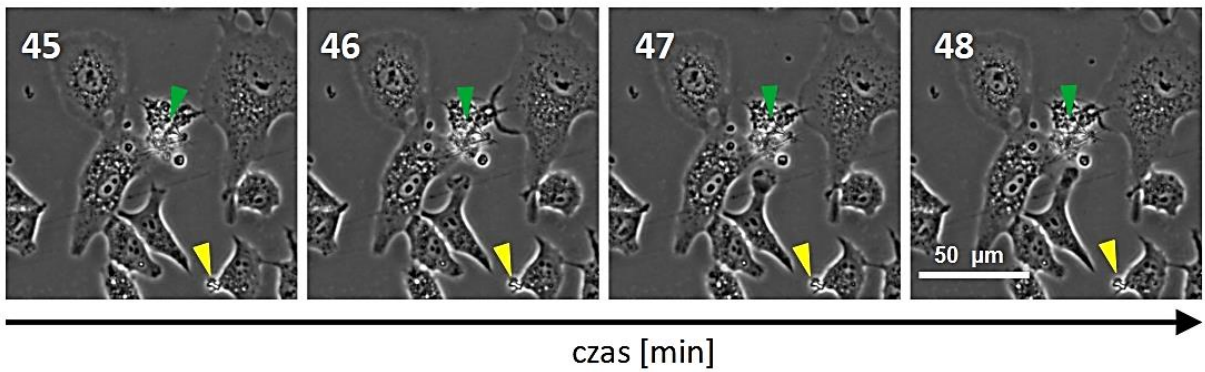
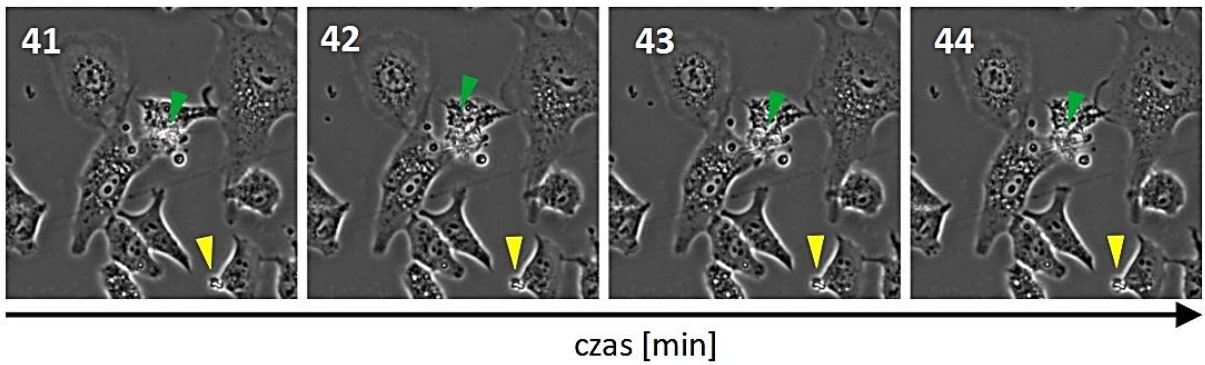
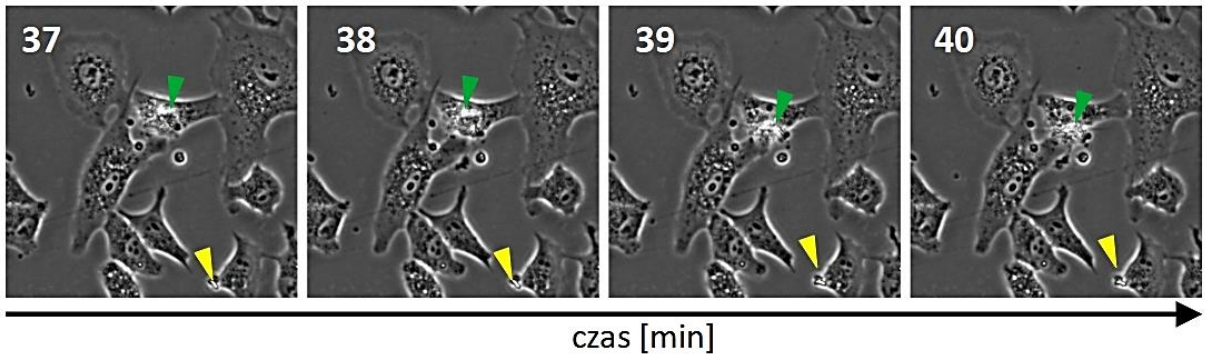
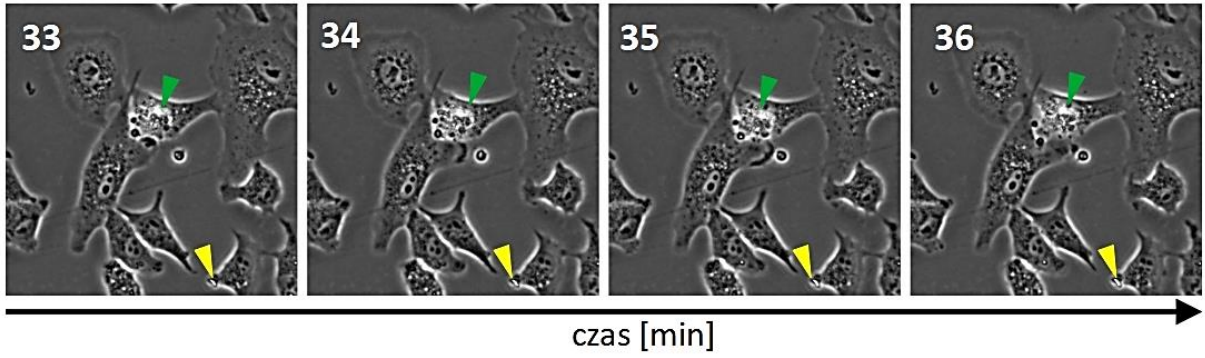
czas [min]

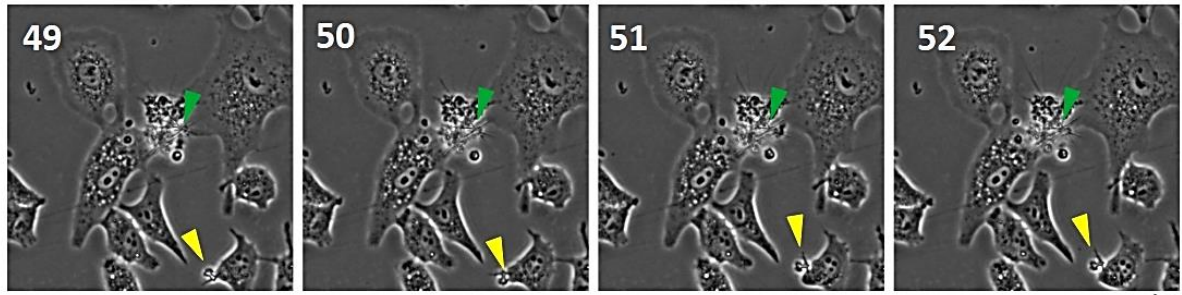


czas [min]

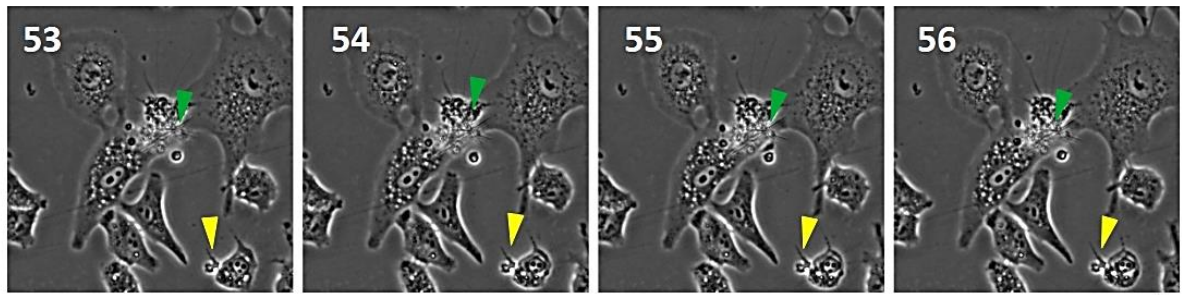


czas [min]

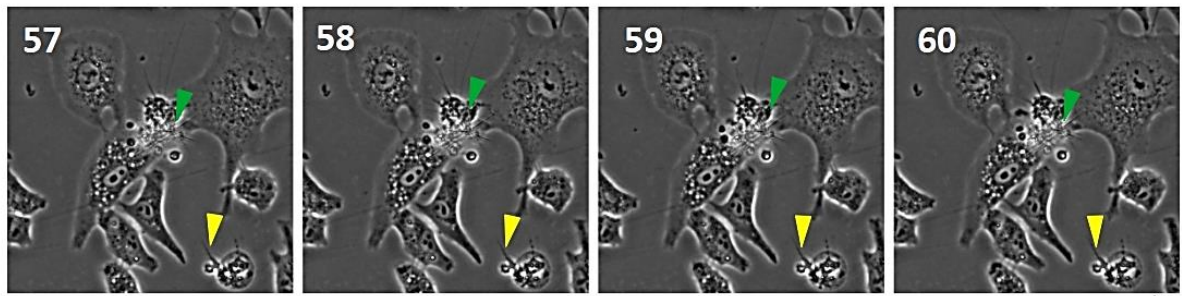




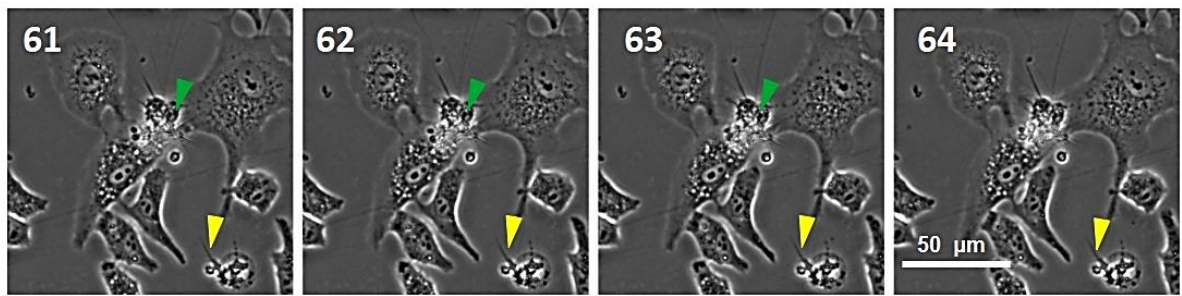
czas [min]



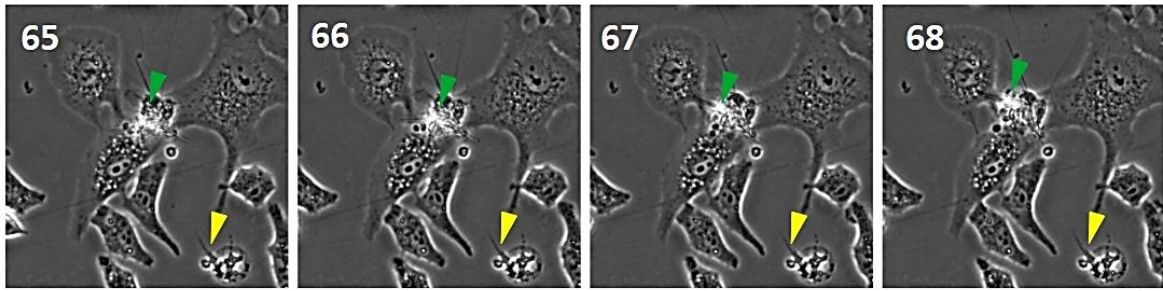
czas [min]



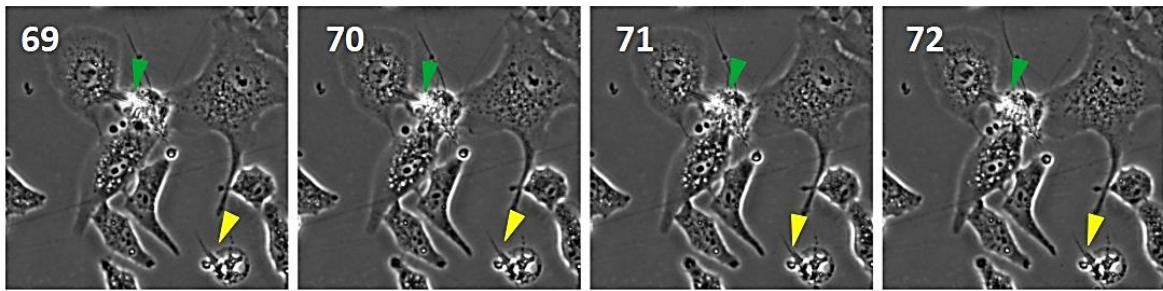
czas [min]



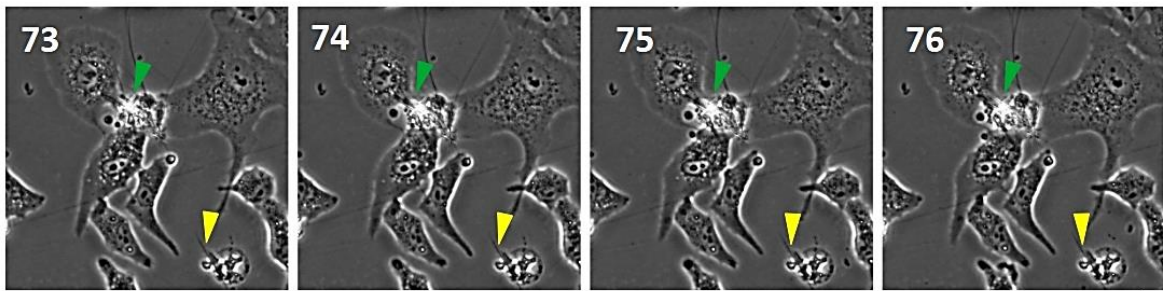
czas [min]



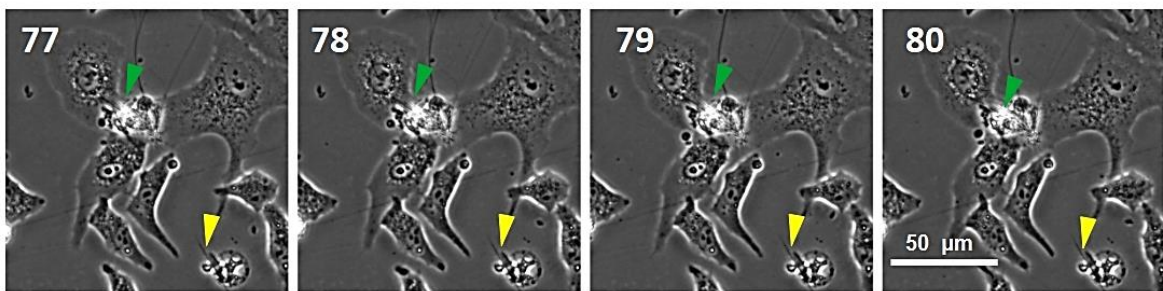
czas [min]



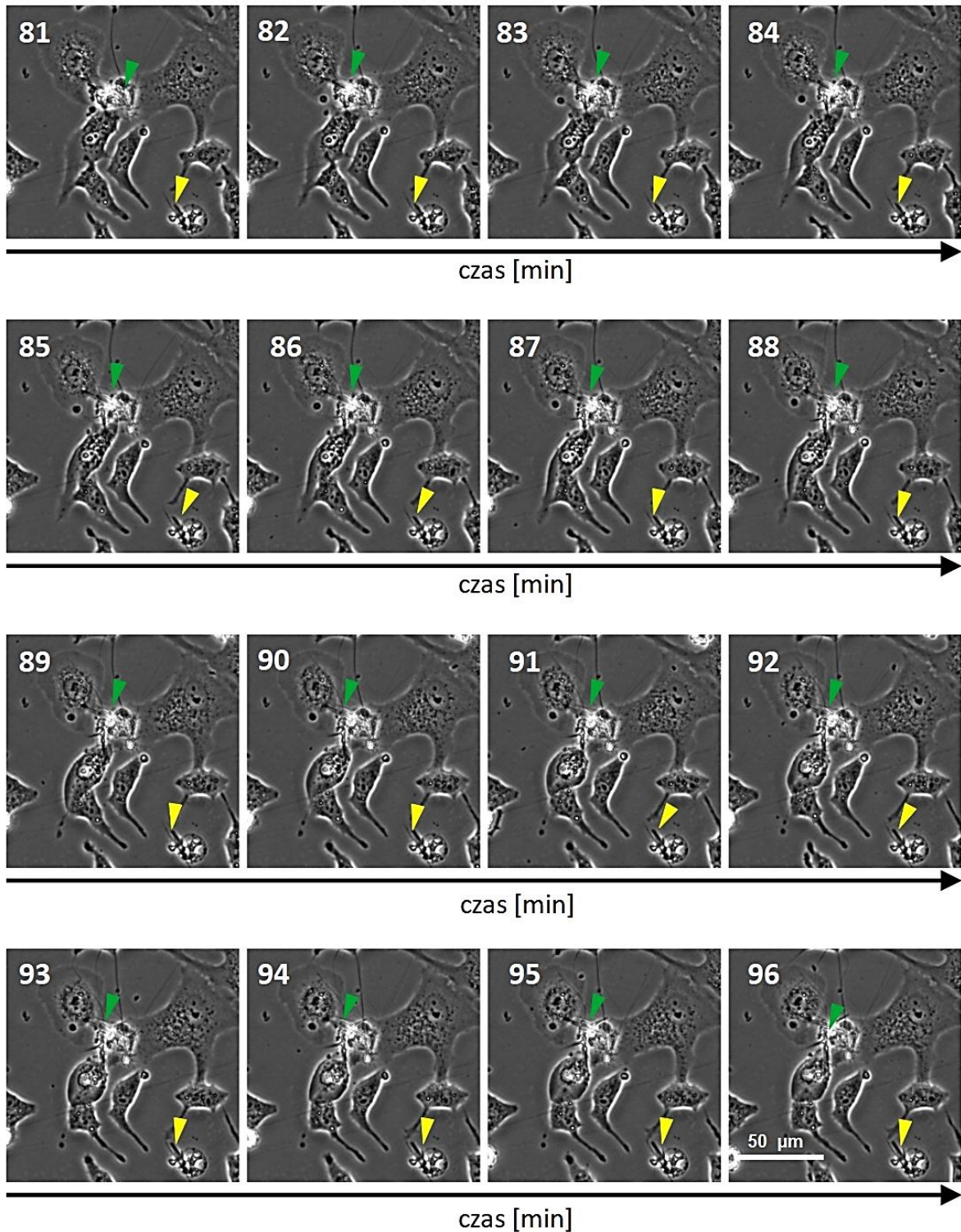
czas [min]



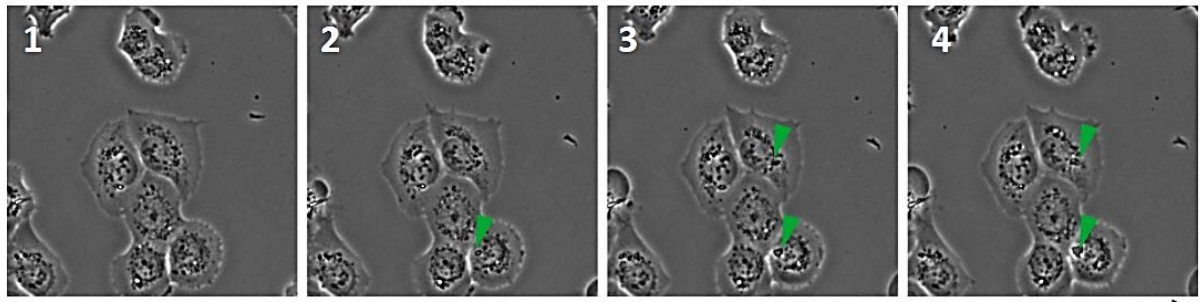
czas [min]



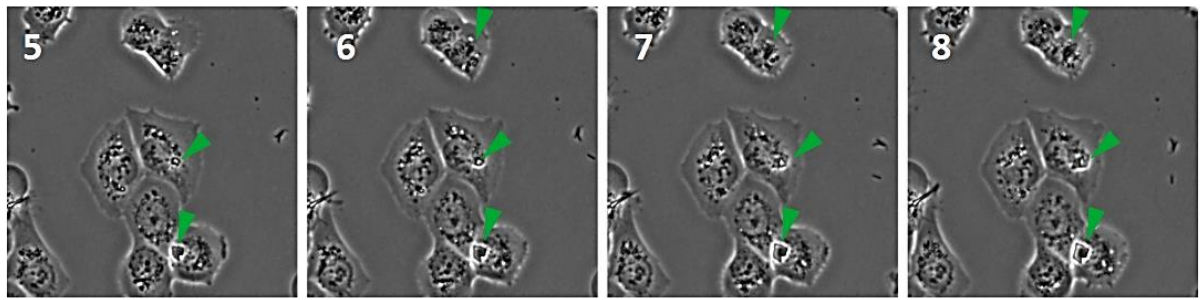
czas [min]



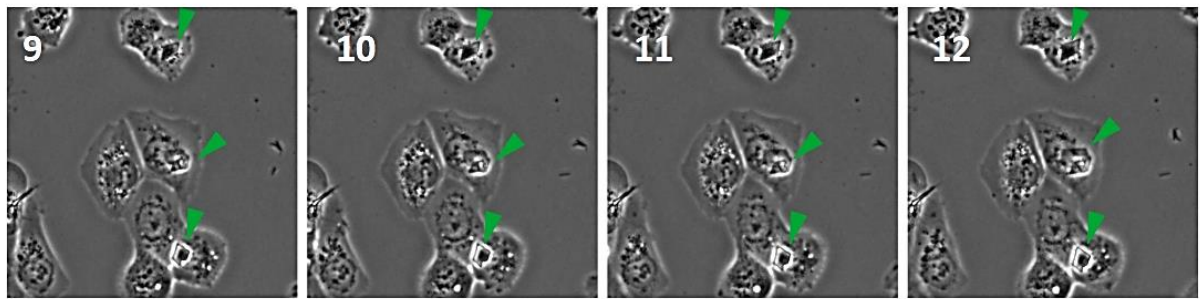
Ryc. 76. Zdjęcia reprezentatywne procesu powstawania kryształów ikarytyny w komórkach linii A549 traktowanych ikarytyną. Powstawanie kryształów w czasie zaznaczono zieloną strzałką w komórce apoptotycznej oraz żółtą strzałką w komórce nieulegającej śmierci. Zdjęcia wykonywane przybliżeniowo, w 10 minutowym interwale przy użyciu mikroskopu kontrastowo-fazowy. Pierwsze zdjęcie wykonano po 1 godzinie i 10 minutach od potraktowania komórek ikarytyną w stężeniu 60 µM.



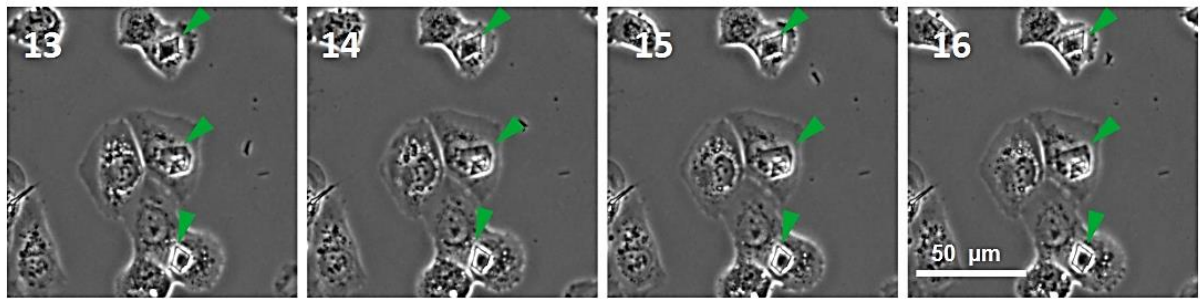
czas [min]



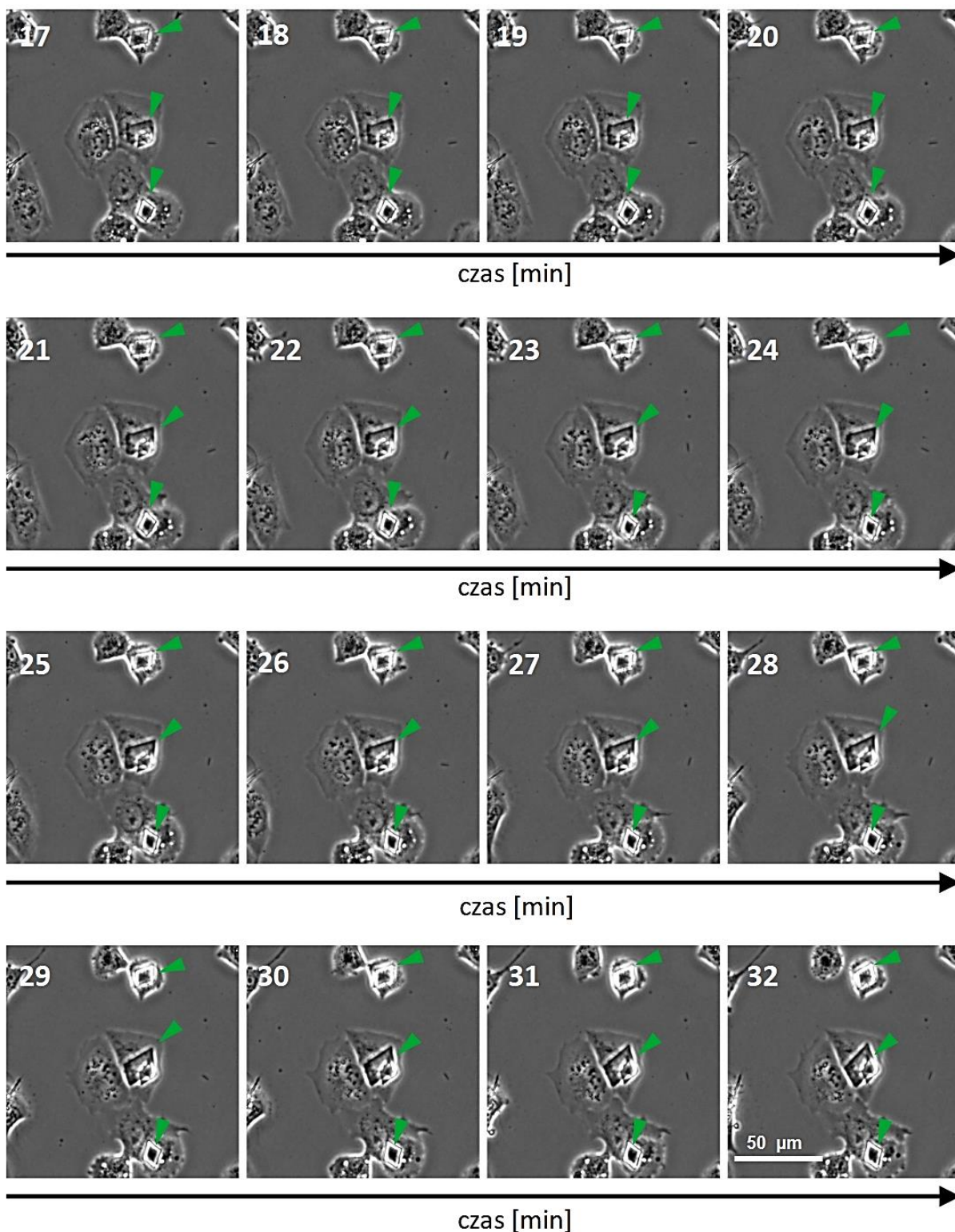
czas [min]



czas [min]



czas [min]



Ryc. 77. Zdjęcia reprezentatywne procesu powstawania kryształów ikarytyny w komórkach linii H1299 traktowanych ikarytyną. Powstawanie kryształów w czasie zaznaczono zielonymi strzałkami. Zdjęcia wykonywane przyżyciowo, w 10 minutowym interwale przy użyciu mikroskopu kontrastowo-fazowy. Pierwsze zdjęcie wykonano po 1 godzinie i 10 minutach od potraktowania komórek ikarytyną w stężeniu 60 μM .

5. Dyskusja

Każdego roku na całym świecie odnotowuje się wzrost zachorowań oraz zgonów wywołanych nowotworami. Stosowane konwencjonalne metody leczenia tj. chemioterapia, radioterapia, czy operacje chirurgiczne są coraz mniej skuteczne w walce z chorobami nowotworowymi, które stają się bardziej agresywne i odporne na większość wprowadzonych dotychczas leków. Dlatego poszukiwanie nowych metod leczenia (na przykład niedawno wprowadzona terapia celowana, terapia komórkami macierzystymi, terapia ablacyjna, a także stosowanie nanocząsteczek), oraz udoskonalanie już stosowanych terapii staje się głównym zadaniem naukowców z całego świata [12]. Jednak nie tylko ciągły rozwój metod leczenia mniej lub bardziej zaawansowanych nowotworów jest przedmiotem badań. Również ciągłe poszukiwanie markerów prognostycznych jest w zainteresowaniu badaczy. Jak postulował Hipokrates, prekursor profilaktyki, „*Lepiej zapobiegać, niż leczyć*”. Wcześniejsze wykrycie raka daje większe możliwości wyleczenia pacjenta, co wiąże się z obniżeniem ilości występujących zgonów. Biomarkery są niezbędnym narzędziem w onkologii, które wykorzystywane są do oceny obecnego wyniku pacjenta oraz określenia prawdopodobieństwa nawrotu choroby nowotworowej po zakończonym leczeniu. Jednak niewiele markerów prognostycznych rozwinęło się w ostatnich latach od odkrycia do zwalidowania narzędzi stosowanych w praktyce klinicznej [105,106]. Dlatego ciągłe poszukiwania nowych narzędzi profilaktycznych tj. markery prognostyczne oraz mniej inwazyjnych i bardziej skutecznych sposobów leczenia nowotworów jest tak ważne.

W niniejszej pracy oceniono ekspresję białka z rodziny cyklin – cykliny Y – oraz zmiany w morfologii, cyklu komórkowym, potencjale migracyjnym, a także rodzaj indukowanej śmierci komórek niedrobnokomórkowego raka płuca linii A549 oraz komórek niedrobnokomórkowego raka płuca z przerzutu do węzłów chłonnych linii H1299 pod wpływem czynników indukujących śmierć komórki. Do realizacji założonego celu pracy zastosowano cisplatynę w stężeniach 10 i 30 μM oraz ikarytynę w stężeniach 30 i 60 μM z uwzględnieniem IC_{10} , IC_{50} oraz IC_{80} . Cisplatyna, choć stosunkowo toksyczna, stosowana jest w leczeniu nowotworów różnego typu od 50 lat, natomiast ikarytyna może niedługo stać się nowym lekiem w walce z chorobami nowotworowymi. Jednak dokładne zrozumienie mechanizmów molekularnych i szlaków, dzięki którym zarówno cisplatyna, jak i ikarytyna

osiągają swoje efekty chemoprewencyjne może pozwolić w przyszłości na skuteczniejszą terapię przeciwnowotworową.

Analiza dostępnej literatury wykazuje, że skuteczność przeprowadzonej chemioterapii z użyciem cisplatyny jest stosunkowo ograniczona przez wrodzoną lub nabytą oporność nowotworów na ten rodzaj leku. Galluzzi i wsp. sklasyfikowali mechanizmy oporności na cisplatynę, które dzielą się na cztery kategorie. Należą do nich (i) zapobieganie wiązaniu cisplatyny z DNA poprzez zmniejszoną akumulację komórkową lub zwiększone wiązanie ze składnikami cytoplazmatycznymi (*pre-target resistance*); (ii) tolerowanie lub naprawa adduktów cisplatyna-DNA (*on-target resistance*); (iii) zmiany lub defekty w szlakach sygnałowych w odpowiedzi na uszkodzenie DNA przez cisplatynę (*post-target resistance*); oraz (iv) stosowanie mechanizmów, które nie angażują bezpośrednio sygnałów inicjowanych cisplatyną, ale umożliwiają komórkom obejście śmierci komórki wywołanej cisplatyną (*off-target resistance*) [107].

Ważnym aspektem w oporności komórek nowotworowych na cisplatynę może być również aktywność (lub jej brak) supresora nowotworu białka p53, który odgrywa kluczową rolę w wielu procesach komórkowych takich jak regulacja procesu apoptozy, naprawa DNA, a także regulacja cyklu komórkowego. Białko p53 ma kluczowe znaczenie w regulacji proliferacji komórek po uszkodzeniu DNA, a zakłócenie funkcji tego białka przez mutację zostało uznane za czynnik odpowiedzialny za oporność komórek nowotworowych na środki chemioterapeutyczne [108]. Wynikiem ostrego stresu genotoksycznego jest gwałtowna aktywacja białka p53, która powoduje śmierć komórek na drodze apoptozy. Jednakże białko p53 może działać również ochronnie na komórki, w których nastąpiło nieznaczne uszkodzenie DNA. W takim przypadku jego aktywność wpływa na uruchomienie kaskady napraw, dzięki czemu komórka utrzymywana jest przy życiu. Inaktywacja genu TP53, który koduje białko p53, zachodzi często w różnych typach nowotworów. Spowodowane jest to poprzez delecje lub mutacje występujące w komórkach nowotworowych, a w konsekwencji wpływa na przeżycie guza [109]. Analiza dostępnej literatury wykazała, że skuteczne zahamowanie progresji nowotworu można uzyskać poprzez przywrócenie aktywności supresora nowotworu typu dzikiego (p53WT). Sugeruje się, że komórki nowotworowe, które zawierały białko p53 typu dzikiego były bardziej wrażliwe na terapię onkologiczną (tj. chemioterapia i radioterapia)

[110]. Natomiast badania Breen i wsp. wykazują, że samo wprowadzenie p53 typu dzikiego nie jest wystarczające, aby znacząco zmienić wrażliwość linii komórkowej na leki chemioterapeutyczne [111].

Dostępne analizy potwierdzają wyniki przeprowadzonych w niniejszej pracy badań, które wykazują, że linia komórkowa A549, która posiada aktywne białko p53 wykazywała mniejszą oporność na cisplatynę w porównaniu z linią H1299 z częściową delecją genu TP53. Wynikiem mniejszej oporności mogła być, wcześniej wspomniana silna aktywacja p53 wywołana działaniem cisplatyny, co skutkowało zmniejszeniem proliferacji komórek linii A549, a także wyższym odsetkiem komórek wczesno- oraz późno-apoptotycznych w porównaniu z linią H1299. Dlatego wyznaczenie efektywnej dawki cisplatyny, która spowoduje zahamowanie proliferacji komórek o 10% i 50% po 48 godzinnej inkubacji ze związkiem w przypadku linii H1299 wymagała zastosowania prawie dwukrotnie wyższej dawki cisplatyny w porównaniu z linią A549.

Po traktowaniu komórek ikarytyną różnice w efektywności dawki między badanymi liniami komórkowymi nie były już tak znaczne. Jak donoszą wyniki badań Gao i wsp. ikarytyna jest zdolna do hamowania proliferacji komórek raka jajnika, które są odporne na cisplatynę. Spowodowane być to może apoptozą wywołaną związkiem pochodzenia naturalnego związaną z aktywacją białka p53 oraz supresją szlaku Akt/mTOR [101]. Akt i mTOR są kinazami serynowo-treoninowymi odgrywającymi ważną rolę we wzroście, proliferacji, przeżyciu i różnicowaniu komórek. Oba białka wymagają fosforylacji w określonych miejscach w celu ich pełnej aktywacji. Wyniki te mogą sugerować, że w liniach nowotworu płuca opornych na cisplatynę, ikarytyna wykazuje lepsze działanie hamujące proliferację komórek. W wielu nowotworach szlak Akt/mTOR jest nadaktywny, co zmniejsza apoptozę i umożliwia proliferację komórek nowotworowych. Natomiast w komórkach prawidłowych jest niezbędny do promowania wzrostu, proliferacji oraz różnicowania komórek macierzystych, w szczególności nerwowych komórek macierzystych [112].

W niniejszej pracy analizowano również morfologię badanych komórek po zastosowaniu czynników indukujących śmierć komórki. Najczęściej obserwowano komórki powiększone z powiększonym jądrem komórkowym w linii A549 i H1299 po traktowaniu zarówno cisplatyną, jak i ikarytyną. Rozmiar jądra różni się między komórkami prawidłowymi

i nowotworowymi, a atypia jądrowa jest powszechnym markerem diagnostycznym i prognostycznym [113]. W niniejszej pracy w wyniku działania czynników indukujących śmierć komórki zwiększeniu uległy rozmiary komórek i jąder komórkowych badanych linii nowotworowych. Wyniki badań Weng i wsp. wykazują, że zastosowanie cisplatyny spowodowało powstawanie komórek powiększonych, w których nastąpiło powiększenie średnicy jądra komórkowego w liniach komórkowych czerniaka, co skutkowało zwiększeniem oporności komórek na inne leki [114]. Jak sugeruje Schirmer i wsp. zmiana wielkości jądra komórkowego może wpływać na powstawanie przerzutów. Sugeruje się, że wraz ze zwiększeniem wielkości jądra komórkowego zdolność komórek do przerzutowania maleje ze względu na to, iż utrudnione zostaje jej przejście przez połączenie komórka-komórka [113].

Powiększenie komórek oraz zmiany w jądrze komórkowym tj. mikro- i makronukleacja, a także multinukleacja należą do głównych cech morfologicznych katastrofy mitotycznej. Komitet do Spraw Nazewnictwa Śmierci Komórkowej definiuje ten proces jako mechanizm onkosupresyjny, w wyniku którego następuje zahamowanie proliferacji komórek na drodze inicjacji śmierci komórki lub procesu starzenia [72]. Vakifahmetoglu i wsp. badali rolę białka p53 w mechanizmie katastrofy mitotycznej. Traktując linie komórkowe raka jajnika cisplatyną wykazali, że w przypadku braku funkcjonalnego supresora p53, leczenie cisplatyną wywoływało katastrofę mitotyczną, a następnie martwicę [115]. Przedstawione wyniki mogą być potwierdzeniem niniejszych badań, w których komórki o fenotypie katastrofy mitotycznej zaobserwowano w linii H1299 po traktowaniu cisplatyną. Jak wspomniano wcześniej linia H1299 nie posiada aktywnego białka p53. Niestety nie ma dostępnych badań nad wpływem ikarytyny na mechanizm katastrofy mitotycznej.

Kolejną zmianą morfologiczną występującą w obu badanych liniach komórkowych była wakuolizacja cytoplazmy. Jest to proces, który najczęściej obserwowany jest po zastosowaniu związków chemicznych, ale także jest wynikiem działania na komórki wirusów lub bakterii. Proces cytoplazmatycznej wakuolizacji może być przejściowy, gdy komórka wystawiona jest na działanie induktora (najczęściej związku lipidowego zawierającego aminy), co wpływa na zmiany w cyklu komórkowym i migracji komórek. Natomiast nieodwracalna wakuolizacja w obecności bodźca cytotoksycznego jest wyznacznikiem występującego stanu cytopatologicznego, który w ostateczności prowadzi do śmierci komórki. Jednakże,

mechanizm, dzięki któremu związki syntetyczne (w tym leki) lub związki pochodzenia naturalnego indukują ten proces nie został scharakteryzowany [116]. Shin i wsp. uzyskali również podobne wyniki traktując cisplatyną komórki raka płuca linii H460. Dawka 5 μM cisplatyny wywoływała zaawansowaną wakuolizację cytoplazmy badanych komórek [117]. Aktualnie nie ma danych literaturowych na temat wpływu ikarytyny na proces cytoplazmatycznej wakuolizacji. Analiza zebranych wyników wskazuje na fakt, iż cisplatyna i ikarytyna indukują proces nieodwracalnej wakuolizacji cytoplazmy w liniach komórkowych A549 oraz H1299, który może prowadzić do śmierci komórek.

Kolejnym etapem badań było określenie wpływu cisplatyny i ikarytyny na cykl komórkowy linii nowotworowych płuca. Analizując dane z pomiarów cytometrycznych rozkładu komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego można zauważyć, iż cisplatyna w obu liniach wpływa na zatrzymanie komórek w fazie G2/M. W linii A549 istotny statystycznie wzrost występował po zastosowaniu dawki 10 μM cisplatyny. Natomiast w linii H1299 istotność statystyczna wykazana została dla obu dawek. Analogiczne wyniki uzyskali Sarin i wsp., którzy traktowali cisplatyną linię A549 i oporną na związek platyny linię A549^rCDDP²⁰⁰⁰. Autorzy wykazali, że w linii A549 nastąpiło zatrzymanie cyklu w fazie G2/M, natomiast w linii A549^rCDDP²⁰⁰⁰ nie obserwowano takich zmian [118]. Z kolei po zastosowaniu ikarytyny w przedstawionych w niniejszej pracy badaniach, zatrzymanie cyklu komórkowego nastąpiło w fazie G0/G1, a także zwiększył się odsetek komórek w fazie S w porównaniu z grupą kontrolną. Według Liu i wsp. leczenie ikarytyną wpływa na zatrzymanie komórek glejaka wielopostaciowego w fazie G0/G1 cyklu komórkowego zależnie od dawki oraz czasu inkubacji ze związkiem. Autorzy sugerowali związek między przeciwnowotworowym działaniem ikarytyny, a aktywacją sygnalizacji AMPK, która następnie działa hamująco na PPAR γ (receptor gamma aktywowany przez proliferatory peroksysomów, *ang. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*). PPAR γ ulega wysokiej ekspresji w różnych ludzkich tkankach nowotworowych, w tym niedrobnokomórkowym raku płuca, raku jelita grubego i raku żołądka [95]. Przedstawione wyniki badań potwierdzają wpływ obu związków cytotoksycznych na regulację cyklu życiowego komórek obu linii niedrobnokomórkowego raka płuca.

Na podstawie analizy testu tworzenia kolonii, migracji komórek oraz tempa ich migracji oceniono potencjał migracyjny komórek linii A549 oraz H1299 traktowanych cisplatyną i

ikarytyną. Zarówno inwazja, jak i migracja są nieodłącznymi cechami przerzutu nowotworu, który powoduje śmierć pacjentów onkologicznych. Za pomocą różnych mechanizmów, do których należą zbiorowa migracja komórek (migracja kolektywna) oraz migracja komórek mezenchymalnych, komórki nowotworowe mogą migrować i rozprzestrzeniać się, co wpływa na zmniejszenie skuteczności terapii przeciwprzerutowej [119]. Zbiorowa migracja występuje w przypadku komórek nabłonkowych (epitelialnych) ze względu na dużą ilość połączeń międzykomórkowych. Mechanizm tego typu wykorzystywany jest najczęściej przez nowotwory, które wykazują duży stopień zróżnicowania m. in. rak gruczołu krokowego, rak piersi, a także niedrobnokomórkowy rak płuca [120]. Jednakże, komórki epitelialne są w stanie uzyskać fenotyp podobny do komórek mezenchymalnych na drodze przejścia epitelialno-mezenchymalnego (EMT, *ang. epithelial-mesenchymal transition*) [121]. EMT definiowane jest jako proces biologiczny, w którym komórki epitelialne nabywają cechy komórek mezenchymalnych. Na drodze tego procesu następuje utrata połączeń komórka-komórka, polaryzacji wierzchołkowo-podstawnej oraz markerów nabłonkowych, a w zamian komórki nabywają kształt wrzecionowaty, ruchliwość i markery mezenchymalne [122]. Wang i wsp. w swoich badaniach nad wpływem cisplatyny na potencjał migracyjny komórek raka piersi wykazali, że cisplatyna już w niskim stężeniu (2mg/kg) hamowała proliferację, tworzenie kolonii oraz migrację komórek nowotworowych. Autorzy sugerują, że cisplatyna hamuje powstawanie przerzutów poprzez blokowanie wczesnych etapów EMT [123]. Jednakże, Xu i wsp. wykazali, że komórki nabłonkowe linii A549 były bardziej wrażliwe na cisplatynę, podczas gdy mezenchymalne komórki linii H1299 posiadały większą oporność na lek, co wiązało się z większą migracją i inwazją komórek [124]. W przypadku ikarytyny badania Xu i wsp. dowodzą, że związek ten w znacznym stopniu hamuje inwazję komórek glejaka poprzez zatrzymanie EMT, które odbywa się za pośrednictwem szlaku sygnalizacji PTEN/Akt/HIF-1 α [125]. PTEN/PI3K/Akt stanowi ważny szlak regulujący sygnalizację wielu procesów biologicznych, takich jak apoptoza, metabolizm, proliferacja komórek i wzrost komórek. PTEN (fosfataza i homolog tensyny, *ang. Phosphatase And Tensin Homolog*) jest fosfatazą białkowo-lipidową, której głównym substratem jest trifosforan fosfatydyloinozytolu (PIP3, *ang. Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*), produkt PI3K (kinaza 3-fosfatydyloinozytolu, *ang. Phosphoinositide 3-kinases*). Wzrost PIP3 rekrutuje Akt do błony, gdzie jest aktywowany przez

inne kinazy również zależne od PIP3. Szlak PTEN/PI3K/Akt aktywuje HIF-1 α (czynnik indukowany hipoksją – 1 α , *ang. hypoxia-inducible factor 1 α*), w wyniku czego następuje szereg zmian w transkrypcji genów i białkach związanych z różnymi procesami komórek nowotworowych, w tym apoptozą, inwazją i przerzutami [126]. Zatrzymanie EMT wykazano również w raku jajnika. Gao i wsp. poprzez traktowanie ikarytyną dwóch linii komórkowych raka jajnika (tj. linii A2780s oraz linii odpornej na cisplatynę A2780cp) wykazali, iż ikarytyna zmniejsza proliferację, migrację oraz inwazję obu linii poprzez tłumienie szlaku sygnalizacji Akt/mTOR oraz EMT [127]. Jeszcze jednym przykładem hamowania EMT przez zastosowanie ikarytyny są badania Li i wsp. Autorzy analizowali mechanizm wpływu ikarytyny na komórki raka wątrobowokomórkowego. W tym typie nowotworu ikarytyna znacząco zmniejszała migrację i inwazję HCC poprzez zahamowanie szlaku sygnalizacji Notch oraz zmniejszenie ekspresji białek biorących udział w EMT [128]. Wprawdzie w przedstawionej pracy dowiedziono, że cisplatyna jak i ikarytyna zmniejszają potencjał migracyjny komórek raka płuca, co może mieć związek z EMT, to jednak szczegółowy mechanizm wpływu zastosowanych cytostatyków na ten proces nadal pozostaje niejasny.

W przedstawionej rozprawie doktorskiej oceniono również wpływ związków cytotoksycznych na rodzaj śmierci komórek linii A549 oraz H1299. Wykazano, że po 48 godzinnej inkubacji z ikarytyną spada odsetek komórek żywych, w wyniku czego wzrasta odsetek komórek wczesno- oraz późno-apoptotycznych. W swoich badaniach Liu i wsp. zwracają uwagę na fakt, iż 48 godzinna inkubacja z ikarytyną promowała apoptotyczną śmierć komórek glejaka poprzez wzrost ekspresji kaspazy 3 oraz proapoptotycznego białka Bax, a także obniżenie białka Bcl-2 [95]. W piśmiennictwie istnieją również doniesienia dotyczące wpływu ikarytyny na indukcję apoptozy w niedrobnokomórkowym raku płuca. Żuryń i Krajewski wykazali, że ikarytyna indukowała apoptozę w raku płuca linii A549, która zależna była od dawki oraz czasu inkubacji ze związkiem. W przedstawionych badaniach autorzy wykazali, że najwyższy odsetek komórek apoptotycznych uzyskany został po 48 godzinnej inkubacji ze związkiem w stężeniu 20 μ M [129]. Natomiast Zheng i wsp. sugerują, że ikarytyna może wpływać na proces apoptozy w linii NDRP poprzez szlak AMPK [130]. Co ciekawe, według Zhou i wsp. wyciszenie AMPK α 1 wpływało na uwrażliwienie komórek raka okrężnicy na apoptozę indukowaną ikarytyną [131].

Z kolei po zastosowaniu cisplatyny w badaniach przeprowadzonych w niniejszej pracy indukcja procesu apoptozy nie była już tak znaczna jak w przypadku ikarytyny. Wykazano istotny wzrost odsetka komórek późno-apoptotycznych po 48 godzinnej inkubacji ze związkiem platyny w linii H1299. W komórkach prawidłowych Jin i wsp. zasugerowali kluczową rolę AMPK w indukowanej cisplatyną apoptozie komórek nabłonka nerki i nefrotoksyczności. W odpowiedzi na podanie cisplatyny w stężeniu 50 μ M aktywowano AMPK, powodując indukcję Bax, aktywację kaspazy 3, co w efekcie spowodowało apoptozę komórek nabłonka kanalików oraz uszkodzenie i dysfunkcję nerek. Odkrycia te sugerują, że AMPK może służyć jako nowy cel terapeutyczny dla nefrotoksyczności wywołanej cisplatyną [132]. Badania Shimada i wsp. nad komórkami włókniakomięsa linii HT1080 wykazały, że cisplatyna może również indukować apoptozę poprzez regulację szlaku AMPK [133]. Reasumując, na podstawie przedstawionej literatury oraz badań własnych sugeruje się, że zarówno ikarytyna, jak i cisplatyna mogą wpływać na indukcję procesu apoptozy poprzez szlak AMPK zarówno w komórkach prawidłowych, jak i nowotworowych.

Tematem niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena ekspresji cykliny Y w komórkach linii nowotworowych po indukcji śmierci komórki. Badania wykazały wzrost poziomu cykliny Y w liniach niedrobnokomórkowego raka płuca po zastosowaniu związków cytotoksycznych, który zależał od dawki i rodzaju związku, czasu inkubacji oraz charakterystyki linii komórkowej. Wzrost ekspresji cykliny Y zaobserwowano już po 3 godzinach od potraktowania komórek obu linii związkami cytotoksycznymi, a najwyższą ekspresję wykazano po 48 godzinach inkubacji z cisplatyną.

Jak sugerowano wcześniej oba związki użyte w badaniach indukowały śmierć komórek, a także zatrzymanie cyklu komórkowego poprzez wpływ na szlak AMPK. Szlak AMPK odgrywa istotną rolę w utrzymaniu prawidłowej homeostazy energetycznej komórek koordynując wiele procesów komórkowych tj. progresja cyklu, autofagia, dynamika mitochondriów, glikoliza, a także lipogeneza [134]. W przypadku cisplatyny wpływ szlaku AMPK na raka, zależny jest od wielu czynników i nie ma pojedynczej roli. Z jednej strony niektórzy badacze donoszą, że aktywacja AMPK zwiększa apoptozę wywołaną cisplatyną w raku, podczas gdy z drugiej strony część raportów wskazuje, że aktywacja AMPK chroni komórki nowotworowe przed cytotoksycznością indukowaną przez cisplatynę [135]. Badania *in vitro* potwierdziły potencjał

terapeutyczny aktywacji AMPK w wielu typach nowotworów. Co ciekawe, działanie AMPK w progresji raka może być związane z blokowaniem lub nawet odwracaniem EMT [136].

Dohmen i wsp. w swoich badaniach zidentyfikowali kompleks cykliny Y/CDK16 jako substrat szlaku AMPK i efektor procesu autofagii. Dalsze badania *in vivo* potwierdziły fosforylację cykliny Y zależną od AMPK, co prowadzi do zwiększenia interakcji między cykliną Y i CDK16, a to z kolei zwiększa aktywność tego kompleksu. Autofagia odgrywa również dość kontrowersyjną rolę w procesie kancerogenezy. Z jednej strony inicjacja tego procesu prowadzi do zahamowania proliferacji komórek nowotworowych [137]. Z drugiej strony autofagia może wpływać na zwiększenie przeżycia komórek nowotworowych w warunkach stresowych (np. promieniowanie jonizujące) poprzez eliminację uszkodzonych organelli oraz zwiększenie oporności na chemioterapię [138]. Dlatego dokładne poznanie mechanizmu procesu autofagii może stanowić cel w terapii chorób nowotworowych.

Na podstawie zebranych informacji, w odniesieniu do badań własnych sugeruje się, że zastosowanie zarówno cisplatyny, jak i ikarytyny wpływa na aktywację szlaku AMPK, co skutkować może wzrostem ekspresji cykliny Y. W wyniku tego cyklina Y poprzez szlak AMPK może przyczyniać się do hamowania proliferacji, migracji, inwazji komórek oraz indukcji procesu apoptozy w niedrobnokomórkowym raku płuca.

Ocena białka RRM2 oraz β -kateniny wykazała wzrost poziomu obu białek po zastosowaniu cisplatyny oraz ikarytyny, który korelował ze wzrostem ekspresji cykliny Y.

RRM2 jest białkiem, które katalizuje tworzenie deoksyrybonukleotydów z rybonukleotydów [139]. Nadekspresję tego białka wykazano w wielu rodzajach nowotworów, tj. czerniak, rak głowy i szyi, rak piersi oraz rak płuca. Nadekspresja RRM2 wiąże się z opornością na leki i gorszym rokowaniem u pacjentów z rakiem [140–143]. Wang i wsp. badając ekspresję RRM2 u pacjentów z NDRP otrzymujących chemioterapię opartą na platynie wykazali, że niższa ekspresja białka wpływała na zmniejszenie progresji nowotworu oraz lekooporności komórek nowotworowych. Pacjenci z niższą ekspresją RRM2 wykazywali również dłuższe przyżycie [143]. Krajewski i wsp. badając linie czerniaka (A375 oraz RPMI-7951) traktowane cisplatyną wykazali wzrost ekspresji badanego białka po zastosowaniu związku cytotoksycznego. Autorzy wyższą ekspresję RRM2 po traktowaniu cisplatyną osiągnęli w linii RPMI-7951, która wykazuje mutację genu TP53, w porównaniu z linią A375, u której

mutacja TP53 nie występuje [144]. Cisplatyna indukuje białko p53, które stymuluje inhibitor p21^{WAF1}, a ten z kolei zatrzymuje progresję cyklu komórkowego. Natomiast mutacja w genie TP53 może znacznie zwiększyć wrażliwość komórek na cisplatynę, podczas gdy akumulacja p53 jest częściowo odpowiedzialna za oporność na ten rodzaj związku [145]. Krajewski i wsp. sugerują również, że degradacja RRM2 może być zależna od p53, w wyniku czego komórki RPMI-7951 z mutacją TP53 gromadzą RRM2. Brak funkcjonalnego p53 zapobiega zatrzymaniu cyklu komórkowego, co prowadzi do zwiększenia puli nukleotydów, których nie można wykorzystać do naprawy DNA. Autorzy zaobserwowali zwiększoną wrażliwość na leczenie cisplatyną komórek z przerzutu czerniaka linii RPMI-7951 z mutacją TP53 w porównaniu z linią komórkową A375 czerniaka pierwotnego z białkiem p53 typu dzikiego. Hamowanie RRM2 przez p53 następuje po supresji mTORC1 (mechanistyczny cel rapamycyny, *ang. mammalian target of rapamycin kinase*) [144].

Przegląd powyższej literatury potwierdził wyniki uzyskane w niniejszej pracy, w których wykazano wzrost ekspresji białka RRM2 w liniach NDRP traktowanych cisplatyną. Wzrost ekspresji zależny jest od aktywności białka p53 i wpływa na zatrzymanie cyklu komórkowego oraz zmniejszenie lekooporności komórek nowotworowych.

Ocena β -kateniny wykazała wzrost ekspresji badanego białka po zastosowaniu czynników indukujących śmierć komórki. β -katenina jest substratem szlaku sygnalizacji Wnt/ β -katenina, który bierze udział w regulacji różnych procesów fizjologicznych, takich jak proliferacja, różnicowanie, apoptoza, migracja, inwazja i utrzymanie prawidłowej homeostazy tkanek w komórkach prawidłowych. Natomiast w przypadku komórek nowotworowych coraz więcej dowodów wskazuje, że rozregulowanie kaskady Wnt/ β -katenina przyczyniało się do rozwoju i progresji niektórych typów nowotworów [146].

W niedrobnokomórkowym raku płuca mutacje β -kateniny są rzadkie, ale sygnalizacja Wnt/ β -katenina odgrywa istotną rolę w tym typie nowotworu, ponieważ hamowanie tego szlaku zmniejsza proliferację komórek [147]. Dostępna literatura wskazuje, że zarówno nadmierna aktywacja, jak i hamowanie szlaku Wnt/ β -katenina wywołuje działanie przeciwnowotworowe, nawet w tym samym typie raka. Duffy i wsp. wykazali, że szlak sygnalizacji Wnt/ β -katenina może obniżyć żywotności komórek, poprzez indukcję apoptozy, gdy szlak jest nadaktywowany, lub poprzez indukowanie zatrzymania i różnicowania cyklu

komórkowego, gdy jest hamowany w złośliwym czerniaku, raku okrężnicy i guzach nerwiaka zarodkowego [148]. Zaobserwowano również korelację między aktywacją szlaku Wnt/ β -katenina, a indukcją apoptozy poprzez szlaki zewnętrzne i wewnętrzne, obejmujące nadekspresję c-myc (Protoonkogen MYC, ang. *MYC Proto-Oncogene*), cykliny D i Bcl-2 (chłoniak z komórek B-2, ang. *B-cell lymphoma 2*), aktywację kaspazy-8, -9 oraz -3, a także obniżenie ekspresji Sox-1 (czynnik transkrypcyjny SRY-Box 1, ang. *SRY-Box Transcription Factor 1*) [149]. Obniżenie ekspresji białka Sox-1 sprzyja aktywacji β -kateniny, która może indukować nadekspresję cykliny D i c-myc, co prowadzi do apoptotycznej śmierci komórki [150]. Stwierdzono, że Sox-1 wiąże β -kateninę, sprzyjając inaktywacji szlaku Wnt/ β -katenina, zmniejszając ekspresję c-myc i cykliny D [151]. Z drugiej strony wykazano, że c-myc i cyklina D indukują apoptozę [152]. Natomiast obniżone poziomy E-kadheryny indukują akumulację jądrowej β -kateniny, która promuje stabilność białka p53 w komórkach nowotworowych. Sugeruje się, że szlak Wnt/ β -katenina może indukować nadekspresję c-myc, co zwiększa poziom p14^{ARF} (inhibitor Mdm2), promując akumulację jądrowego p53 [153].

Wyniki przeprowadzonych do niniejszej rozprawy badań oraz analiza dostępnej literatury sugerują, że początkowe założenia, iż nadekspresja szlaku sygnalizacji Wnt/ β -katenina promuje inicjację, promocję i progresję raka, a także prowadzi do gorszego wyniku klinicznego, mogą być nadmiernym uproszczeniem. Zamiast tego wydaje się, że szlak Wnt, zależny lub niezależny od β -kateniny, może indukować lub hamować kancerogenezę w sposób zależny od kontekstu.

W toku prowadzonych badań na etapie inkubacji komórek linii A549 oraz H1299 z ikarytyną, zaobserwowano powstawanie kryształów. Badania dodatkowe wykonane w celu oceny kryształów wykazały ich nieorganiczny charakter przy zastosowaniu mikroskopu polaryzacyjnego. Analiza medium hodowlanego z dodatkiem ikarytyny w czasie 48 godzin nie wykazała formowania się kryształów, natomiast ocena przyżyciowa komórek obu linii traktowanych ikarytyną z zastosowaniem mikroskopu kontrastowo-fazowego w czasie 48 godzin ujawniła proces formowania się kryształów prawdopodobnie w komórkach (zaobserwowano, że powstające kryształy przebijają błonę komórkową). Istotny również jest fakt, że większa ilość kryształów oraz ich charakterystyczny wygląd przypominający romb wykazano w komórkach linii H1299. Komórki linii H1299 będące przerzutem

niedrobnokomórkowego raka płuca charakteryzują się zwiększonym metabolizmem w porównaniu z komórkami linii A549. Przedstawione wyniki badań sugerują krystalizację ikarytyny w obecności metabolizujących komórek. Ponadto w dostępnej literaturze nie znaleziono żadnych informacji na temat krystalizacji ikarytyny w komórkach. Ikarytyna ze względu na swoje działanie cytotoksyczne wobec komórek nowotworowych oraz ochronne wobec komórek prawidłowych wykazuje warunki do wykorzystania jej w terapii onkologicznej. Za pośrednictwem bazy *ClinicalTrials.gov* znaleziono informacje na temat prowadzonych badań klinicznych z wykorzystaniem ikarytyny jako przyszłego leku stosowanego w chemioterapii („Icaritin Soft Capsule Versus Huachansu Tablet in the First-line Treatment of Unresectable Hepatocellular Carcinoma With Poor Conditions and Biomarker Enrichment (Biomarker Enrichment Study of Poor Prognosis HCC Patients”, BESTPOP); [NCT05594927](#)). Opisywane badania aktualnie rozpoczynają swój trzeci etap [154].

Wyniki badań dodatkowych z użyciem ikarytyny wykazują potencjalne zagrożenie stosowania jej w leczeniu. Efekt uboczny w postaci krystalizacji ikarytyny może negatywnie wpływać na terapię i stanowić potencjalne zagrożenie dla pacjentów onkologicznych.

Podsumowując, wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej wykazały, że komórki linii A549 oraz H1299 cechowała wrażliwość na cisplatynę oraz ikarytynę. Rodzaj odpowiedzi komórkowej po zastosowaniu cytostatyków zależał od stężenia oraz rodzaju związku, czasu inkubacji, a także charakterystyki linii komórkowej. Komórki linii A549 posiadającej aktywne białko p53, wykazywały wyższą wrażliwość na zastosowane cytostatyki, w porównaniu z linią H1299, która charakteryzuje się częściową delecją genu TP53. Dowiedziono również, że zarówno cisplatyna jak i ikarytyna indukowały powstawanie zmian w morfologii komórek obu linii. Do najczęściej występujących modyfikacji należało powstawanie komórek powiększonych z powiększonym jądrem komórkowym. Zaobserwowano również nieodwracalną wakuolizację cytoplazmy w liniach komórkowych A549 oraz H1299, która mogła prowadzić do śmierci komórek. Natomiast występowanie komórek z mikro- oraz multinukleacją sugeruje powstawanie komórek o fenotypie katastrofy mitotycznej, a zwiększenie przestrzeni międzykomórkowych najczęściej spowodowane było zatrzymaniem proliferacji komórek danej linii. Traktowanie komórek obu linii wpływało na zmiany w cyklu komórkowym. Po zastosowaniu cisplatyny zaobserwowano zatrzymanie cyklu

komórkowego obu linii w fazie G2/M, natomiast po zastosowaniu ikarytyny zwiększył się odsetek komórek w fazie G0/G1, co związane było prawdopodobnie z aktywacją sygnalizacji AMPK. Związki cytotoksyczne wpływały także na zmniejszenie ilości tworzonych kolonii oraz migracji komórek, natomiast ikarytyna wpływała również na zmniejszenie tempa migracji komórek linii A549 oraz H1299. Zmniejszenie potencjału migracyjnego komórek wynikać może z zatrzymania EMT wywołanego na drodze różnych szlaków tj. szlak sygnalizacji Notch, szlak sygnalizacji Akt/mTOR lub szlak sygnalizacji PTEN/Akt/HIF-1 α . Ocena rodzaju indukowanej śmierci wykazała, że ikarytyna oraz cisplatyna indukowały śmierć komórek badanych linii na drodze apoptozy, co może być związane z aktywacją szlaku AMPK. Ocena ekspresji cykliny Y w niniejszej rozprawie doktorskiej wykazała wzrost ekspresji badanego białka, który zależał od czasu inkubacji, rodzaju, a także dawki zastosowanego związku. Najwyższą ekspresję badanego białka uzyskano po 48 godzinach inkubacji z cisplatyną w stężeniu 30 μ M w obu liniach komórkowych. Wzrost ekspresji cykliny Y korelował ze zmniejszeniem proliferacji, ilości tworzonych kolonii, migracji, a także obniżeniem tempa migracji komórek linii A549 oraz H1299 po zastosowaniu związków cytotoksycznych, co może mieć związek ze szlakiem AMPK, którego cyklina Y jest substratem. Ocena ekspresji innych białek wykazała wzrost białka RRM2 oraz β -kateniny w badanych liniach, który zaobserwowano po zastosowaniu cisplatyny oraz ikarytyny. Wzrost ekspresji RRM2 zależny był od aktywności białka p53. W przypadku β -kateniny, wzrost ekspresji mógł korelować ze zwiększoną apoptozą komórek nowotworowych. Na podstawie badań dodatkowych wykazano wewnątrzkomórkowe tworzenie się kryształów ikarytyny. Ikarytyna to związek, który jest już w trakcie trzeciego etapu badań klinicznych w walce z chorobami nowotworowymi. Przedstawione wyniki wykazują potencjalne zagrożenie stosowania tego związku w terapii nowotworowej ze względu na efekt uboczny w postaci formowania się kryształów.

6. Wnioski

1. Komórki linii A549 oraz H1299 wykazują wrażliwość na cisplatynę oraz ikarytynę. Zastosowanie cytostatyków powodowało zatrzymanie proliferacji komórek wynikające z indukcji procesu apoptozy, a także zatrzymania cyklu komórkowego.
2. Zarówno cisplatyna jak i ikarytyna indukowały powstawanie zmian w morfologii komórek obu linii. Do najczęściej występujących modyfikacji można zaliczyć powstawanie komórek powiększonych z powiększonym jądrem komórkowym, wakuolizację cytoplazmy, występowanie komórek z mikrojądrami oraz zwiększenie przestrzeni międzykomórkowych.
3. Cisplatyna i ikarytyna wpływały na zmniejszenie ilości tworzonych kolonii oraz zmniejszenie migracji komórek obu linii. Natomiast ikarytyna powodowała zmniejszenie tempa migracji komórek linii A549 oraz H1299.
4. Wzrost ekspresji cykliny Y zależał od czasu, rodzaju oraz dawki zastosowanego związku. Indukcja cykliny Y korelowała ze zmniejszeniem potencjału proliferacyjnego oraz migracyjnego komórek linii A549 oraz H1299 po zastosowaniu związków cytotoksycznych, co może mieć związek ze szlakiem AMPK, którego cyklina Y jest substratem.
5. Na podstawie badań dodatkowych wykazano wewnątrzkomórkowe tworzenie się kryształów ikarytyny. Ikarytyna to związek, który jest już w trakcie trzeciego etapu badań klinicznych. Przedstawione wyniki wykazują potencjalne zagrożenie stosowania tego związku w terapii nowotworowej ze względu na efekt uboczny w postaci formowania się kryształów.

7. Streszczenie

Choroby nowotworowe stanowią problem globalny. Jedną z głównych cech komórek nowotworowych jest niekontrolowana proliferacja, dlatego też nowotwory ze względu na występujące w nich aberracje nazywane są często „chorobami cyklu komórkowego”. Cykl komórkowy regulowany jest przez szereg białek oraz punktów kontrolnych mających za zadanie monitorowanie przebiegu poszczególnych faz cyklu komórkowego oraz decydujących o warunkowym przejściu do kolejnych jego etapów. Do głównych regulatorów cyklu komórkowego należą cykliny i kinazy cyklinozależne (CDKs). Deregulacja ekspresji białek cyklu podziałowego staje się obecnie przedmiotem intensywnych badań, ponieważ zaburzenia w ich ekspresji i regulacji mogą przyczyniać się do procesu kancerogenezy. Cyklina Y zdefiniowana została jako białko, które może łączyć ze sobą przebieg cyklu komórkowego z procesem transkrypcji, ale także jako regulator szlaku sygnałowego Wnt. Wykazano, że obecność cykliny Y w kompleksie z CDK14 wpływa na promowanie niekanonicznej ścieżki szlaku Wnt, poprzez wzmożenie ekspresji białek będących substratami opisywanego szlaku. Ponadto ekspresja cykliny Y odgrywa ważną rolę w procesach nowotworzenia. Niedrobnokomórkowy rak płuca wykazuje nadekspresję cykliny Y, a ekspresja cykliny Y dodatnio koreluje z podtypami histologicznymi NDRP (tj. rak płaskonabłonkowy i gruczolakorak), a także z wielkością guza. Natomiast spadek ekspresji cykliny Y w linii NDRP prowadzi do zahamowania proliferacji komórek nowotworowych.

W niniejszej rozprawie doktorskiej materiał badawczy stanowiły linie niedrobnokomórkowego raka płuca A549 posiadająca aktywne białko p53 oraz linia H1299, która pozbawiona jest aktywnego białka p53. Obie linie komórkowe poddano działaniu cisplatyny w stężeniu 10 i 30 μM oraz ikarytyny w stężeniu 30 i 60 μM , a po traktowaniu powyższymi związkami zbadano ekspresję cykliny Y. Ocenie poddano również zmiany w morfologii komórek, cyklu komórkowym, a także potencjał migracyjny komórek oraz rodzaj indukowanej śmierci. Ze względu na nieprzewidziane wcześniej wyniki po traktowaniu komórek ikarytyną, związane z formowaniem się kryształów, wykonano ich szczegółową analizę z zastosowaniem mikroskopu polaryzacyjnego oraz kontrastowo-fazowego.

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że komórki linii A549 oraz H1299, wykazywały wrażliwość na cisplatynę i ikarytynę. Wraz ze wzrostem stężenia związków oraz

wydłużeniem czasu inkubacji ilość komórek uległa obniżeniu, co może mieć związek z zatrzymaniem cyklu komórkowego oraz indukcją śmierci komórek obu linii. Wykazano, że cisplatyna wpływała na zwiększenie odsetka komórek obu linii w fazie G2/M cyklu komórkowego. Natomiast ocena rodzajów śmierci komórki dostarczyła informacji, że ikarytyna indukowała śmierć komórek obu linii na drodze apoptozy. W przypadku cisplatyny tylko w linii H1299 wykazano istotny statystycznie wzrost odsetka komórek późno-apoptotycznych. Ponadto, ocena potencjału migracyjnego komórek wykazała, że oba związki wpływały na zmniejszenie ilości tworzonych kolonii oraz migracji komórek obu linii. Natomiast ikarytyna powodowała obniżenie tempa migracji komórek linii A549 oraz H1299. W powyższych badaniach wykazano również, że wzrost ekspresji cykliny Y zależy od czasu inkubacji, a także rodzaju oraz dawki zastosowanego związku. Wzrost ekspresji cykliny Y korelował ze zmniejszeniem proliferacji, ilości tworzonych kolonii, migracji, a także tempa migracji komórek linii A549 oraz H1299 po zastosowaniu związków cytotoksycznych.

Na podstawie badań dodatkowych wykazano wewnątrzkomórkowe tworzenie się kryształów ikarytyny. Ikarytyna to związek, który jest już w trakcie trzeciego etapu badań klinicznych. Przedstawione wyniki sugerują potencjalne zagrożenie stosowania tego związku w terapii nowotworowej, ze względu na efekt uboczny w postaci formowania się kryształów.

Podsumowując, uzyskane w trakcie realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej wyniki wykazały, że poziom ekspresji cykliny Y wzrasta po zastosowaniu czynników indukujących śmierć komórki. Ekspresja badanego białka wzrastała wraz ze zwiększeniem dawek cisplatyny oraz ikarytyny, a także z dłuższym czasem inkubacji ze związkami. Wzrost ekspresji cykliny Y korelował z zatrzymaniem cyklu komórkowego, wzrostem odsetka komórek apoptotycznych, a także z hamowaniem potencjału migracyjnego komórek obu linii. Wyniki badań dodatkowych, w których oceniono powstawanie kryształów sugerują, że ikarytyna może stanowić potencjalne zagrożenie w leczeniu onkologicznym. Na podstawie przedstawionych wyników, za zasadne uznaje się, że dokładne poznanie mechanizmów działania białek cyklu komórkowego jest istotne w aspekcie ich znaczenia w prewencji, diagnostyce i leczeniu chorób nowotworowych.

8. Summary

Cancer is a global problem. One of the main characteristics of cancer cells is uncontrolled proliferation, which is why cancers, due to the aberrations occurring in them, are often called "cell cycle diseases." The cell cycle is regulated by several proteins and checkpoints whose task is to monitor the course of individual phases of the cell cycle and determine the conditional transition to its following stages. The leading group of cell cycle regulators includes cyclins and cyclin-dependent kinases (CDKs). Deregulation of the expression of the division cycle proteins is currently becoming the subject of intensive research because their expression and regulation disorders may contribute to carcinogenesis. Cyclin Y has been defined as a protein that can connect the course of the cell cycle with the transcription process but also as a regulator of the Wnt signaling pathway. It was shown that the presence of cyclin Y in the complex with CDK14 affects the promotion of the non-canonical path of the Wnt pathway by enhancing the expression of proteins that are substrates of the described pathway. In addition, the expression of cyclin Y plays an important role in carcinogenesis. NSCLC overexpresses cyclin Y, and cyclin Y expression positively correlates with the histological subtypes of NSCLC (i.e., squamous cell carcinoma and adenocarcinoma) and with tumor size. On the other hand, the decrease in cyclin Y expression in the NSCLC line leads to the inhibition of cancer cell proliferation.

In this doctoral thesis, the research material was the A549 non-small cell lung cancer line with the active p53 protein and the H1299 line devoid of functional p53 protein. Both cell lines were exposed to cisplatin at a concentration of 10 and 30 μM and icaritin at a concentration of 30 and 60 μM . After treatment with the above compounds, the expression of cyclin Y was examined. Furthermore, due to the previously unpredictable results after the treatment of cells with icaritin related to the formation of crystals, their detailed analysis was performed using a polarizing and phase-contrast microscope.

The results of the study showed that the cells of the A549 and H1299 lines were sensitive to cisplatin and icaritin. With the increase in the concentration of compounds and the extension of the incubation time, the number of cells decreased, which may be related to the arrest of the cell cycle and the induction of cell death in both lines. Furthermore, it was shown that cisplatin increased the percentage of cells of both lines in the G2/M phase of the

cell cycle. However, the assessment of the types of cell death provided information that icaritin induced cell death of both lineages by apoptosis. In the case of cisplatin, only the H1299 line showed a statistically significant increase in the percentage of late-apoptotic cells. In addition, the assessment of the migration potential of cells showed that both compounds reduced the number of colonies formed and the migration of cells of both lines. On the other hand, icaritin reduced the migration rate of A549 and H1299 cells. The above studies also showed that the increase in cyclin Y expression depends on the incubation time and the type and dose of the compound used. The increase in cyclin Y expression correlated with a decrease in proliferation, the number of colonies formed, migration, and the migration rate of A549 and H1299 cells after using cytotoxic compounds.

Additional studies have demonstrated the intracellular formation of icaritin crystals. Icaritin is a compound already in the third stage of clinical trials. The presented results showed the potential risk of using this compound in cancer therapy due to the side effect of crystal formation.

In conclusion, the results obtained during the implementation of this doctoral dissertation showed that the expression level of cyclin Y increases after using cell death-inducing agents. The expression of the tested protein increased with increasing doses of cisplatin and icaritin and with longer incubation time with the compounds. The cyclin Y upregulation was correlated with cell cycle arrest, an increase in the percentage of apoptotic cells, and the inhibition of the migration potential of cells of both lines. The results of additional studies that evaluated the formation of crystals suggest that icaritin may be a potential threat in oncological treatment. Based on the presented results, it is considered reasonable that a thorough understanding of the mechanisms of action of cell cycle proteins is important in the prevention, diagnosis, and treatment of cancer.

9. Piśmiennictwo

1. Global Burden of Disease Cancer Collaboration; Fitzmaurice, C.; Allen, C.; Barber, R.M.; Barregard, L.; Bhutta, Z.A.; Brenner, H.; Dicker, D.J.; Chimed-Orchir, O.; Dandona, R.; et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol.* **2017**, *3*, 524, doi:10.1001/jamaoncol.2016.5688.
2. Raudenská, M.; Navrátil, J.; Gumulec, J.; Masařík, M. Mechanobiology of Cancerogenesis. *Klin. Onkol.* **2021**, doi:10.48095/ccko2021202.
3. Matthews, H.K.; Bertoli, C.; de Bruin, R.A.M. Cell Cycle Control in Cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2022**, *23*, 74–88, doi:10.1038/s41580-021-00404-3.
4. van den Heuvel, S. Cell-Cycle Regulation. *WormBook* **2005**, doi:10.1895/wormbook.1.28.1.
5. Lim, S.; Kaldis, P. Cdks, Cyclins and CKIs: Roles beyond Cell Cycle Regulation. *Development* **2013**, *140*, 3079–3093, doi:10.1242/dev.091744.
6. Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Parkin, D.M.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Bray, F. Cancer Statistics for the Year 2020: An Overview. *Int. J. Cancer* **2021**, *149*, 778–789, doi:10.1002/ijc.33588.
7. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249, doi:10.3322/caac.21660.
8. *GLOBOCAN*; p. <https://www.uicc.org/news/globocan-2020-new-global-cancer-data>;
9. Park, M.-T.; Lee, S.-J. Cell Cycle and Cancer. *BMB Rep.* **2003**, *36*, 60–65, doi:10.5483/BMBRep.2003.36.1.060.
10. Phillips, D.H. Chemical Carcinogens. In *Oxford Textbook of Cancer Biology*; Pezzella, F., Tavassoli, M., Kerr, D.J., Eds.; Oxford University Press, 2019; pp. 79–90 ISBN 978-0-19-877945-2.
11. Berger, N.A. Obesity and Cancer Pathogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2014**, *1311*, 57–76, doi:10.1111/nyas.12416.
12. Debela, D.T.; Muzazu, S.G.; Heraro, K.D.; Ndalama, M.T.; Mesele, B.W.; Haile, D.C.; Kitui, S.K.; Manyazewal, T. New Approaches and Procedures for Cancer Treatment: Current Perspectives. *SAGE Open Med.* **2021**, *9*, 205031212110343, doi:10.1177/20503121211034366.

13. Arruebo, M.; Vilaboa, N.; Sáez-Gutierrez, B.; Lambea, J.; Tres, A.; Valladares, M.; González-Fernández, Á. Assessment of the Evolution of Cancer Treatment Therapies. *Cancers* **2011**, *3*, 3279–3330, doi:10.3390/cancers3033279.
14. Pucci, C.; Martinelli, C.; Ciofani, G. Innovative Approaches for Cancer Treatment: Current Perspectives and New Challenges. *ecancermedicalscience* **2019**, *13*, doi:10.3332/ecancer.2019.961.
15. Dela Cruz, C.S.; Tanoue, L.T.; Matthay, R.A. Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clin. Chest Med.* **2011**, *32*, 605–644, doi:10.1016/j.ccm.2011.09.001.
16. Schabath, M.B.; Cote, M.L. Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2019**, *28*, 1563–1579, doi:10.1158/1055-9965.EPI-19-0221.
17. Didkowska, J.; Wojciechowska, U.; Michalek, I.M.; Caetano dos Santos, F.L. Cancer Incidence and Mortality in Poland in 2019. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 10875, doi:10.1038/s41598-022-14779-6.
18. Yamasaki, L. Role of the RB Tumor Suppressor in Cancer. In *Signal Transduction in Cancer*; Frank, D.A., Ed.; Cancer Treatment and Research; Kluwer Academic Publishers: Boston, 2004; Vol. 115, pp. 209–239 ISBN 978-1-4020-7340-3.
19. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2018: Cancer Statistics, 2018. *CA. Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 7–30, doi:10.3322/caac.21442.
20. de Groot, P.M.; Wu, C.C.; Carter, B.W.; Munden, R.F. The Epidemiology of Lung Cancer. *Transl. Lung Cancer Res.* **2018**, *7*, 220–233, doi:10.21037/tlcr.2018.05.06.
21. Kosacka, M.; Jankowska, R. The Epidemiology of Lung Cancer. *Adv. Respir. Med.* **2007**, *75*, 76–80, doi:10.5603/ARM.28011.
22. Giard, D.J.; Aaronson, S.A.; Todaro, G.J.; Arnstein, P.; Kersey, J.H.; Dosik, H.; Parks, W.P. In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumors2. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **1973**, *51*, 1417–1423, doi:10.1093/jnci/51.5.1417.
23. Phelps, R.M.; Johnson, B.E.; Ihde, D.C.; Gazdar, A.F.; Carbone, D.P.; McClintock, P.R.; Linnoila, R.I.; Matthews, M.J.; Bunn, P.A.; Carney, D.; et al. NCI-Navy Medical Oncology Branch Cell Line Data Base. *J. Cell. Biochem.* **1996**, *63*, 32–91, doi:10.1002/jcb.240630505.
24. Giaccone, G.; Battey, J.; Gazdar, A.F.; Oie, H.; Draoui, M.; Moody, T.W. Neuromedin B Is Present in Lung Cancer Cell Lines. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 2732s–2736s.
25. Lin, D.-L.; Chang, C. P53 Is a Mediator for Radiation-Repressed Human TR2 Orphan Receptor Expression in MCF-7 Cells, a New Pathway from Tumor Suppressor to Member of the Steroid Receptor Superfamily. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 14649–14652, doi:10.1074/jbc.271.25.14649.

26. Williams, G.H.; Stoeber, K. The Cell Cycle and Cancer. *J. Pathol.* **2012**, *226*, 352–364, doi:10.1002/path.3022.
27. Coffman, J.A. Cell Cycle Development. *Dev. Cell* **2004**, *6*, 321–327, doi:10.1016/S1534-5807(04)00067-X.
28. Stallaert, W.; Kedziora, K.M.; Taylor, C.D.; Zikry, T.M.; Ranek, J.S.; Sobon, H.K.; Taylor, S.R.; Young, C.L.; Cook, J.G.; Purvis, J.E. The Structure of the Human Cell Cycle. *Cell Syst.* **2022**, *13*, 230-240.e3, doi:10.1016/j.cels.2021.10.007.
29. Wang, Z. Cell Cycle Progression and Synchronization: An Overview. In *Cell-Cycle Synchronization*; Wang, Z., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer US: New York, NY, 2022; Vol. 2579, pp. 3–23 ISBN 978-1-07-162735-8.
30. Schafer, K.A. The Cell Cycle: A Review. *Vet. Pathol.* **1998**, *35*, 461–478, doi:10.1177/030098589803500601.
31. Chen, J. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of P53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2016**, *6*, a026104, doi:10.1101/cshperspect.a026104.
32. Cell-Cycle Checkpoints and Aneuploidy on the Path to Cancer. *In Vivo* **2018**, *32*, doi:10.21873/invivo.11197.
33. Uzbekov, R.; Prigent, C. A Journey through Time on the Discovery of Cell Cycle Regulation. *Cells* **2022**, *11*, 704, doi:10.3390/cells11040704.
34. Żuryń, A.; Opacka, A.; Krajewski, A.; Zielińska, W.; Grzanka, A. The Less Known Cyclins—Uncovered. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 2320, doi:10.3390/app11052320.
35. Liu, D.; Finley, R.L. Cyclin Y Is a Novel Conserved Cyclin Essential for Development in *Drosophila*. *Genetics* **2010**, *184*, 1025–1035, doi:10.1534/genetics.110.114017.
36. Safran, M.; Rosen, N.; Twik, M.; BarShir, R.; Stein, T.I.; Dahary, D.; Fishilevich, S.; Lancet, D. The GeneCards Suite. In *Practical Guide to Life Science Databases*; Abugessaisa, I., Kasukawa, T., Eds.; Springer Nature Singapore: Singapore, 2021; pp. 27–56 ISBN 9789811658112.
37. Cho, E.; Kim, D.-H.; Hur, Y.-N.; Whitcomb, D.J.; Regan, P.; Hong, J.-H.; Kim, H.; Ho Suh, Y.; Cho, K.; Park, M. Cyclin Y Inhibits Plasticity-Induced AMPA Receptor Exocytosis and LTP. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 12624, doi:10.1038/srep12624.
38. Jiang, M.; Gao, Y.; Yang, T.; Zhu, X.; Chen, J. Cyclin Y, a Novel Membrane-Associated Cyclin, Interacts with PFTK1. *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 2171–2178, doi:10.1016/j.febslet.2009.06.010.

39. Mikolcevic, P.; Sigl, R.; Rauch, V.; Hess, M.W.; Pfaller, K.; Barisic, M.; Pelliniemi, L.J.; Boesl, M.; Geley, S. Cyclin-Dependent Kinase 16/PCTAIRE Kinase 1 Is Activated by Cyclin Y and Is Essential for Spermatogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **2012**, *32*, 868–879, doi:10.1128/MCB.06261-11.
40. Joe, I.-S.; Kim, J.-H.; Kim, H.; Hong, J.-H.; Kim, M.; Park, M. Cyclin Y-Mediated Transcript Profiling Reveals Several Important Functional Pathways Regulated by Cyclin Y in Hippocampal Neurons. *PLOS ONE* **2017**, *12*, e0172547, doi:10.1371/journal.pone.0172547.
41. Shi, K.; Ru, Q.; Zhang, C.; Huang, J. Cyclin Y Modulates the Proliferation, Invasion, and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma Cells. *Med. Sci. Monit.* **2018**, *24*, 1642–1653, doi:10.12659/MSM.906075.
42. Pond, K.W.; Doubrovinski, K.; Thorne, C.A. Wnt/ β -Catenin Signaling in Tissue Self-Organization. *Genes* **2020**, *11*, 939, doi:10.3390/genes11080939.
43. Zhan, T.; Rindtorff, N.; Boutros, M. Wnt Signaling in Cancer. *Oncogene* **2017**, *36*, 1461–1473, doi:10.1038/onc.2016.304.
44. Jung, Y.-S.; Park, J.-I. Wnt Signaling in Cancer: Therapeutic Targeting of Wnt Signaling beyond β -Catenin and the Destruction Complex. *Exp. Mol. Med.* **2020**, *52*, 183–191, doi:10.1038/s12276-020-0380-6.
45. Zi, Z.; Zhang, Z.; Li, Q.; An, W.; Zeng, L.; Gao, D.; Yang, Y.; Zhu, X.; Zeng, R.; Shum, W.W.; et al. Correction: CCNYL1, but Not CCNY, Cooperates with CDK16 to Regulate Spermatogenesis in Mouse. *PLOS Genet.* **2019**, *15*, e1008021, doi:10.1371/journal.pgen.1008021.
46. An, W.; Zhang, Z.; Zeng, L.; Yang, Y.; Zhu, X.; Wu, J. Cyclin Y Is Involved in the Regulation of Adipogenesis and Lipid Production. *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0132721, doi:10.1371/journal.pone.0132721.
47. Sun, T.; Co, N.N.; Wong, N. PFTK1 Interacts with Cyclin Y to Activate Non-Canonical Wnt Signaling in Hepatocellular Carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *449*, 163–168, doi:10.1016/j.bbrc.2014.05.002.
48. Wang, X.; Jia, Y.; Fei, C.; Song, X.; Li, L. Activation/Proliferation-Associated Protein 2 (Caprin-2) Positively Regulates CDK14/Cyclin Y-Mediated Lipoprotein Receptor-Related Protein 5 and 6 (LRP5/6) Constitutive Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 26427–26434, doi:10.1074/jbc.M116.744607.
49. Yu, L.; Chen, Y.; Tooze, S.A. Autophagy Pathway: Cellular and Molecular Mechanisms. *Autophagy* **2018**, *14*, 207–215, doi:10.1080/15548627.2017.1378838.
50. Yun, C.; Lee, S. The Roles of Autophagy in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3466, doi:10.3390/ijms19113466.

51. Dohmen, M.; Krieg, S.; Agalaridis, G.; Zhu, X.; Shehata, S.N.; Pfeifferberger, E.; Amelang, J.; Bütepage, M.; Buerova, E.; Pfaff, C.M.; et al. AMPK-Dependent Activation of the Cyclin Y/CDK16 Complex Controls Autophagy. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1032, doi:10.1038/s41467-020-14812-0.
52. Vervoorts, J.; Neumann, D.; Lüscher, B. The CCNY (Cyclin Y)-CDK16 Kinase Complex: A New Regulator of Autophagy Downstream of AMPK. *Autophagy* **2020**, *16*, 1724–1726, doi:10.1080/15548627.2020.1795423.
53. Gatica, D.; Klionsky, D.J. New Tricks of an Old Autophagy Regulator: AMPK-Dependent Regulation of Autophagy through CCNY (Cyclin Y)-CDK16. *Autophagy* **2020**, *16*, 973–974, doi:10.1080/15548627.2020.1756665.
54. Hwang, H.; Hur, Y.-N.; Sohn, H.; Seo, J.; Hong, J.-H.; Cho, E.; Choi, Y.; Lee, S.; Song, S.; Lee, A.-R.; et al. Cyclin Y, a Novel Actin-Binding Protein, Regulates Spine Plasticity through the Cofilin-Actin Pathway. *Prog. Neurobiol.* **2021**, *198*, 101915, doi:10.1016/j.pneurobio.2020.101915.
55. Ou, C.-Y.; Poon, V.Y.; Maeder, C.I.; Watanabe, S.; Lehrman, E.K.; Fu, A.K.Y.; Park, M.; Fu, W.-Y.; Jorgensen, E.M.; Ip, N.Y.; et al. Two Cyclin-Dependent Kinase Pathways Are Essential for Polarized Trafficking of Presynaptic Components. *Cell* **2010**, *141*, 846–858, doi:10.1016/j.cell.2010.04.011.
56. Ross, S.E.; Hemati, N.; Longo, K.A.; Bennett, C.N.; Lucas, P.C.; Erickson, R.L.; MacDougald, O.A. Inhibition of Adipogenesis by Wnt Signaling. *Science* **2000**, *289*, 950–953, doi:10.1126/science.289.5481.950.
57. Kennell, J.A.; MacDougald, O.A. Wnt Signaling Inhibits Adipogenesis through β -Catenin-Dependent and -Independent Mechanisms. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 24004–24010, doi:10.1074/jbc.M501080200.
58. Molinas, A.; Heil, S.; Koch, S. The Candidate IBD Risk Gene CCNY Is Dispensable for Intestinal Epithelial Homeostasis. *Cells* **2021**, *10*, 2330, doi:10.3390/cells10092330.
59. Kyselova, A.; Siragusa, M.; Anthes, J.; Solari, F.A.; Lorocho, S.; Zahedi, R.P.; Walter, U.; Fleming, I.; Randriamboavonjy, V. Cyclin Y Is Expressed in Platelets and Modulates Integrin Outside-in Signaling. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8239, doi:10.3390/ijms21218239.
60. Yue, W.; Zhao, X.; Zhang, L.; Liu, Z.; Ma, L.; Jia, W.; Qian, Z.; Zhang, C.; Wang, Y.; Yang, X.; et al. Overexpression of Cyclin Y in Non-Small Cell Lung Cancer Is Associated with Cancer Cell Proliferation. *Sci. China Life Sci.* **2010**, *53*, 511–516, doi:10.1007/s11427-010-0090-8.
61. Casimiro, M.C.; Crosariol, M.; Loro, E.; Li, Z.; Pestell, R.G. Cyclins and Cell Cycle Control in Cancer and Disease. *Genes Cancer* **2012**, *3*, 649–657, doi:10.1177/1947601913479022.

62. Liu, D.; Guest, S.; Finley, R.L. Why Cyclin Y? A Highly Conserved Cyclin with Essential Functions: A Highly Conserved Cyclin with Essential Functions. *Fly (Austin)* **2010**, *4*, 278–282, doi:10.4161/fly.4.4.12881.
63. Davidson, G.; Niehrs, C. Emerging Links between CDK Cell Cycle Regulators and Wnt Signaling. *Trends Cell Biol.* **2010**, *20*, 453–460, doi:10.1016/j.tcb.2010.05.002.
64. Xu, Y.; Wang, Z.; Wang, J.; Li, J.; Wang, H.; Yue, W. Lentivirus-Mediated Knockdown of Cyclin Y (CCNY) Inhibits Glioma Cell Proliferation. *Oncol. Res. Featur. Preclin. Clin. Cancer Ther.* **2009**, *18*, 359–364, doi:10.3727/096504010X12644422320582.
65. Spiering, D.; Hodgson, L. Dynamics of the Rho-Family Small GTPases in Actin Regulation and Motility. *Cell Adhes. Migr.* **2011**, *5*, 170–180, doi:10.4161/cam.5.2.14403.
66. Yue, W.; Zhao, X.; Zhang, L.; Xu, S.; Liu, Z.; Ma, L.; Jia, W.; Qian, Z.; Zhang, C.; Wang, Y.; et al. Cell Cycle Protein Cyclin Y Is Associated With Human Non-Small-Cell Lung Cancer Proliferation and Tumorigenesis. *Clin. Lung Cancer* **2011**, *12*, 43–50, doi:10.3816/CLC.2011.n.006.
67. Hou, J.; Meng, F.; Chan, L.W.C.; Cho, W.C.S.; Wong, S.C.C. Circulating Plasma MicroRNAs As Diagnostic Markers for NSCLC. *Front. Genet.* **2016**, *7*, doi:10.3389/fgene.2016.00193.
68. Liu, H.; Shi, H.; Fan, Q.; Sun, X. Cyclin Y Regulates the Proliferation, Migration, and Invasion of Ovarian Cancer Cells via Wnt Signaling Pathway. *Tumor Biol.* **2016**, *37*, 10161–10175, doi:10.1007/s13277-016-4818-3.
69. Yan, F.; Wang, X.; Zhu, M.; Hu, X. RNAi-Mediated Downregulation of Cyclin Y to Attenuate Human Breast Cancer Cell Growth. *Oncol. Rep.* **2016**, *36*, 2793–2799, doi:10.3892/or.2016.5126.
70. Pfeiffer, C.; Singh, A. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 448, doi:10.3390/ijms19020448.
71. Kroemer, G.; Galluzzi, L.; Vandenabeele, P.; Abrams, J.; Alnemri, E.S.; Baehrecke, E.H.; Blagosklonny, M.V.; El-Deiry, W.S.; Golstein, P.; Green, D.R.; et al. Classification of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* **2009**, *16*, 3–11, doi:10.1038/cdd.2008.150.
72. Galluzzi, L.; Vitale, I.; Aaronson, S.A.; Abrams, J.M.; Adam, D.; Agostinis, P.; Alnemri, E.S.; Altucci, L.; Amelio, I.; Andrews, D.W.; et al. Molecular Mechanisms of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 486–541, doi:10.1038/s41418-017-0012-4.
73. Tang, D.; Kang, R.; Berghe, T.V.; Vandenabeele, P.; Kroemer, G. The Molecular Machinery of Regulated Cell Death. *Cell Res.* **2019**, *29*, 347–364, doi:10.1038/s41422-019-0164-5.

74. Sato, A.; Hiramoto, A.; Kim, H.-S.; Wataya, Y. Anticancer Strategy Targeting Cell Death Regulators: Switching the Mechanism of Anticancer Floxuridine-Induced Cell Death from Necrosis to Apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5876, doi:10.3390/ijms21165876.
75. Das, P.; Saha, S.; BoseDasgupta, S. The Ultimate Fate Determinants of Drug Induced Cell-Death Mechanisms in Trypanosomatids. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2021**, *15*, 81–91, doi:10.1016/j.ijpddr.2021.01.003.
76. Dasari, S.; Bernard Tchounwou, P. Cisplatin in Cancer Therapy: Molecular Mechanisms of Action. *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, *740*, 364–378, doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.025.
77. Ozols, R.F.; Bundy, B.N.; Greer, B.E.; Fowler, J.M.; Clarke-Pearson, D.; Burger, R.A.; Mannel, R.S.; DeGeest, K.; Hartenbach, E.M.; Baergen, R. Phase III Trial of Carboplatin and Paclitaxel Compared With Cisplatin and Paclitaxel in Patients With Optimally Resected Stage III Ovarian Cancer: A Gynecologic Oncology Group Study. *J. Clin. Oncol.* **2003**, *21*, 3194–3200, doi:10.1200/JCO.2003.02.153.
78. Kondagunta, G.V.; Bacik, J.; Donadio, A.; Bajorin, D.; Marion, S.; Sheinfeld, J.; Bosl, G.J.; Motzer, R.J. Combination of Paclitaxel, Ifosfamide, and Cisplatin Is an Effective Second-Line Therapy for Patients With Relapsed Testicular Germ Cell Tumors. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 6549–6555, doi:10.1200/JCO.2005.19.638.
79. Dilruba, S.; Kalayda, G.V. Platinum-Based Drugs: Past, Present and Future. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2016**, *77*, 1103–1124, doi:10.1007/s00280-016-2976-z.
80. L. Trynda-Lemiesz, U. Śliwińska-Hill Kompleksy Metali w Terapii Nowotworowej. Teraźniejszość i Przyszłość. *Journal of Oncology* **2011**.
81. Jamieson, E.R.; Lippard, S.J. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin–DNA Adducts. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2467–2498, doi:10.1021/cr980421n.
82. Achkar, I.W.; Abdulrahman, N.; Al-Sulaiti, H.; Joseph, J.M.; Uddin, S.; Mraiche, F. Cisplatin Based Therapy: The Role of the Mitogen Activated Protein Kinase Signaling Pathway. *J. Transl. Med.* **2018**, *16*, 96, doi:10.1186/s12967-018-1471-1.
83. Singh, L.; Aldosary, S.; Saeedan, A.S.; Ansari, Mohd.N.; Kaithwas, G. Prolyl Hydroxylase 2: A Promising Target to Inhibit Hypoxia-Induced Cellular Metabolism in Cancer Cells. *Drug Discov. Today* **2018**, *23*, 1873–1882, doi:10.1016/j.drudis.2018.05.016.
84. Siddik, Z.H. Cisplatin: Mode of Cytotoxic Action and Molecular Basis of Resistance. *Oncogene* **2003**, *22*, 7265–7279, doi:10.1038/sj.onc.1206933.
85. Kelland, L. The Resurgence of Platinum-Based Cancer Chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 573–584, doi:10.1038/nrc2167.

86. Barabas, K.; Milner, R.; Lurie, D.; Adin, C. Cisplatin: A Review of Toxicities and Therapeutic Applications. *Vet. Comp. Oncol.* **2008**, *6*, 1–18, doi:10.1111/j.1476-5829.2007.00142.x.
87. Li, Z.-J.; Yao, C.; Liu, S.-F.; Chen, L.; Xi, Y.-M.; Zhang, W.; Zhang, G.-S. Cytotoxic Effect of Icaritin and Its Mechanisms in Inducing Apoptosis in Human Burkitt Lymphoma Cell Line. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 1–7, doi:10.1155/2014/391512.
88. Icaritin <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Icaritin>.
89. Hu, J.; Wu, X.; Yang, C.; Rashid, K.; Ma, C.; Hu, M.; Ding, Q.; Jiang, H. Anticancer Effect of Icaritin on Prostate Cancer via Regulating MiR-381-3p and Its Target Gene UBE2C. *Cancer Med.* **2019**, *8*, 7833–7845, doi:10.1002/cam4.2630.
90. Wang, Z.-D.; Wang, R.-Z.; Xia, Y.-Z.; Kong, L.-Y.; Yang, L. Reversal of Multidrug Resistance by Icaritin in Doxorubicin-Resistant Human Osteosarcoma Cells. *Chin. J. Nat. Med.* **2018**, *16*, 20–28, doi:10.1016/S1875-5364(18)30026-8.
91. Liao, J.; Liu, Y.; Wu, H.; Zhao, M.; Tan, Y.; Li, D.; Long, H.; Dai, Y.; Yung, S.; Chan, T.-M.; et al. The Role of Icaritin in Regulating Foxp3/IL17a Balance in Systemic Lupus Erythematosus and Its Effects on the Treatment of MRL/Lpr Mice. *Clin. Immunol.* **2016**, *162*, 74–83, doi:10.1016/j.clim.2015.11.006.
92. Wang, Z.; Zhang, X.; Wang, H.; Qi, L.; Lou, Y. Neuroprotective Effects of Icaritin against Beta Amyloid-Induced Neurotoxicity in Primary Cultured Rat Neuronal Cells via Estrogen-Dependent Pathway. *Neuroscience* **2007**, *145*, 911–922, doi:10.1016/j.neuroscience.2006.12.059.
93. Zhu, D.; Lou, Y. Inducible Effects of Icaritin, Icaritin, and Desmethylicaritin on Directional Differentiation of Embryonic Stem Cells into Cardiomyocytes in Vitro¹. *Acta Pharmacol. Sin.* **2005**, *26*, 477–485, doi:10.1111/j.1745-7254.2005.00076.x.
94. Liu, Y.-Q.; Yang, Q.-X.; Cheng, M.-C.; Xiao, H.-B. Synergistic Inhibitory Effect of Icariside II with Icaritin from Herba Epimedii on Pre-Osteoclastic RAW264.7 Cell Growth. *Phytomedicine* **2014**, *21*, 1633–1637, doi:10.1016/j.phymed.2014.07.016.
95. Liu, Y.; Shi, L.; Liu, Y.; Li, P.; Jiang, G.; Gao, X.; Zhang, Y.; Jiang, C.; Zhu, W.; Han, H.; et al. Activation of PPAR γ Mediates Icaritin-Induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Glioblastoma Multiforme. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *100*, 358–366, doi:10.1016/j.biopha.2018.02.006.
96. Zhu, S.; Wang, Z.; Li, Z.; Peng, H.; Luo, Y.; Deng, M.; Li, R.; Dai, C.; Xu, Y.; Liu, S.; et al. Icaritin Suppresses Multiple Myeloma, by Inhibiting IL-6/JAK2/STAT3. *Oncotarget* **2015**, *6*, 10460–10472, doi:10.18632/oncotarget.3399.

97. Li, C.; Peng, W.; Song, X.; Wang, Q.; Wang, W. Anticancer Effect of Icaritin Inhibits Cell Growth of Colon Cancer through Reactive Oxygen Species, Bcl-2 and Cyclin D1/E Signaling. *Oncol. Lett.* **2016**, *12*, 3537–3542, doi:10.3892/ol.2016.5089.
98. Wu, T.; Wang, S.; Wu, J.; Lin, Z.; Sui, X.; Xu, X.; Shimizu, N.; Chen, B.; Wang, X. Icaritin Induces Lytic Cytotoxicity in Extranodal NK/T-Cell Lymphoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2015**, *34*, 17, doi:10.1186/s13046-015-0133-x.
99. Han, H.; Xu, B.; Hou, P.; Jiang, C.; Liu, L.; Tang, M.; Yang, X.; Zhang, Y.; Liu, Y. Icaritin Sensitizes Human Glioblastoma Cells to TRAIL-Induced Apoptosis. *Cell Biochem. Biophys.* **2015**, *72*, 533–542, doi:10.1007/s12013-014-0499-y.
100. Sun, L.; Peng, Q.; Qu, L.; Gong, L.; Si, J. Anticancer Agent Icaritin Induces Apoptosis through Caspase-Dependent Pathways in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *Mol. Med. Rep.* **2015**, *11*, 3094–3100, doi:10.3892/mmr.2014.3007.
101. Gao, L.; Chen, M.; Ouyang, Y.; Li, R.; Zhang, X.; Gao, X.; Lin, S.; Wang, X. Icaritin Induces Ovarian Cancer Cell Apoptosis through Activation of P53 and Inhibition of Akt/MTOR Pathway. *Life Sci.* **2018**, *202*, 188–194, doi:10.1016/j.lfs.2018.03.059.
102. Zhao, H.; Guo, Y.; Li, S.; Han, R.; Ying, J.; Zhu, H.; Wang, Y.; Yin, L.; Han, Y.; Sun, L.; et al. A Novel Anti-Cancer Agent Icaritin Suppresses Hepatocellular Carcinoma Initiation and Malignant Growth through the IL-6/Jak2/Stat3 Pathway. *Oncotarget* **2015**, *6*, 31927–31943, doi:10.18632/oncotarget.5578.
103. Zhu, J. feng; Li, Z. jian; Zhang, G. sen; Meng, K.; Kuang, W. yong; Li, J.; Zhou, X. fu; Li, R. juan; Peng, H. ling; Dai, C. wen; et al. Icaritin Shows Potent Anti-Leukemia Activity on Chronic Myeloid Leukemia In Vitro and In Vivo by Regulating MAPK/ERK/JNK and JAK2/STAT3 /AKT Signalings. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e23720, doi:10.1371/journal.pone.0023720.
104. Liu, J.; Peng, Y.; Wei, W. Cell Cycle on the Crossroad of Tumorigenesis and Cancer Therapy. *Trends Cell Biol.* **2022**, *32*, 30–44, doi:10.1016/j.tcb.2021.07.001.
105. Costantini, S.; Budillon, A. New Prognostic and Predictive Markers in Cancer Progression. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8667, doi:10.3390/ijms21228667.
106. van Gool, A.J.; Bietrix, F.; Caldenhoven, E.; Zatloukal, K.; Scherer, A.; Litton, J.-E.; Meijer, G.; Blomberg, N.; Smith, A.; Mons, B.; et al. Bridging the Translational Innovation Gap through Good Biomarker Practice. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 587–588, doi:10.1038/nrd.2017.72.
107. Galluzzi, L.; Vitale, I.; Michels, J.; Brenner, C.; Szabadkai, G.; Harel-Bellan, A.; Castedo, M.; Kroemer, G. Systems Biology of Cisplatin Resistance: Past, Present and Future. *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, e1257–e1257, doi:10.1038/cddis.2013.428.

108. Zhang, Y.; Han, C.Y.; Duan, F.G.; Fan, X.-X.; Yao, X.-J.; Parks, R.J.; Tang, Y.-J.; Wang, M.-F.; Liu, L.; Tsang, B.K.; et al. P53 Sensitizes Chemoresistant Non-Small Cell Lung Cancer via Elevation of Reactive Oxygen Species and Suppression of EGFR/PI3K/AKT Signaling. *Cancer Cell Int.* **2019**, *19*, 188, doi:10.1186/s12935-019-0910-2.
109. Vousden, K.H.; Prives, C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of P53. *Cell* **2009**, *137*, 413–431, doi:10.1016/j.cell.2009.04.037.
110. Mandinova, A.; Lee, S.W. The P53 Pathway as a Target in Cancer Therapeutics: Obstacles and Promise. *Sci. Transl. Med.* **2011**, *3*, doi:10.1126/scitranslmed.3001366.
111. Breen, L.; Heenan, M.; Amberger-Murphy, V.; Clynes, M. Investigation of the Role of P53 in Chemotherapy Resistance of Lung Cancer Cell Lines. *Anticancer Res.* **2007**, *27*, 1361–1364.
112. Chadha, R.; Meador-Woodruff, J.H. Downregulated AKT-MTOR Signaling Pathway Proteins in Dorsolateral Prefrontal Cortex in Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* **2020**, *45*, 1059–1067, doi:10.1038/s41386-020-0614-2.
113. Schirmer, E.C.; Latonen, L.; Tollis, S. Nuclear Size Rectification: A Potential New Therapeutic Approach to Reduce Metastasis in Cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* **2022**, *10*, 1022723, doi:10.3389/fcell.2022.1022723.
114. Weng, C.-H.; Wu, C.-S.; Wu, J.-C.; Kung, M.-L.; Wu, M.-H.; Tai, M.-H. Cisplatin-Induced Giant Cells Formation Is Involved in Chemoresistance of Melanoma Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7892, doi:10.3390/ijms21217892.
115. Vakifahmetoglu, H.; Olsson, M.; Tamm, C.; Heidari, N.; Orrenius, S.; Zhivotovsky, B. DNA Damage Induces Two Distinct Modes of Cell Death in Ovarian Carcinomas. *Cell Death Differ.* **2008**, *15*, 555–566, doi:10.1038/sj.cdd.4402286.
116. Shubin, A.V.; Demidyuk, I.V.; Komissarov, A.A.; Rafieva, L.M.; Kostrov, S.V. Cytoplasmic Vacuolization in Cell Death and Survival. *Oncotarget* **2016**, *7*, 55863–55889, doi:10.18632/oncotarget.10150.
117. Shin, J.H.; Jang, H.Y.; Chung, J.S.; Cho, K.H.; Hwang, K.E.; Kim, S.Y.; Kim, H.J.; Lee, S.Y.; Lee, M.K.; Park, S.A.; et al. Induction of Autophagy by Low Dose of Cisplatin in H460 Lung Cancer Cells. *Tuberc. Respir. Dis.* **2010**, *69*, 16, doi:10.4046/trd.2010.69.1.16.
118. Sarin, N.; Engel, F.; Kalayda, G.V.; Mannewitz, M.; Cinatl, J.; Rothweiler, F.; Michaelis, M.; Saafan, H.; Ritter, C.A.; Jaehde, U.; et al. Cisplatin Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer Cells Is Associated with an Abrogation of Cisplatin-Induced G2/M Cell Cycle Arrest. *PLOS ONE* **2017**, *12*, e0181081, doi:10.1371/journal.pone.0181081.

119. Wu, J.; Jiang, J.; Chen, B.; Wang, K.; Tang, Y.; Liang, X. Plasticity of Cancer Cell Invasion: Patterns and Mechanisms. *Transl. Oncol.* **2021**, *14*, 100899, doi:10.1016/j.tranon.2020.100899.
120. Friedl, P. Prespecification and Plasticity: Shifting Mechanisms of Cell Migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2004**, *16*, 14–23, doi:10.1016/j.ceb.2003.11.001.
121. Kalluri, R.; Weinberg, R.A. The Basics of Epithelial-Mesenchymal Transition. *J. Clin. Invest.* **2009**, *119*, 1420–1428, doi:10.1172/JCI39104.
122. Lai, X.; Li, Q.; Wu, F.; Lin, J.; Chen, J.; Zheng, H.; Guo, L. Epithelial-Mesenchymal Transition and Metabolic Switching in Cancer: Lessons From Somatic Cell Reprogramming. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 760, doi:10.3389/fcell.2020.00760.
123. Wang, H.; Guo, S.; Kim, S.-J.; Shao, F.; Ho, J.W.K.; Wong, K.U.; Miao, Z.; Hao, D.; Zhao, M.; Xu, J.; et al. Cisplatin Prevents Breast Cancer Metastasis through Blocking Early EMT and Retards Cancer Growth Together with Paclitaxel. *Theranostics* **2021**, *11*, 2442–2459, doi:10.7150/thno.46460.
124. Xu, G.; Yu, H.; Shi, X.; Sun, L.; Zhou, Q.; Zheng, D.; Shi, H.; Li, N.; Zhang, X.; Shao, G. Cisplatin Sensitivity Is Enhanced in Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Regulating Epithelial-Mesenchymal Transition through Inhibition of Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A2. *BMC Pulm. Med.* **2014**, *14*, 174, doi:10.1186/1471-2466-14-174.
125. Xu, B.; Jiang, C.; Han, H.; Liu, H.; Tang, M.; Liu, L.; Ji, W.; Lu, X.; Yang, X.; Zhang, Y.; et al. Icaritin Inhibits the Invasion and Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Glioblastoma Cells by Targeting EMMPRIN via PTEN/AKT/HIF-1 α Signalling. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2015**, *42*, 1296–1307, doi:10.1111/1440-1681.12488.
126. Carnero, A.; Blanco-Aparicio, C.; Renner, O.; Link, W.; Leal, J. The PTEN/PI3K/AKT Signalling Pathway in Cancer, Therapeutic Implications. *Curr. Cancer Drug Targets* **2008**, *8*, 187–198, doi:10.2174/156800908784293659.
127. Gao, L.; Ouyang, Y.; Li, R.; Zhang, X.; Gao, X.; Lin, S.; Wang, X. Icaritin Inhibits Migration and Invasion of Human Ovarian Cancer Cells via the Akt/MTOR Signaling Pathway. *Front. Oncol.* **2022**, *12*, 843489, doi:10.3389/fonc.2022.843489.
128. Li, Y.; Li, Y.; Feng, H.; Gao, Y. IDDF2022-ABS-0039 Icaritin Inhibits Tumor Metastasis by Suppressing MDK-Notch Signaling Pathway in Hepatocellular Carcinoma. In Proceedings of the Basic Hepatology; BMJ Publishing Group Ltd and British Society of Gastroenterology, September 2022; p. A14.1-A14.

129. Żuryń, A.; Krajewski, A. Icaritin Induces Apoptosis and Downregulates RhoA/ROCK Pathway in the A549 Adenocarcinoma Cell Line. *Med. Res. J.* **2022**, *7*, 242–248, doi:10.5603/MRJ.2022.0045.
130. Zheng, Q.; Liu, W.; Li, B.; Chen, H.; Zhu, W.; Yang, G.; Chen, M.; He, G. Anticancer Effect of Icaritin on Human Lung Cancer Cells through Inducing s Phase Cell Cycle Arrest and Apoptosis. *J. Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci.* **2014**, *34*, 497–503, doi:10.1007/s11596-014-1305-1.
131. Zhou, C.; Gu, J.; Zhang, G.; Dong, D.; Yang, Q.; Chen, M.-B.; Xu, D. AMPK-Autophagy Inhibition Sensitizes Icaritin-Induced Anti-Colorectal Cancer Cell Activity. *Oncotarget* **2017**, *8*, 14736–14747, doi:10.18632/oncotarget.14718.
132. Jin, X.; An, C.; Jiao, B.; Safirstein, R.L.; Wang, Y. AMP-Activated Protein Kinase Contributes to Cisplatin-Induced Renal Epithelial Cell Apoptosis and Acute Kidney Injury. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* **2020**, *319*, F1073–F1080, doi:10.1152/ajprenal.00354.2020.
133. Shimada, T.; Yabuki, Y.; Noguchi, T.; Tsuchida, M.; Komatsu, R.; Hamano, S.; Yamada, M.; Ezaki, Y.; Hirata, Y.; Matsuzawa, A. The Distinct Roles of LKB1 and AMPK in P53-Dependent Apoptosis Induced by Cisplatin. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 10064, doi:10.3390/ijms231710064.
134. Vara-Ciruelos, D.; Russell, F.M.; Hardie, D.G. The Strange Case of AMPK and Cancer: Dr Jekyll or Mr Hyde? *Open Biol.* **2019**, *9*, 190099, doi:10.1098/rsob.190099.
135. Rashtchizadeh, N.; Argani, H.; Ghorbanihaghjo, A.; Sanajou, D.; Hosseini, V.; Dastmalchi, S.; Nazari Soltan Ahmad, S. AMPK: A Promising Molecular Target for Combating Cisplatin Toxicities. *Biochem. Pharmacol.* **2019**, *163*, 94–100, doi:10.1016/j.bcp.2019.02.006.
136. Konieczny, P.; Adamus, T.; Sułkowski, M.; Skrzypek, K.; Majka, M. Impact of AMPK on Cervical Carcinoma Progression and Metastasis. *Cell Death Dis.* **2023**, *14*, 43, doi:10.1038/s41419-023-05583-9.
137. Song, S.; Lee, J.-Y.; Ermolenko, L.; Mazumder, A.; Ji, S.; Ryu, H.; Kim, H.; Kim, D.-W.; Lee, J.W.; Dicato, M.; et al. Tetrahydrobenzimidazole TMQ0153 Triggers Apoptosis, Autophagy and Necroptosis Crosstalk in Chronic Myeloid Leukemia. *Cell Death Dis.* **2020**, *11*, 109, doi:10.1038/s41419-020-2304-8.
138. Yu, T.; Guo, F.; Yu, Y.; Sun, T.; Ma, D.; Han, J.; Qian, Y.; Kryczek, I.; Sun, D.; Nagarsheth, N.; et al. Fusobacterium Nucleatum Promotes Chemoresistance to Colorectal Cancer by Modulating Autophagy. *Cell* **2017**, *170*, 548-563.e16, doi:10.1016/j.cell.2017.07.008.
139. RRM2 <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RRM2>.

140. Fatkhutdinov, N.; Sproesser, K.; Krepler, C.; Liu, Q.; Brafford, P.A.; Herlyn, M.; Aird, K.M.; Zhang, R. Targeting RRM2 and Mutant BRAF Is a Novel Combinatorial Strategy for Melanoma. *Mol. Cancer Res.* **2016**, *14*, 767–775, doi:10.1158/1541-7786.MCR-16-0099.
141. Rahman, M.A.; Amin, A.R.M.R.; Wang, D.; Koenig, L.; Nannapaneni, S.; Chen, Z.; Wang, Z.; Sica, G.; Deng, X.; Chen, Z. (Georgia); et al. RRM2 Regulates Bcl-2 in Head and Neck and Lung Cancers: A Potential Target for Cancer Therapy. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 3416–3428, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0073.
142. Abdel-Rahman, M.A.; Mahfouz, M.; Habashy, H.O. RRM2 Expression in Different Molecular Subtypes of Breast Cancer and Its Prognostic Significance. *Diagn. Pathol.* **2022**, *17*, 1, doi:10.1186/s13000-021-01174-4.
143. Wang, L.; Meng, L.; Wang, X.; Ma, G.; Chen, J. Expression of RRM1 and RRM2 as a Novel Prognostic Marker in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Receiving Chemotherapy. *Tumor Biol.* **2014**, *35*, 1899–1906, doi:10.1007/s13277-013-1255-4.
144. Krajewski, A.; Gagat, M.; Żuryń, A.; Hałas-Wiśniewska, M.; Grzanka, D.; Grzanka, A. Cyclin F Is Involved in Response to Cisplatin Treatment in Melanoma Cell Lines. *Oncol. Rep.* **2020**, doi:10.3892/or.2020.7465.
145. Hawkins, D.S.; Demers, G.W.; Galloway, D.A. Inactivation of P53 Enhances Sensitivity to Multiple Chemotherapeutic Agents. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 892–898.
146. Zhang, Y.; Wang, X. Targeting the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Cancer. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* **2020**, *13*, 165, doi:10.1186/s13045-020-00990-3.
147. Stewart, D.J. Wnt Signaling Pathway in Non-Small Cell Lung Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **2014**, *106*, djt356–djt356, doi:10.1093/jnci/djt356.
148. Duffy, D.J.; Krstic, A.; Schwarzl, T.; Halasz, M.; Iljin, K.; Fey, D.; Haley, B.; Whilde, J.; Haapa-Paananen, S.; Fey, V.; et al. Wnt Signalling Is a Bi-Directional Vulnerability of Cancer Cells. *Oncotarget* **2016**, *7*, 60310–60331, doi:10.18632/oncotarget.11203.
149. Rubio, C.; Rosiles-Abonce, A.; Trejo-Solis, C.; Rubio-Osornio, M.; Mendoza, C.; Custodio, V.; Martinez-Lazcano, J.C.; Gonzalez, E.; Paz, C. Increase Signaling of Wnt/ β -Catenin Pathway and Presence of Apoptosis in Cerebellum of Kindled Rats. *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets* **2017**, *16*, doi:10.2174/1871527316666170117114513.
150. Rubio-Osornio, C.; Eguiluz-Meléndez, A.; Trejo-Solís, C.; Custodio, V.; Rubio-Osornio, M.; Rosiles-Abonce, A.; C. Martínez-Lazcano, J.; González, E.; Paz, C. Decreased Expression of Sox-1 in Cerebellum of Rat with Generalized Seizures Induced by Kindling Model. *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets* **2016**, *15*, 723–729, doi:10.2174/1871527315666160321105818.

151. Guan, Z.; Zhang, J.; Wang, J.; Wang, H.; Zheng, F.; Peng, J.; Xu, Y.; Yan, M.; Liu, B.; Cui, B.; et al. SOX1 Down-Regulates β -Catenin and Reverses Malignant Phenotype in Nasopharyngeal Carcinoma. *Mol. Cancer* **2014**, *13*, 257, doi:10.1186/1476-4598-13-257.
152. Rosiles, A.; Rubio, C.; Trejo, C.; Gutierrez, J.; Hernández, L.; Paz, C. Commentary: Participation of Sox-1 Expression and Signaling of β -Catenin in the Pathophysiology of Generalized Seizures in Cerebellum of Rat. *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets* **2016**, *15*, 3–6, doi:10.2174/1871527314666150821105001.
153. Damalas, A. Excess Beta -Catenin Promotes Accumulation of Transcriptionally Active P53. *EMBO J.* **1999**, *18*, 3054–3063, doi:10.1093/emboj/18.11.3054.
154. Beijing Shenogen Biomedical Co., Ltd *Icaritin Soft Capsule Versus Huachansu Tablet in the First-Line Treatment of Unresectable Hepatocellular Carcinoma With Poor Conditions and Biomarker Enrichment (Biomarker Enrichment Study of Poor Prognosis HCC Patients, BESTPOP) (BESTPOP)*; p. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05594927>;

10. Załączniki

10.1. Zgoda Komisji Bioetycznej na przeprowadzenie badań

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy
KOMISJA BIOETYCZNA

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

KB 501/2022

Bydgoszcz, 25.10.2022 r.

Działając na podstawie art. 29 ustawy z dnia 5.12.1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentyisty Dz.U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11.05.1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz.U. Nr 47 poz.480) oraz Zarządzenia Nr 21 Rektora UMK z dnia 4.03.2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w DH i GCP

Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

(skład podano w załączeniu), na posiedzeniu w dniu **25.10.2022 r.** przeanalizowała wniosek, który złożyła kierownik badania:

mgr Aleksandra Opacka
Katedra Histoplogii i Embriologii
Collegium Medicum w Bydgoszczy UMK w Toruniu

z zespołem w składzie:

prof. dr hab. n. med. Alina Grzanka, dr hab. n. med. Agnieszka Żuryń, prof. UMK,
dr n. med. Adrian Krajewski, mgr Aleksandra Opacka

w sprawie badania:

„Ekspresja cykliny Y w wybranych liniach nowotworowych po indukcji śmierci komórki”.

Po zapoznaniu się ze złożonym wnioskiem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania Komisja podjęła

Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu wniosku

w sprawie przeprowadzenia badań w zakresie określonym we wniosku

Zgoda obowiązuje od daty podjęcia uchwały (25.10.2022 r.) do końca 2023 r.


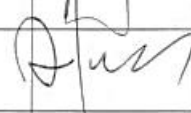
Wydana opinia dotyczy tylko rozpatrywanego wniosku z uwzględnieniem przedstawionego projektu; każda zmiana i modyfikacja wymaga uzyskania odrębnej opinii.

Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymuje:
mgr Aleksandra Opacka
Katedra Histoplogii i Embriologii
Collegium Medicum w Bydgoszczy UMK w Toruniu

Lista obecności
na posiedzeniu Komisji Bioetycznej
w dniu 25.10.2022 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja/ Specjalizacja	Podpis
1.	Prof. dr hab. med. Karol Śliwka	medycyna sądowa	
2.	Mgr prawa Joanna Połetek-Żygas	prawniczka	
3.	Prof. dr hab. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska	pediatra, alergologia i gastroenterologia dziecięca	
4.	Prof. dr hab. med. Marek Grabiec	położnictwo, ginekologia onkologiczna	
5.	Prof. dr hab. n. med. Maria Kłopocka	choroby wewnętrzne, gastroenterologia	
6.	Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk	chirurgia ogólna, transplantologia kliniczna	
7.	Dr hab. n. med. Maciej Słupski, prof. UMK	chirurgia ogólna, transplantologia kliniczna	
8.	Dr hab. n. med. Katarzyna Sierakowska, prof. UMK	anestezjologia i intensywna terapia	
9.	Ks. dr hab. Wojciech Szukalski, prof. UAM	duchowny	
10.	Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska	pediatria, choroby płuc	
11.	Mgr prawa Patrycja Brzezicka	prawniczka	
12.	Mgr farm. Aleksandra Adameczyk	farmaceutka	
13.	Mgr Lidia Iwińska-Tarczykowska	pielęgniarka	