



**UNIWERSYTET  
MIKOŁAJA KOPERNIKA  
W TORUNIU**

Collegium Medicum  
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

**Bydgoszcz 2023 r.**



**UNIWERSYTET  
MIKOŁAJA KOPERNIKA  
W TORUNIU**

Wydział Lekarski  
Collegium Medicum w Bydgoszczy

**Karolina Balik**

**Mikrośrodowisko nowotworowe jako cel terapii  
personalizowanej**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu**

**Promotor: dr hab. Anna Bajek, prof. UMK**

**Bydgoszcz 2023 r.**

## Spis treści

Wykaz skrótów .....	6
Streszczenie .....	7
Summary.....	8
1 Wstęp .....	9
1.1 Statystyki zachorowań na chorobę nowotworową .....	9
1.2 Wpływ mikrośrodowiska guza na rozwój choroby nowotworowej .....	10
1.3 Mezenchymalne komórki macierzyste w mikrośrodowisku guza .....	12
1.4 Fibroblasty związane z rakiem w mikrośrodowisku guza .....	16
1.5 TME jako cel terapii personalizowanej .....	19
1.6 Badania na modelu <i>in vitro</i> .....	20
2 Cel pracy.....	22
3 Materiały i metody.....	23
3.1 Linie komórkowe.....	23
3.2 Hodowla komórek.....	24
3.2.1 Przygotowanie medium kondycjonowanego .....	26
3.3 Roztwory leków.....	26
3.4 Ocena wpływu CAF-CM na sekretom komórek nowotworowych.....	26
3.4.1 Analiza panelu cytokin i chemokin .....	27
3.4.2 Analiza zmian ekspresji IL-33.....	27
3.5 Ocena żywotność komórek nowotworowych przy użyciu testu MTT .....	27
3.6 Ocena proliferacji komórek nowotworowych przy użyciu testu BrdU.....	28
3.7 Analiza apoptozy komórek nowotworowych .....	29
3.8 Analiza aktywacji szlaków sygnalizacyjnych .....	29

3.9	Ocena wpływu CAF-CM na wrażliwość komórek nowotworowych na zastosowane chemioterapeutyki .....	30
3.9.1	Wrażliwość komórek raka prostaty na cisplatynę.....	30
3.9.2	Wrażliwość komórek raka pęcherza moczowego na ciprofloksacynę .....	31
3.9.3	Ocena wpływu IL-33 na wrażliwość komórek nowotworowych na badane leki	31
3.9.4	Ocena wpływu FGF2 na wrażliwość komórek nowotworowych na badane leki	32
3.10	Ocena wpływu ASCS-CM na wrażliwość komórek nowotworowych na zastosowane chemioterapeutyki .....	32
3.10.1	Wrażliwość komórek raka prostaty na cisplatynę.....	33
3.10.2	Wrażliwość komórek raka pęcherza moczowego na ciprofloksacynę .....	33
3.11	Analiza statystyczna .....	33
4	Wyniki.....	35
4.1	Wpływ mediatorów syntetyzowanych przez fibroblasty związane z rakiem na komórki raka pęcherza moczowego.....	35
4.1.1	Zmiany aktywności sekrecyjnej komórek nowotworowych .....	35
4.1.2	Profilowanie zmian w poziomie IL-33.....	37
4.1.3	Analiza żywotności komórek nowotworowych.....	40
4.1.4	Analiza tempa proliferacji komórek nowotworowych .....	44
4.1.5	Ocena apoptozy komórek nowotworowych .....	46
4.1.6	Aktywacja wybranych szlaków sygnalizacyjnych .....	51
4.1.7	Analiza zmian ekspresji białka p53 .....	52
4.2	Ocena wpływu CAF-CM na badane leki w raku pęcherza moczowego i raku prostaty	56
4.2.1	Zmniejszenie wrażliwości na zastosowane chemioterapeutyki.....	56
4.2.2	Zwiększenie wrażliwości komórek nowotworowych na badane leki poprzez wykluczenie FGF/IL-33 z mikrośrodowiska nowotworowego.....	59

4.3	Wpływ ASCS-CM na komórki raka pęcherza moczowego i raka prostaty.....	66
4.3.1	Żywotność i proliferacja komórek nowotworowych.....	68
4.3.2	Wpływ ASCS-CM na wrażliwość komórek HB-CLS-1 na ciprofloksacynę .....	72
4.3.3	Wpływ ASCS-CM na wrażliwość komórek DU145 na cisplatynę.....	73
5	Dyskusja.....	75
6	Wnioski.....	87
	Wykaz tabel i rycin.....	88
	Piśmiennictwo .....	92
	Załącznik 1 .....	104
	Załącznik 2 .....	106

## Wykaz skrótów

<b>TME</b>	Tumor Microenvironment	Mikrośrodowisko guza
<b>NIH</b>	National Institutes of Health	Amerykański Narodowy Instytut Zdrowia
<b>MSC</b>	Mesenchymal Stem Cells	Mezenchymalne komórki macierzyste
<b>CAF</b>	Cancer-Associated Fibroblasts	Fibroblasty związane z rakiem
<b>ECM</b>	Extracellular Matrix	Macierz zewnątrzkomórkowa
<b>TGF-β</b>	Transforming Growth Factor-beta	Transformujący czynnik wzrostu beta
<b>α-SMA</b>	Alpha Smooth Muscle Actin	Aktyna mięśni gładkich alfa
<b>IGF-1</b>	Insulin-like Growth Factor I	Insulinopodobny czynnik wzrostu I
<b>PGE</b>	Prostaglandins	Prostaglandyny
<b>EMT</b>	Epithelial–Mesenchymal Transition	Przejście epitelialno-mezenchymalne
<b>α-SMA</b>	Alpha Smooth Muscle Actin	Aktyna mięśni gładkich alfa
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor	Czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego
<b>FBS</b>	Fetal Bovine Serum	Płodowa surowica bydlęca
<b>CM</b>	Conditioned Medium	Medium kondycjonowane
<b>IC</b>	Inhibitory Concentration	Stężenie hamujące
<b>HRP</b>	Horseradish Peroxidase	Peroksydaza chrzanowa
<b>BrdU</b>	Bromodeoxyuridine	Bromodeoksyurydyna
<b>MAPK</b>	Mitogen-Activated Protein Kinases	Kinazy białkowe aktywowane mitogenem
<b>ERK</b>	Extracellular Signaling-Regulated Kinase	Kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym
<b>SD</b>	Standard Deviation	Odchylenie standardowe
<b>FGF2</b>	Fibroblast Growth Factor-2	Czynnik wzrostu fibroblastów 2
<b>FGF</b>	Fibroblast Growth Factors	Czynniki wzrostu fibroblastów
<b>IFN-α</b>	Interferon Alfa	Interferon alfa
<b>IFN-γ</b>	Interferon gamma	Interferon gamma
<b>MIP-1a</b>	Macrophage Inflammatory Protein 1a	Białko zapalne makrofagów 1a
<b>n.d.</b>	Not detectable	Niewykrywalny

## Streszczenie

Mikrośrodowisko guza (TME) składa się nie tylko z heterogenicznej populacji komórek nowotworowych, ale również z mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC), fibroblastów związanych z rakiem (CAF) oraz wielu innych typów komórek. Zawiera także rozpuszczalne mediatory syntetyzowane przez wszystkie komórki w tym obszarze. Interakcje między komórkami nowotworowymi, a jego mikrośrodowiskiem są zaangażowane we wzrost guza, inwazję, przerzuty oraz mają wpływ na leczenie. Na tym etapie ważne jest prowadzenie badań podstawowych zwiększających wiedzę o tych interakcjach.

Celem pracy była analiza parakrynnego wpływu fibroblastów związanych z rakiem na komórki raka prostaty i raka pęcherza moczowego oraz ich oporności na wybrane leki. Analizowano również parakrynną wpływ mezenchymalnych komórek macierzystych na wrażliwość badanych komórek nowotworowych na wybrane leki.

W pracy wykorzystano linię raka prostaty DU145 oraz linię raka pęcherza moczowego HB-CLS-1. Medium kondycjonowane (CM) reprezentujące TME uzyskano z unieśmiertelnionych MSC - ASCStelo oraz pierwotnych fibroblastów związanych z rakiem prostaty HC-6223. Do badań wykorzystano testy MTT, BrdU, barwienie CellEvast Caspase-3/7 Green oraz testy ELISA. Do oceny lekooporności zastosowano cisplatynę i ciprofloksacynę, odpowiednio do raka prostaty i raka pęcherza moczowego.

Fibroblasty związane z rakiem parakrynnie zwiększają żywotność, proliferację oraz oporność badanych komórek nowotworowych poprzez regulację ich sekretomu, szlaków sygnalizacyjnych z udziałem Akt/ERK/p70 oraz ekspresji białka p53. Zaobserwowano również, że MSC parakrynnie promują wzrost i proliferację badanych komórek nowotworowych. Mogą one zarówno promować oporność, jak i uwrażliwiać komórki nowotworowe na stosowane leki. Po neutralizacji FGF2 wykazano podwyższenie wrażliwości linii DU145 i HB-CLS-1 hodowanych z CAF-CM na wybrane chemioterapeutyki.

W badaniu wykazano, że istnieje ścisła zależność pomiędzy czynnikami wydzielanymi w mikrośrodowisku nowotworowym, a komórkami raka prostaty i raka pęcherza moczowego. Zaobserwowano, że ukierunkowanie na pojedyncze cząsteczki z TME może obniżyć lekooporność spowodowaną parakrynnym działaniem CAF.

**Słowa kluczowe:** Mikrośrodowisko guza, Fibroblasty związane z rakiem, Sekretom komórek

## Summary

### Cancer microenvironment as a target for personalized therapy

The tumor microenvironment (TME) consists not only of a heterogeneous population of tumor cells, but also of Mesenchymal Stem Cells (MSCs), Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs) and many other cell types. It contains soluble mediators synthesized by cells in this area as well. Interactions between cancer cells and their microenvironment are involved in tumor growth, invasion, metastasis and treatment. At this stage, it is important to conduct basic research to increase knowledge of these interactions.

In the study, the prostate cancer cell line DU145 and bladder cancer cell line HB-CLS-1 were used. Conditioned medium (CM) representing TME was obtained from immortalized MSCs - ASCStelo, and primary prostate cancer-associated fibroblasts HC-6223. MTT, BrdU, CellEvast Caspase-3/7 Green staining and ELISA tests were used for the study. Cisplatin and ciprofloxacin were used to assess drug resistance, respectively for prostate cancer and bladder cancer.

Cancer-associated fibroblasts paracrinely increased the viability, proliferation and resistance of the studied cancer cells by regulating their secretome, Akt/ERK/p70 signaling pathways and p53 protein expression. It was also observed that MSCs paracrinely promote the growth and proliferation of the studied cancer cells. They can both promote resistance and sensitize cancer cells to the drugs used. The study demonstrated increased sensitivity of the DU145 and HB-CLS-1 cell lines cultured with CAF-CM to selected chemotherapeutic agents after FGF2 neutralization.

The study showed that there is a close relationship between factors secreted in the tumor microenvironment and prostate and bladder cancer cells. It has been observed that targeting single molecules in TME may reduce drug resistance caused by the paracrine effect of CAF.

**Keywords:** Tumor Microenvironment, Cancer-Associated Fibroblasts, Cell Secretome



# 1 Wstęp

## 1.1 Statystyki zachorowań na chorobę nowotworową

W świetle najnowszych statystyk częstość diagnozowania choroby nowotworowej gwałtownie wzrasta na całym świecie. Stanowi drugą przyczynę przedwczesnych zgonów. Zgodnie z raportem GLOBCAN opublikowanym w 2021 roku tylko w 2020 roku odnotowano ponad 19 milionów nowych przypadków zachorowań i 10 milionów zgonów spowodowanych chorobą nowotworową [1]. Analiza obejmowała 183 kraje i 36 typów nowotworów. Najczęściej wymieniane typy nowotworów u obu płci, pod względem występowania oraz śmiertelności, to rak piersi, płuca, jelita grubego, prostaty, wątroby, żołądka, przełyku, pęcherza moczowego oraz szyjki macicy [1]. Biorąc pod uwagę wcześniejszą analizę z 2018 roku, odnotowano 5% wzrost diagnozowanych przypadków i 4% wzrost śmiertelności [2]. Raport z 2012 roku natomiast zawiera informacje o 14 milionach nowych przypadków oraz 8 milionach zgonów [3], co w porównaniu z najnowszymi doniesieniami daje wzrost zachorowań o około 27% oraz 17% więcej zgonów. W świetle tych informacji wpływ choroby nowotworowej znacząco wzrasta na przestrzeni ostatniej dekady i powoduje coraz więcej przedwczesnych zgonów na całym świecie. Szacuje się, że ilość pacjentów onkologicznych będzie stale rosła w ciągu następnych dekad, a liczba nowych przypadków rocznie wzrośnie nawet do 34 milionów [4], co stanowi prawie 50% więcej zachorowań niż w roku 2020. Z uwagi na postęp medycyny na przestrzeni lat należy również wziąć pod uwagę fakt, że wzrost diagnozowanych przypadków może również wynikać z bardziej rozwiniętej technologii i programów przesiewowych, nie koreluje to jednak ze spadkiem ilości przypadków śmiertelnych.

Nowotwory układu moczowo-płciowego zaliczają się do najczęściej występujących chorób nowotworowych [1]. Często przebiegają bezobjawowo lub przypominają infekcję, z tego powodu diagnozowane są późno, co prowadzi do gorszego rokowania. Stanowią jeden z istotnych problemów epidemiologicznych i klinicznych. W raporcie GLOBCAM 2020, rak prostaty znalazł się na drugim miejscu pod względem zachorowalności u mężczyzn, a piątym pod względem śmiertelności. Tylko w 2020 roku odnotowano ponad 1,4 miliona nowych przypadków. Dodatkowo, stanowi on główną przyczyną zgonów z powodu zachorowania na raka w 48 krajach z 185 ujętych w badaniu. Jest on też najczęściej diagnozowanym nowotworem u mężczyzn. Rak pęcherza moczowego natomiast jest dziesiątym najczęściej

diagnozowanym nowotworem wśród obu płci. W 2020 roku zareportowano prawie 600 tysięcy nowych zachorowań i ponad 200 tysięcy zgonów. Występuje on częściej u mężczyzn niż kobiet, z uwagi na to u tej płci jest szóstym najczęściej diagnozowanym i dziewiątym najczęściej powodującym zgon nowotworem [1]. W Polsce w 2020 roku odnotowano ponad 18 tysięcy przypadków zachorowań na raka prostaty z czego ponad 7 tysięcy śmiertelnych. Z kolei, rak pęcherza moczowego był zdiagnozowany u 11,5 tysiąca pacjentów i odnotowano 5 tysięcy zgonów [5]. Ponadto, przewiduje się, że światowa pandemia COVID-19, która zakłóciła dostęp do tradycyjnego systemu opieki zdrowia, może odzwierciedlić się w przyszłych statystykach dotyczących zgonów z powodu chorób nowotworowych. Strach i ograniczony dostęp do placówek zdrowia w czasie pandemii, opóźnione testy przesiewowe, a co za tym idzie diagnoza i leczenie, to jedne ze skutków ubocznych pandemii COVID-19 u pacjentów onkologicznych [6,7].

Statystyki zwracają uwagę na potrzebę prowadzenia badań zarówno na poziomie podstawowym, jak i klinicznym. Celem jest dalsze poznawanie biologii nowotworów oraz opracowywanie nowych metod diagnostycznych, nowych wskaźników agresywnego przebiegu choroby, a także identyfikacja nowych celów terapeutycznych.

## **1.2 Wpływ mikrośrodowiska guza na rozwój choroby nowotworowej**

Choroba onkologiczna jest chorobą dynamiczną, podczas jej rozwoju komórki nowotworowe stają się bardziej zróżnicowane. Charakteryzuje się przede wszystkim zdolnością do ignorowania sygnałów hamowania proliferacji komórek, inwazji pobliskich tkanek oraz zdolności do migracji do dalszych tkanek, powodując przerzuty [8]. Sygnatura molekularna guza może być odmienna w zależności od zmiennych czynników zewnętrznych związanych z mikrośrodowiskiem guza (TME, ang. Tumor Microenvironment). Zgodnie z Amerykańskim Narodowym Instytutem Zdrowia (NIH, ang. National Institutes of Health) heterogeniczność guza definiuje się jako różnice między tymi samymi typami nowotworów u różnych pacjentów [9]. Różnice te dotyczą komórek nowotworowych w obrębie jednego guza lub różnicy między guzem pierwotnym a wtórnym, przerzutowym. Dotyczą zarówno genów, jak i sekretomu. Część komórek guza może wykazywać inne mutacje niż pozostałe [8]. Stanowi to istotny problem podczas diagnozy i odpowiedzi na zastosowane leczenie. To właśnie heterogeniczność guza uznaje się za główną przyczynę lekooporności, co z kolei uważa się za powód tak dużej śmiertelności [8,9]. Lekooporność można podzielić na wrodzoną

i nabytą. Wrodzona charakteryzuje się ciągłym wzrostem komórek nowotworowych w trakcie leczenia oraz szybkim nawrotem choroby. Wywodzi się z mutacji części komórek nowotworowych niosących informację o oporności, powodując częściową lub z biegiem czasu całkowitą oporność na leczenie. W częściowej odpowiedzi początkowo uzyskuje się zmniejszenie masy guza, jednak pozostają resztkowe komórki nowotworowe, które po czasie mogą wywołać nawrót choroby. W nabytej wymienia się adaptacyjne mechanizmy wewnętrzne, takie jak zmiany transkrypcyjne, epigenetyczne oraz metaboliczne [10]. Jednak w minionej dekadzie zwraca się dużą uwagę na interakcje w mikrośrodowisku guza, które mogą prowadzić do zmian we wrażliwości komórek nowotworowych na zastosowane leczenie [11].

Mikrośrodowisko guza to szeroko pojęte środowisko wokół guza. Składa się nie tylko z heterogenicznej populacji komórek nowotworowych, ale również komórek nienowotworowych, m.in. mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC, ang. Mesenchymal Stem Cells), fibroblastów związanych z rakiem (CAF, ang. Cancer-associated Fibroblasts), pericytów, komórek układu odpornościowego oraz wielu innych typów komórek. Co więcej, składa się również z białek macierzy pozakomórkowej (ECM, ang. Extracellular Matrix), otaczających naczyń krwionośnych oraz rozpuszczalnych mediatorów syntetyzowanych przez wszystkie komórki w tym obszarze [12]. Komórki śródbłonna z TME odgrywają kluczową rolę w ochronie komórek nowotworowych przed układem odpornościowym, naczynia krwionośne natomiast pełnią rolę odżywczą. Komórki nowotworowe wykorzystują już istniejące połączenia lub stymulują powstawanie nowych z komórek progenitorowych śródbłonna. Komórki układu odpornościowego natomiast biorą udział w odpowiedzi i działaniach immunologicznych prowadzących do reakcji zapalnej czy ucieczki spod nadzoru immunologicznego. Z uwagi na swój biologiczny charakter macierzyste/zrębowe komórki mogą zarówno wspomagać, jak i hamować wzrost guza, a fibroblasty, które stanowią bardzo dużą część mikrośrodowiska guza mają znaczący wpływ na promowanie przerzutów oraz progresji. Uważa się, że to właśnie komórki odpornościowe, takie jak makrofagi związane z rakiem oraz CAF, czy podzbiory limfocytów T i B mogą promować zmniejszenie wrażliwości na chemioterapię poprzez sekrecję cytokin, chemokin, RNAaz, pęcherzyków pozakomórkowych czy metabolitów. Składniki te modulują szlaki

sygnalizacyjne oraz biologię komórek nowotworowych np. poprzez zmianę ich sekretomu [10–13].

Niepodważalny jest fakt, że interakcje między komórkami nowotworowymi, a jego mikrośrodowiskiem są zaangażowane we wzrost guza, inwazję, przerzuty oraz mają wpływ na leczenie. Na tym etapie ważne jest prowadzenie badań podstawowych zwiększających wiedzę o mikrośrodowisku nowotworowym i zachodzących w nim interakcjach. Należy jednak wziąć pod uwagę różnorodność jego składników, opracowywać modele badawcze odzwierciedlające indywidualną komunikację poszczególnych elementów. Badania te powinny prowadzić do możliwości aplikacyjnych nowych terapii celowanych. Leczenie należy ukierunkowywać nie tylko na komórki nowotworowe, ale również na całe mikrośrodowisko. Innym obiecującym kierunkiem jest modulowanie składników TME celem wspomaganie już dostępnych terapii.

### **1.3 Mezenchymalne komórki macierzyste w mikrośrodowisku guza**

Mezenchymalne komórki macierzyste to heterogeny zbiór komórek morfologicznie podobnych do fibroblastów. Stanowią szeroko badaną populację komórek, m.in. ze względu na łatwość ich izolowania i hodowli. Jako źródło MSC wymienia się przede wszystkim tkankę tłuszczową, szpik kostny, mięśnie szkieletowe oraz krew pępowinową. Komórki te mają unikatowe właściwości, takie jak wysoki potencjał różnicowania czy zdolność do samoodnowy. Poprzez wydzielanie czynników zewnątrzkomórkowych do środowiska, biorą one udział w regulacji angiogenezy, hematopoezy oraz immunoregulacji. Skład ich sekretomu jest ściśle związany z ich pochodzeniem, jednak niezależnie od środowiska pełnią one funkcje wspomagające i regeneracyjne [14]. MSC stanowią heterogenną populację komórek zrębowych, o ich heterogenności świadczą przede wszystkim różnice w składzie markerów powierzchniowych czy zdolności regeneracyjnych zależnych od ich pochodzenia. Zwykle wykazują ekspresję Stro-1, CD13, CD29, CD44, CD73, CD105 oraz CD106 i nie wykazują ekspresji CD11b, CD31, CD34 oraz CD45. Jednakże nie wszystkie komórki z danej populacji posiadają te same markery powierzchniowe, a ekspresja niektórych może być zmienna ze względu na środowisko. MSC są podatne na bodźce zewnętrzne otaczających komórek, reagują zmianą w składzie wydzielanych czynników wzrostu, cytokin i pęcherzyków pozakomórkowych [14]. Co więcej, mezenchymalne komórki macierzyste wykazują silny tropizm do środowiska zapalnego i warunków beztlenowych, w odpowiedzi na wydzielane tam chemokiny. Zaliczamy do nich CCL2, CCL15, CCL20, CCL25, CXCL1 oraz CXCL8. MSC na swojej powierzchni posiadają

swoiste receptory dla tych cząsteczek. Ta cecha wykorzystywana jest w medycynie regeneracyjnej. Jednak mikrośrodowisko guza również wykazuje cechy hipoksji i środowiska zapalnego w związku z czym MSC mogą charakteryzować się tzw. tropizmem nowotworowym i migrować do TME [15,16].

W dostępnym piśmiennictwie pojawiają się informacje o działaniu promującym, jak i hamującym mezenchymalnych komórek macierzystych na progresję nowotworu. Wyniki badań nie są jednoznaczne. Wskazuje się, że różnice mogą wynikać przede wszystkim z pochodzenia komórek zastosowanych w eksperymencie, ich heterogennym składzie, różnicach w składzie markerów powierzchniowych czy zdolności do różnicowania. Należy również brać pod uwagę zmienność mikrośrodowiska. W zależności od składu TME, typu nowotworu i jego lokalizacji komórki te wykazują odmienne właściwości, co wpływa na zmiany w immunoregulacji MSC w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne. Konieczne wydaje się określenie ich komunikacji z mikrośrodowiskiem w różnych typach nowotworów [16,17].

Z mechanizmów MSC promujących progresję nowotworu wyróżnia się utrzymywanie sygnałów proliferacyjnych komórek nowotworowych, stymulację przejścia epithelialno-mezenchymalnego (EMT, ang. Epithelial–Mesenchymal Transition), czy wpływanie na metabolizm komórek nowotworowych. Często w procesach tych biorą udział pęcherzyki zewnątrzkomórkowe poprzez przesyłanie informacji biologicznych. Kolejne wymieniane mechanizmy to zmiana fenotypu komórek na fenotyp CAF, stymulacja mechanizmów naprawczych poprzez angiogenezę guza, indukowanie immunosupresyjnego środowiska czy degradację ECM. Nie należy pomijać ich potencjalnego udziału w nadawaniu komórkom nowotworowym oporności na leki [18]. Oprócz standardowego mechanizmu migracji do mikrośrodowiska nowotworowego opisanego powyżej, MSC już w miejscu docelowym reagują na sygnały parakryne m.in. poprzez wydzielanie metaloproteinaz. Cząsteczki te mają działanie degradacyjne na białka macierzy zewnątrzkomórkowej, co sprzyja dalszej migracji MSC do guza. Jeszcze innym mechanizmem migracji może być wydzielanie pęcherzyków pozakomórkowych, takich jak egzosomów. Wykazano, że komórki nowotworowe wydzielające egzosomy, które powodują sekrecję CXCL1, CCL2 czy IL-6 przez komórki macierzyste, promują w ten sposób ich dalszą migrację do TME [19]. Wydzielane egzosomy zawierają m.in. białka oraz mikroRNA. Biorą one udział w patologicznych mechanizmach zachodzących w TME. Poprzez regulację interleukiny 6, promują wzrost komórek

nowotworowych. Co więcej, mikroRNA również może brać udział w głównych mechanizmach wspierających wzrost guza. Kolejnym wcześniej wspomnianym mechanizmem jest promocja przejścia epithelialno-mezenchymalnego. Podczas EMT komórki nabłonka tracą polarność na skutek przebudowy macierzy pozakomórkowej. Skutkiem tego jest zmniejszona przyczepność komórek, a co za tym idzie zwiększona inwazyjność nowotworu. Ponadto, MSC mają zdolność do regulowania komórek odpornościowych poprzez wytwarzanie prostaglandyny (PGE, ang. Prostaglandins) E2, transformującego czynnika wzrostu beta (TGF- $\beta$ , ang. Transforming Growth Factor-beta) oraz IL10. Zdolności immunoregulacyjne tych komórek mogą powodować hamowanie wzrostu wielu komórek odpornościowych, w tym limfocytów B, limfocytów T i komórek NK. Dodatkowo, inny mechanizm MSC zwiększa ekspresję ligandów CCR2, które w odpowiedzi mogą rekrutować komórki immunosupresyjne do mikrośrodowiska guza. W związku z wciąż rosnącą liczbą diagnozowanych chorób nowotworowych oraz nadal dużą liczbą przypadków śmiertelnych, coraz częściej bada się mechanizmy wpływu TME na oporność komórek nowotworowych na podawane leki. Wskazuje się, że to właśnie komórki zrębowe pomagają komórkom rakowym ominąć skuteczne działanie leków. Ma to związek z parakrynnym działaniem tych komórek, takim jak wydzielanie IL-6, CXCL8, IL10, IGF-1, czy też czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF, ang. Vascular Endothelial Growth Factor). VEGF pełni wspierającą rolę w angiogenezie komórek nowotworowych. Co ważne, MSC mają również wpływ na aktywację szlaków sygnalizacyjnych, takich jak PI3K/Akt, ERK, czy tłumienie sygnalizacji PTEN, co w końcowym efekcie zwiększa oporność komórek nowotworowych na leki [15–18,20]. Istnieją również doniesienia literaturowe sugerujące kolejny mechanizm promowania progresji nowotworu przez MSC, jakim jest ich przejście w fibroblasty związane z rakiem. Konwersja ta wiąże się z przeprogramowaniem epigenetycznym. W raku trzustki zaobserwowano, że przeprogramowanie indukowane jest poprzez mleczan wydzielany przez komórki nowotworowe [21]. W raku prostaty oraz pęcherza moczowego wskazuje się na zależność od sygnalizacji TGF- $\beta$  [22,23].

Obecne doniesienia wskazują, że MSCs mają wpływ na progresję raka i większość tych badań dowodzi, że ich działanie jest skierowane ku promocji progresji choroby. Jednakże, nie należy ignorować badań podkreślających ich hamującą rolę w stosunku do postępu choroby nowotworowej. Mogą mieć na to wpływ takie mechanizmy, jak wzmocnienie odpowiedzi immunologicznej, hamowanie angiogenezy, czy indukcja apoptozy komórek nowotworowych

poprzez regulację szlaków sygnalizacyjnych [24]. Dowodzi się, że MSC wyizolowane z ludzkiego płynu owodniowego mogą blokować szlak sygnalizacyjny Wnt/B-keniny oraz szlak IGF-1R/PI3K/AKT w komórkach raka wątroby. Efektem jest niższy poziom proliferacji i zwiększona apoptoza komórek nowotworowych [25].

Kolejnym równie ważnym aspektem badań nad wpływem mezenchymalnych komórek macierzystych na komórki nowotworowe jest ich wykorzystanie jako nośniki leków. Jak wcześniej wspomniano, MSC mają zdolność migracji do środowiska zapalnego, a tym samym do mikrośrodowiska nowotworowego. Tropizm ten może być wykorzystany do kierowania cząsteczek bezpośrednio do guza. Takie podejście może eliminować szereg skutków ubocznych występujących w terapii systemowej. W badaniu *in vivo* rozsialego raka prostaty zaprojektowano model bazujący na dostarczaniu leku poprzez MSC bezpośrednio do jego mikrośrodowiska. Wykazano, że MSC uwalniając selektywnie prolek indukują apoptozę w komórkach nowotworowych. Ponadto, zaprojektowane platformy zastosowane w badaniach ksenoprzeszczepów hamują wzrost guza, co sugeruje, że mezenchymalne komórki macierzyste jako nośnik leku nie osłabiają działania dostarczanej substancji biologicznie aktywnej [26].

Innym badanym podejściem jest wykorzystanie egzosomów wydzielanych przez MSC w celu dostarczania cząsteczek, takich jak miRNA. Obserwuje się, że nadekspresja genu *Lethal 7c* (*let-7c*) zmniejsza proliferację i przeżycie komórek raka prostaty poprzez supresję interleukiny 6. Na tej podstawie zaprojektowano eksperyment dostarczania tej cząsteczki do raka prostaty przy użyciu egzosomów wydzielanych przez MSC. Po dostarczeniu miR-*let-7c* odnotowano zmniejszoną proliferację i migrację komórek nowotworowych [27]. Nadekspresję kinazy PLK-1 wykrywa się m.in. w nawracającym i dającym przerzuty raku pęcherza moczowego. Wykorzystując egzosomy jako wektor do dostarczania RNA zaprojektowano transport PLK-1 siRNA do komórek raka pęcherza moczowego. Potwierdzono możliwość wykorzystywania naturalnych egzosomów MSC jako nośnika PLK-1 siRNA, który skutecznie wycisza ekspresję badanej kinazy, powodując tym samym spadek proliferacji oraz indukcję apoptozy komórek nowotworowych [28]. Wydaje się, że systemy dostarczania leków oparte na MSC mogą być obiecującym narzędziem do neutralizowania składników mikrośrodowiska nowotworowego, które regulują progresję raka.

#### 1.4 Fibroblasty związane z rakiem w mikrośrodowisku guza

Fibroblasty związane z rakiem stanowią najbardziej powszechny typ komórek w zrębie guza. Współistnieją jako heterogenna populacja obejmująca inne komórki o podobnym fenotypie [15]. Wskazuje się, że MSC i CAF mają podobne zdolności proliferacyjne oraz fenotypowe, jednak różnią się ekspresją genów, wzorcem metylacji DNA, czy też zdolnościami immunomodulacyjnymi. Badania *in vitro* obrazują podobieństwo w ekspresji markerów powierzchniowych, ale również możliwości różnicowania w osteoblasty, chondrocyty i adipocyty. Istnieją doniesienia, że fibroblasty wyizolowane z tkanki nowotworowej mogą proliferować w niezmienionej postaci podobną liczbę pasaży, jak komórki macierzyste. W kontekście badań TME, podobieństwa te stanowią przeszkodę w prawidłowej identyfikacji komórek i odpowiadających im funkcji w progresji nowotworu [29,30].

CAF to fibroblasty, które znajdują się w zrębie lub pobliskim środowisku guza. Innymi wymienianymi źródłami CAF są MSC, komórki śródbłonna czy adipocyty. Fibroblasty zostają aktywowane przez cząsteczki pozakomórkowe syntetyzowane w mikrośrodowisku nowotworowym, przebudowę ECM, stres oksydacyjny i reaktywne formy tlenu, czy też modulację epigenetyczną. Po aktywacji różnicują się w CAF lub miofibroblasty. CAF stają się wtedy metabolicznie aktywne, intensywnie proliferują i wydzielają liczne mediatory zewnątrzkomórkowe, wpływając w ten sposób na komunikację międzykomórkową w całym TME [31]. Jednym z głównych czynników prowadzących do aktywacji fibroblastów jest TGF- $\beta$ , który wpływa na wzrost i różnicowanie komórek. Badania *in vitro* wskazują, że egzosomy z komórek raka pęcherza moczowego wpływają na aktywację fibroblastów. Postawiono hipotezę, że TGF- $\beta$  jest uwalniany z pęcherzyków zewnątrzkomórkowych i wiąże się z powierzchnią fibroblastów, aktywując szlak TGF- $\beta$ /SMAD. Obserwuje się istotny wpływ TGF- $\beta$  na transformację fibroblastów do CAF [32]. Inną cząsteczką, która promuje transformację fibroblastów do CAF jest IL-1. Cząsteczka ta jako inicjator kaskady cytokin, może prowadzić do aktywacji szlaku JAK/STAT oraz indukcji szlaku LIF, co z kolei promuje stan zapalny [33]. Kolejnym wymienianym szlakiem sygnalizacyjnym odpowiedzialnym za transformację fibroblastów w TME jest szlak IGF1/IGF1R. Obserwuje się aktywację i mobilizację fibroblastów współhodowanych z komórkami raka piersi powiązaną ze zwiększoną ekspresją insulinopodobnego czynnika wzrostu I (IGF-1, ang. Insulin-like Growth Factor I). Po wyciszeniu ekspresji IGF-1 lub receptora dla IGF-1, IGF-1R, następuje spadek



ekspresji aktyny mięśni gładkich alfa ( $\alpha$ -SMA, ang. Alpha Smooth Muscle Actin) i aktywności migracyjnej. Co więcej, szlak IGF1/IGF1R wpływa na inwazyjność komórek nowotworowych poprzez parakryne i chemotaktyczne działanie na CAF [34].

Heterogenną populację CAF można podzielić na grupy na podstawie ich markerów i ścieżek sygnalizacyjnych. Wyróżnia się 3 podtypy: miofibroblastyczne CAF (myCAF), które charakteryzują się wysoką ekspresją alfa-SMA, ale niską IL-6. Są aktywowane poprzez szlak TGF- $\beta$ /SMAD i mają wpływ na promowanie przerzutów i środowiska immunosupresyjnego. Kolejnym podtypem są immunomodulujące CAF (iCAF) o odwrotnej sygnaturze alfa-SMA i IL-6 do myCAF. Są one aktywowane przez szlak IL-1/LIF/JAK/STAT i ściśle związane ze stanem zapalnym, charakteryzują się też zwolnioną przebudową ECM. Ostatnim opisanym podtypem jest apCAF, zawierający geny MHC klasy II, stąd też ich nazwa CAF prezentujące antygen. Sugeruje się, że są regulowane przez ekspresję IFN- $\gamma$ . Jednak jest to, jak do tej pory, najmniej poznany podtyp CAF [35]. Wykorzystując sekwencjonowanie RNA pojedynczych komórek udokumentowano dodatkowy podtyp CAF - macierzy pozakomórkowej (eCAF), charakteryzujący się wysoką ekspresją genów związanych z inwazją nowotworu. Komórki te mogą mieć wyższy potencjał proliferacyjny niż inne CAF w mikrośrodowisku guza. Wykazują też zdolność chemotaksji makrofagów [36].

CAF w mikrośrodowisku raka mogą wspierać jego progresję. Istnieją jednak doniesienia, że niektóre podtypy CAF mogą hamować wzrost komórek nowotworowych, ze względu na ich heterogenność i plastyczność [37]. Część mechanizmów promujących proliferację i oporność komórek nowotworowych spowodowanych przez CAF zazębia się z tymi opisywanymi w przypadku mezenchymalnych komórek macierzystych. Wymienia się przede wszystkim ich komunikację w mikrośrodowisku poprzez wydzielanie czynników wywołujących immunosupresję, angiogenezę, przebudowę ECM, wzrost komórek guza, czy przyśpieszony metabolizm. Do wydzielanych regulatorów immunosupresji zaliczyć można TGF- $\beta$ , który silnie wpływa na komórki odpornościowe, czy prostaglandyny, które przyczyniają się do zmniejszenia aktywności limfocytów T, zwiększenia ich różnicowania w kierunku Th17 i zwiększenia produkcji IL-6. Co z kolei wiąże się z agresywnym wzrostem guza i krótszym czasem przeżycia. Ponadto, IL-6 reguluje również inwazyjność komórek raka i podobnie jak PGE bierze udział w procesie różnicowania limfocytów do Th17 [37,38]. Kolejnym mechanizmem immunoregulacyjnym CAF jest tworzenie tzw. bariery fizycznej. Zjawisko to

nazywane jest wykluczeniem immunologicznym i może być związane z brakiem odpowiedzi na leczenie blokadą PD-L1 lub CTLA-4. Bariera ta jest tworzona przez zręb komórek bogatych w heterogenną populację CAF. Dodatkowo, udokumentowano również dodatnią korelację CAF z PD-L1. Fibroblasty związane z rakiem mogą wykazywać zwiększoną ekspresję chemokiny CXCL5, który promuje ekspresję PD-L1 poprzez szlak sygnalizacyjny PI3K/AKT. Niektóre subpopulacje CAF sprzyjają komórkom nowotworowym poprzez pośredniczenie w stanie zapalnym wywołanym rekrutacją komórek mieloidalnych, do których zaliczamy monocyty, czy granulocytarne komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego [39]. Do promowania angiogenezy CAF w głównej mierze wykorzystują czynniki, takie jak CXCL12, czy VEGF. Do regulowania odpowiedzi immunologicznej i angiogenezy, poza wyżej wspomnianym parakrynnym wpływem CAF, zastosowanie ma również ich podstawowa funkcja jako fibroblastów – przebudowa i synteza białek ECM. Za pomocą metaloproteiny są one w stanie stale odbudowywać ECM, tworząc przestrzeń do proliferacji i migracji komórek nowotworowych. Ponadto, podczas przebudowy dochodzi do modyfikacji ECM i uwalniania czynników wzrostu i chemokin wspomagających funkcjonowanie guza. W agresywnym przebiegu może dochodzić nawet do przebudowy odległych tkanek, co z kolei wiąże się z powstawaniem przerzutów [37]. Podobnie jak MSC, fibroblasty związane z rakiem mają zdolność indukowania EMT w komórkach nowotworowych. Wykazuje się także, że CAF mogą stanowić główne źródło IL-6 w środowisku raka jajnika. A z kolei IL-6, oprócz promowania proliferacji, inwazji i przeżycia komórek raka jajnika, może wspomagać również przejście epitelialno-mezenchymalne. Co więcej, zablokowanie TGF- $\beta$  w TME raka jajnika może prowadzić do hamowania EMT i zmniejszenia oporności komórek raka jajnika na paklitaxel [40]. Uznaje się, że CAF stanowią największą heterogenną część zrębu guza i odgrywają kluczową rolę w progresji nowotworu. Oprócz wpływu na lekooporność komórek nowotworowych, CAF mogą indukować również oporność na radioterapię. W raku nosowo-gardłowym wskazuje się na regulację szlaku NF- $\kappa$ B przez fibroblasty związane z rakiem, co skutkuje mniejszą wrażliwością na napromieniowanie [41]. Istnieją doniesienia sugerujące, że CAF wpływają również na wrażliwość komórek raka prostaty i raka piersi na radioterapię [42].

Zarówno subpopulacje CAF, jak i MSC promujące progresję nowotworową są przynajmniej częściowo odpowiedzialne za nabywanie immunosupresyjnego i prozapalnego środowiska. Mają działanie proproliferacyjne, proangiogenne i proinwazyjne na komórki

nowotworowe. Poprzez bezpośrednie i pośrednie interakcje w mikrośrodowisku guza wpływają również na szlaki sygnalizacyjne i powodują przyspieszenie progresji nowotworu. Biorąc pod uwagę plastyczność tych komórek, niezwykle ważne wydaje się badanie tych interakcji i poszukiwanie cząsteczek pośredniczących w wymienianych mechanizmach, które można wykorzystać jako cel terapeutyczny personalizowanej medycyny. Komórki te są ważnymi czynnikami w rozwoju raka i stanowią istotny kierunek badań. Nie ma wątpliwości, że rozpuszczalne mediatory i pęcherzyki pozakomórkowe mają kluczowe znaczenie dla tych interakcji.

### **1.5 TME jako cel terapii personalizowanej**

Już na początku badań nad mikrośrodowiskiem nowotworowym uznano, że może ono stanowić obiecujący cel terapeutyczny. Zaobserwowano przede wszystkim, że komórki „normalne” w TME, które są bardziej stabilne niż heterogenne komórki nowotworowe są łatwiejszym do zlokalizowania celem terapeutycznym. Sugerowano, że ukierunkowanie leczenia na cząsteczki znajdujące się w TME, czy blokowanie angiogenezy guza może być korzystnym podejściem we wszystkich typach nowotworów [43]. Strategia ta częściowo zmieniła się na przestrzeni ostatniej dekady. Obecnie wiadomo, że powodzenie terapii zależy od miejsca powstania, stadium zaawansowania oraz specyficzności guza. Nie ulega wątpliwości, że komórki nowotworowe mogą adoptować się do warunków środowiska, na przykład poprzez nabywanie oporności na leczenie czy sterowanie mikrośrodowiskiem. Rozwój badań uwidoczniał heterogenność nowotworową i wskazał, że niezbędne jest personalizowanie strategii terapeutycznych, a zaawansowana diagnostyka jest niezwykle istotna w rozwoju terapii celowanej. Zdobyta wiedza na przestrzeni lat wykazała również, że nie wszystkie cząsteczki w mikrośrodowisku guza wspomagają jego rozwój. Wskazuje się, że TME jest heterogenne i niestabilne. Nie zmienia to jednak faktu, że w dalszym ciągu stanowi korzystny cel terapeutyczny [44].

Coraz bardziej popularnym kierunkiem badań klinicznych jest ocena wpływu terapii skojarzonej mającej na celu uwrażliwienie komórek nowotworowych na leczenie farmakologiczne. Jednym z tego typu badań jest trwające badanie kliniczne NCT03517449 raka endometrium, w którym stosuje się Pembrolizumab (anty PD-1) w połączeniu z blokowaniem receptora czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego w porównaniu do standardowo proponowanej terapii. Już wstępnie opublikowane wyniki wykazują wyższość terapii

eksperymentalnej [45]. Innym podejściem jest ukierunkowanie na cząsteczki powodujące przewlekły stan zapalny w TME. Jednym z takich badań klinicznych jest badanie 1 fazy NCT0374234 z 64 aktywnymi uczestnikami. Założeniem eksperymentu jest blokowanie IL-1 $\beta$  w raku piersi [46]. Inne strategie skupiają się na celowaniu w największą populację komórek w TME – CAF, egzosomy, białka ECM, a nawet metabolizm TME [43,44,47]. Istnieje wiele doniesień o profilowaniu i ukierunkowaniu CAF. Jednym z takich badań było badanie 1 fazy NCT00793208 nad szczepionką na niedrobnokomórkowego raka płuc. Eksperyment zakładał pobranie fragmentu guza, izolację CAF i ich transfekcję. Celem było wywołanie odpowiedzi immunologicznej na nowotwór autologiczny, pochodzący od pacjenta. W związku z małą ilością potencjalnych pacjentów badanie zostało zamknięte [48]. Aktualnie rekrutującym interwencyjnym badaniem fazy I, ukierunkowanym na CAF, a dokładniej na białko aktywujące fibroblasty oraz CD40 jest NCT05098405. Eksperyment zakłada badanie bezpieczeństwa i tolerancji leku MP0317 u pacjentów z nawrotowymi opornymi na leczenie guzami litymi. Zakończenie badania z 78 uczestnikami szacuje się na połowę 2024 roku [49]. Wciąż pozostaje jednak wiele niewiadomych. Nie wszystkie rodzaje komórek nowotworowych zostały przebadane, nie wszystkie reakcje zostały zidentyfikowane. Każdy typ guza powinien być rozpatrywany jako choroba indywidualna, inna u każdego pacjenta, wymagająca spersonalizowanego podejścia terapeutycznego. Cały czas kładzie się nacisk na konieczność prowadzenia badań podstawowych celem poszerzenia tej wiedzy, co w ostateczności ma prowadzić do nowych rozwiązań [44,47,50].

## **1.6 Badania na modelu *in vitro***

Nie podlega wątpliwości, że badania podstawowe *in vitro* mają liczne ograniczenia, które należy brać pod uwagę przy interpretacji wyników. Krytycznym aspektem wydaje się uproszczenie, jakim jest ten model biologiczny. Organizm ludzki stanowi złożoną całość, zawierającą mechanizmy komunikacji międzykomórkowych, które umożliwiają m.in., kompensację warunków stresowych. Demonstruje się jednak, że systemy te mogą być utracone po izolacji komórek. Różnice w metabolizmie wyizolowanych komórek i brak innych typów komórek, z którymi współistnieją to kolejne aspekty, które należy brać pod uwagę stosując ten model biologiczny. Optymalizacja hodowli stanowi krytyczny krok przy prowadzeniu tego typu badań. Ustalane są wtedy warunki hodowli, w których wyizolowane komórki zachowują podobny poziom regulacji genów, jak w badaniach *in vivo*. Podczas

przenoszenia badań z modelu *in vitro* na model *in vivo* należy spodziewać się trudności w ekstrapolacji dawek, czy nowych interakcji wynikających z komunikacji między różnymi typami komórek [51,52].

Nie należy jednak ignorować faktu, że to właśnie badania *in vitro* przyczyniły się do zrozumienia wielu mechanizmów, w tym mechanizmów toksyczności. W dalszym ciągu to właśnie badania *in vitro* wydają się być złotym standardem podczas określania cytotoxyczności cząsteczek. Istnieje ogromna potrzeba prowadzenia badań podstawowych, które umożliwią poszerzenie już zdobytej wiedzy na temat funkcjonowania narządów [51,53]. Szczególnie istotne jest zastosowanie tego modelu w monitorowaniu interakcji między różnymi typami komórek w mikrośrodowisku guza.

## 2 Cel pracy

Celem pracy doktorskiej była:

- analiza wpływu rozpuszczalnych mediatorów syntetyzowanych przez fibroblasty związane z rakiem na skład sekretomu, przeżywalność, proliferację i apoptozę komórek raka prostaty i raka pęcherza moczowego,
- analiza wpływu cząsteczek syntetyzowanych przez fibroblasty związane z rakiem na wrażliwość komórek raka prostaty i raka pęcherza moczowego na stosowane chemioterapeutyki,
- analiza wpływu neutralizacji wybranych składników TME na wrażliwość komórek raka prostaty i raka pęcherza moczowego na stosowane chemioterapeutyki,
- analiza wpływu cząsteczek syntetyzowanych przez mezenchymalne komórki macierzyste na wrażliwość komórek raka prostaty i raka pęcherza moczowego na stosowane chemioterapeutyki.

### 3 Materiały i metody

#### 3.1 Linie komórkowe

Wykorzystano dwie linie komórek nowotworowych. Linię raka pęcherza moczowego HB-CLS-1 (nr kat. 300190) o III stopniu zaawansowania (CLS, Niemcy) oraz linię raka prostaty HTB-81 (nr kat. DU 145) o III stopniu zaawansowania (ATCC, USA). Jako komórki reprezentujące część mikrośrodowiska guza wykorzystano MSC oraz CAF. Unieśmiertelnione mezenchymalne komórki macierzyste, pochodzące z tkanki tłuszczowej ASCStelo, zakupiono z ATCC (USA). Producent wskazuje, że ASCStelo hodowane w optymalnych warunkach zachowują multipotencjalne właściwości i wysoką ekspresję markerów powierzchniowych CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 oraz niską ekspresję markerów CD14, CD31, CD34 i CD45. Pierwotną linię komórkową fibroblastów związanych z rakiem HC-6223 zakupiono od Cell Biologics (USA). Zostały one wyizolowane z ludzkiej tkanki guza prostaty. Poniżej zebrano podstawowe informacje o zastosowanych liniach komórkowych (Tabela 1).

**Tabela 1.** Charakterystyka użytych linii komórkowych.

	<b>HB-CLS-1</b>	<b>DU 145</b>	<b>ACSCtelo</b>	<b>HC-6223</b>
<b>Kategoria</b>	Komórki ludzkie	Komórki ludzkie	Komórki ludzkie	Komórki ludzkie
<b>Źródło</b>	Rak pęcherza moczowego	Rak prostaty	Tkanka tłuszczowa	Rak prostaty
<b>Stopień zaawansowania</b>	III	III	Nie dotyczy	Brak danych
<b>Płeć dawcy</b>	Mężczyzna	Mężczyzna	Kobieta	Brak danych
<b>Wiek dawcy</b>	62	69	Brak danych	Brak danych
<b>Morfologia</b>	Epitelialno-podobne	Epitelialno-podobne	Fibroblasto-podobne	Fibroblasto-podobne
<b>Właściwości wzrostu</b>	adherentne	adherentne	adherentne	adherentne
<b>Oznaczenie handlowe</b>	300190	HTB-81	SCRC-4000	M2267

### 3.2 Hodowla komórek

Odczynniki używane do hodowli komórkowej, jeśli nie wskazano inaczej, zakupiono z firmy Corning (USA). Linie komórek nowotworowych HB-CLS-1 oraz DU145 hodowano w medium RPMI1640 z suplementacją płodowej surowicy bydlęcej (FBS, ang. Fetal Bovine Serum) w objętości 10% całego medium. Hodowlę ASCStelo prowadzono w medium DMEM/Ham's F-12 z suplementacją FBS w objętości 10% oraz dodatkiem 10ng/ml FGFβ (Thermo Fisher Scientific, USA). Pierwotną linię fibroblastów związanych z rakiem HC-6223 hodowano według zaleceń producenta, w kompletnym medium przeznaczonym do hodowli fibroblastów (Complete Fibroblast Medium /w Kit, Cell Biologics, USA). Komórki przechowywano w standardowych warunkach hodowlanych w inkubatorze Jouan – 5% zawartości CO<sub>2</sub>, temperatura 37°C, stała wilgotność. Morfologię komórek obserwowano pod mikroskopem o odwróconej optyce (CKX53, Olympus), w powiększeniu 10x.

Medium hodowlane zmieniano na świeże według zaleceń producenta, wskazanych w Tabeli 2. Po osiągnięciu 80% - 90% konfluencji, komórki pasażowano celem przedłużenia hodowli. Zużyte medium hodowlane usuwano, a następnie przemywano powierzchnię wzrostową roztworem zbuforowanej soli fizjologicznej bez jonów magnezu i wapnia (PBS). Aby oddzielić komórki od dna butelki hodowlanej stosowano 0,25% roztwór trypsyny z dodatkiem 2,21 mM EDTA, z wyjątkiem pierwotnej linii HC-6223, gdzie stosowano 0,05% roztwór trypsyny (Trypsin-EDTA 0,05% Solution, Cell Biologics, USA). Komórki z enzymem inkubowano około 3 minuty w 37°C. Po tym czasie, trypsynę inaktywowano równą objętością pożywki hodowlanej. Zawiesinę przenoszono do sterylnej probówki i wirowano przez 3 min (350 RCF). Uzyskany osad komórkowy zawieszano w 1-2ml standardowego medium i oceniano żywotność hodowli. Aby zapewnić optymalną proliferację, komórki wysiewano na sterylne butelki hodowlane (T25) w proporcjach charakterystycznych dla danej linii komórkowej, wskazanych w Tabeli 2. Przy linii pierwotnej HC-6223 niezbędne było stosowanie roztworu na bazie żelatyny (0,2% Gelatin-Based Coating Solution, Cell Biologics, USA) do pokrywania powierzchni wzrostowej.



**Tabela 2.** Warunki hodowli zastosowanych linii komórkowych.

	<b>HB-CLS-1</b>	<b>DU145</b>	<b>ACSCtelo</b>	<b>HC-6223</b>
<b>Medium hodowlane</b>	RPMI1640	RPMI1640	DMEM/Ham's F-12	Complete Fibroblast Medium
<b>Suplementacja</b>	10% FBS	10% FBS	10ng/ml $\beta$ FGF 10% FBS	Hydrokortyzon, L-Glutamina, Antybiotyk, Przeciwgrzybiczy roztwór, FBS
<b>Proporcje pasażu</b>	1:4 do 1:8	1:4 do 1:6	W gęstości $5 \times 10^4 / \text{cm}^2$	1:2
<b>Częstotliwość zmiany medium</b>	2/3 razy w tygodniu	2/3 razy w tygodniu	2/3 razy w tygodniu	1/2 razy na tydzień

Do oceny żywotności hodowli wykorzystywano sterylny roztwór błękitu trypanu 0,4% (Sigma, Niemcy). Barwnik ten ma właściwości przenikania przez uszkodzoną błonę komórkową. Komórki niezdolne do przeżycia absorbują barwnik i są widoczne pod mikroskopem w kolorze niebieskim. Osad po odwirowaniu komórek w trakcie procedury pasażu zawieszano w standardowym medium hodowlanym, następnie pobierano równą objętość zawiesiny komórkowej i mieszano z równą objętością barwnika. Roztwór wprowadzano do kanałów hemocytometru (komora Neubauer) i liczono komórki z wykorzystaniem mikroskopu o odwróconej optyce (CKX53, Olympus). Liczbę żywych komórek określano przy użyciu wzoru:

$$A/4 \times 2 \times 10^4 \times B$$

gdzie:

A – Liczba komórek zliczona z czterech narożnych kwadratów komory,

B – objętość medium [ml] użytego do zawieszenia komórek.

Do dalszych badań stosowano komórki, które osiągały 95% żywotności.

### **3.2.1 Przygotowanie medium kondycjonowanego**

W pracy wykorzystano już wcześniej opracowaną metodę przygotowania medium kondycjonowanego (CM, ang. Conditioned Medium) [54]. Komórki ASCStelo oraz komórki HC-6223 wysiewano na butelkę hodowlaną (T75) w gęstości  $1 \times 10^4 / \text{cm}^2$ . Po 24h wstępnej inkubacji, medium zmieniano na świeże. Medium kondycjonowane zawierające cząsteczki wydzielane przez mezenchymalne komórki macierzyste (MSC-CM) lub fibroblasty związane z rakiem (CAF-CM), takie jak metabolity, czynniki wzrostu, białka ECM zbierano po 72h hodowli. Próbkę odwirowywano, filtrowano (Steritop Membrane Filter, Merck Millipore, USA) i przechowywano w temperaturze  $-20^\circ\text{C}$  celem późniejszego użycia. W trakcie wykonywania eksperymentów medium kondycjonowane rozmrażano i stosowano w proporcji 1:1 ze standardowym medium wzrostowym danej linii komórkowej.

### **3.3 Roztwory leków**

W pracy doktorskiej zastosowano ciprofloksacynę (Sigma-Aldrich, Niemcy) jako modelowy lek na raka pęcherza moczowego. Celem analizy wpływu CAF-CM oraz ASCS-CM na komórki raka pęcherza moczowego określono połowę maksymalnego stężenia hamującego (IC, ang. Inhibitory Concentration), czyli takiego stężenia, które hamuje wzrost danej linii komórkowej o 50% - IC50. Jako dodatkowe stężenia określono IC10 oraz IC90, czyli stężenia hamujące wzrost odpowiednio o 10% i 90%.

Jako modelowy lek na raka prostaty zastosowano cisplatynę (Cayman Chemical, USA). W trakcie analizy wpływu ASCS-CM i CAF-CM na wrażliwość komórek raka prostaty na leczenie stosowano stężenia hamujące, takie jak IC10, IC50 i IC90.

### **3.4 Ocena wpływu CAF-CM na sekretom komórek nowotworowych**

W celu określenia zmian w składzie zbioru cząsteczek wydzielanych przez linie komórek nowotworowych po interakcji z mediatorami znajdującymi się w medium kondycjonowanym z CAF wykorzystano dostępne komercyjnie testy ELISA. Linie komórkowe DU145 i HB-CLS-1 wysiewano na płytkę 96-dołkową w gęstości  $2 \times 10^3$  komórek/ $\text{cm}^2$ . Po 24h preinkubacji standardowe medium wzrostowe zmieniano na CAF-CM. Jako kontrolę stosowano komórki hodowane w RPMI1640 w objętości 1:1 z kompletnym medium fibroblastów. Komórki inkubowano 48h lub 72h. Po tym czasie usuwano pożywkę i zmieniano na świeże standardowe medium wzrostowe. Po kolejnych 24h przeprowadzano analizę uzyskanych supernatantów.

### **3.4.1 Analiza panelu cytokin i chemokin**

Do określenia poziomu cytokin/chemokin (IL1B, IL1A, IL4, IL6, IL8, IFN $\gamma$ , IFN $\alpha$ , Gm-csf, MIP-1a, TGF- $\beta$ , IL13) stosowano Human Mix-N-Match Multi-Analyte ELISArray KIT (Qiagen, Niemcy). Test wykonywano zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Przygotowane supernatanty przenoszono na 96-dołkową płytkę opłaszczoną przeciwciałami (ELISArray<sup>tm</sup>), inkubowano i płukano. W kolejnym kroku dodawano przeciwciała II-rzędowe, ponownie inkubowano i przemywano, a następnie dodawano awidynę sprzężoną z peroksydazą chrzanową (HRP, ang. Horseradish Peroxidase). Po kolejnej inkubacji przeprowadzano płukanie końcowe płytki i dodawano substrat dla enzymu. Na tym etapie pozytywne próbki barwią się na kolor niebieski. Po zatrzymaniu reakcji zmieniają kolor na żółty. Intensywność zabarwienia jest wprost proporcjonalna do liczby identyfikowanej cząsteczki. Absorbancję mierzono czytnikiem płytek (Multiskan Sky, Thermo Fisher Scientific) przy długości fali 450nm.

### **3.4.2 Analiza zmian ekspresji IL-33**

Do analizy zmian w ekspresji IL-33 stosowano Human IL-33 ELISA kit (Invitrogen, USA). Test wykonywano zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Przygotowane supernatanty przenoszono na przepłukaną wcześniej 96-dołkową płytkę opłaszczoną przeciwciałem przeciwko ludzkiej IL-33, inkubowano i ponownie płukano. Następnie dodawano koniugat biotyny (ang. biotin-conjugated anti-human IL-33) celem związania IL-33 wychwyconej przez pierwsze przeciwciało. Po raz kolejny płytkę dokładnie płukano i dodawano streptawidynę sprzężoną z HRP, aby związać koniugat biotyny przeciwciała IL-33. Po końcowym płukaniu dodawano substrat dla enzymu. Przed odczytaniem wyników zatrzymywano reakcję poprzez dodanie STOP solution. Absorbancję mierzono czytnikiem płytek (Multiskan Sky, Thermo Fisher Scientific) przy długości fali 450nm.

### **3.5 Ocena żywotność komórek nowotworowych przy użyciu testu MTT**

Aby ocenić wpływ cząsteczek wydzielanych przez CAF na żywotność komórek nowotworowych stosowano test MTT. Opiera się on na konwersji barwnika MTT (Bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ylo)-2,5-difenylotetrazolinowy) do nierozpuszczalnego purpurowego formazanu. Jest to wynik działania reduktazy mitochondrialnej aktywnych metabolicznie komórek. Kryształ formazanu są następnie rozpuszczane i powstaje barwny roztwór, którego

intensywność mierzona jest spektrofotometrycznie. Ilość zredukowanego barwnika uznawana jest za proporcjonalną do liczby aktywnych metabolicznie (żywych) komórek.

Linie komórek nowotworowych wysiewano na płytki 96-dołkowe w gęstości  $2 \times 10^3$  komórek/cm<sup>2</sup>. Po 24h preinkubacji standardowe medium wzrostowe zmieniano na CAF-CM. Jako kontrolę stosowano komórki hodowane w RPMI1640 w objętości 1:1 z kompletnym medium fibroblastów. Tak przygotowaną hodowlę inkubowano 48h lub 72h w warunkach standardowych. Następnie przeprowadzano analizę aktywności metabolicznej badanych komórek. Zużyte medium usuwano, powierzchnię wzrostową dołków przepłukiwano buforem PBS i dodawano roztwór MTT (1mg/ml, Sigma, Niemcy). Przygotowaną płytkę inkubowano 2h w 37°C. Uzyskane kryształy formazanu rozpuszczano w DMSO. Absorbancję mierzono czytnikiem płytek (Multiskan Sky, Thermo Fisher Scientific) przy długości fali 570nm.

### **3.6 Ocena proliferacji komórek nowotworowych przy użyciu testu BrdU**

W celu oceny wpływu mediatorów syntetyzowanych przez CAF na aktywność proliferacyjną komórek nowotworowych stosowano BrdU Cell Proliferation ELISA Kit (Abcam, Wielka Brytania). Test wykonywano zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Opiera się on na zastosowaniu syntetycznego analogu tymidyny 5-bromo-2'-deoksyurydyny (BrdU, ang. Bromodeoxyuridine), który wbudowuje się do DNA dzielącej się komórki. Detekcja BrdU polega na zastosowaniu specyficznego przeciwciała koniugowanego z HRP i reakcji enzymatycznej umożliwiającej powstanie barwnego roztworu do pomiaru kolorymetrycznego.

Linie raka pęcherza moczowego HB-CLS-1 i raka prostaty DU145 wysiewano na płytki 96-dołkowe w gęstości  $2 \times 10^3$  komórek/cm<sup>2</sup>. Po 24h preinkubacji, standardowe medium wzrostowe zmieniano na CAF-CM. Jako kontrolę stosowano komórki hodowane w RPMI1640 w objętości 1:1 z kompletnym medium fibroblastów. Przygotowane komórki inkubowano 48h lub 72h w warunkach standardowych. Od 12 do maksymalnie 24 godzin przed końcem inkubacji dodawano odczynnik BrdU. Zgodnie z protokołem komórki następnie utrwalano. Do suchych utrwalonych komórek dodawano przeciwciało I-rzędowe. Po inkubacji i płukaniu na płytkę dodawano przeciwciało II-rzędowe skoniugowane z HRP. W końcowym etapie komórki traktowano substratem dla HRP. Przed odczytem wyników reakcję enzymatyczną

zatrzymywano przy użyciu STOP solution. Absorbancję mierzono czytnikiem płytek (Multiskan Sky, Thermo Fisher Scientific) przy długości fali 450nm.

### **3.7 Analiza apoptozy komórek nowotworowych**

W celu oceny wpływu CAF-CM na apoptozę komórek raka pęcherza moczowego i raka prostaty stosowano barwienie CellEvent Caspase-3/7 Green (ThermoFisher, USA). Test umożliwia identyfikację komórek apoptotycznych, wybarwiając komórki z aktywną kaspazą 3/7. Test standardowo przeprowadzany jest na żywych nieutrwalonych komórkach.

Linie komórek nowotworowych wysiewano na płytki 96-dołkowe w gęstości  $2 \times 10^3$  komórek/cm<sup>2</sup>. Po 24h preinkubacji standardowe medium wzrostowe zmieniano na CAF-CM, jako kontrolę stosowano komórki hodowane w RPMI1640 w objętości 1:1 z kompletnym medium fibroblastów. Przygotowaną płytkę inkubowano 48h w warunkach standardowych. Następnie dodawano barwnik CellEvent Caspase 3/7 Green i inkubowano przez 2h. Komórki analizowano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego o odwróconej optyce (Olympus). Przed końcem inkubacji dodawano również barwnik Hoechst 33342 w celu wybarwienia jąder komórkowych, pomocniczo przy liczeniu i rozpoznawaniu komórek. Komórki apoptotyczne obserwowano z użyciem FITC, a jądra komórkowe z użyciem DAPI.

### **3.8 Analiza aktywacji szlaków sygnalizacyjnych**

Analizę wpływu CAF-CM na aktywację wybranych szlaków sygnalizacyjnych przeprowadzono przy użyciu ERK/AKT/p70 S6K Activation InstantOne ELISA Kit (Invitrogen, USA), zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym (ERK, ang. Extracellular Signaling-Regulated Kinase) stanowi kluczowy składnik ścieżki kinazy białkowej aktywowanej mitogenem (MAPK, ang. Mitogen-activated Protein Kinases). Jest ona aktywowana w odpowiedzi na różne bodźce, w tym czynniki wzrostu i cytokiny. Jej aktywacja związana jest z fosforylacją białek, które odpowiadają za regulację licznych procesów komórkowych. AKT z kolei stanowi część szlaku sygnalizacyjnego PI3K/AKT/mTOR. Jego aktywacja prowadzi do wzrostu i proliferacji komórek. Białka produkowane w mikrośrodowisku guza mogą wzmacniać jego aktywację, prowadząc do progresji nowotworu. Aktywność p70 S6K jest regulowana przez wiele szlaków, w tym MAPK i mTOR, a jego aktywacja prowadzi do zwiększenia syntezy białek.

Białko p53 odgrywa istotną rolę w hamowaniu proliferacji uszkodzonych komórek. W związku z tym, w pracy doktorskiej oceniono ekspresję białka całkowitego oraz jego ufosforylowanej formy. Do analizy wykorzystano p53 (Total/Phospho) Multispecies InstantOne™ ELISA Kit (ThermoFisher, USA).

Linie komórek nowotworowych wysiewano na płytki 96-dołkowe w gęstości  $2 \times 10^3$  komórek/cm<sup>2</sup>. Po 24h preinkubacji standardowe medium wzrostowe zmieniano na CAF-CM. Jako kontrolę stosowano komórki hodowane w RPMI1640 w objętości 1:1 z kompletnym medium fibroblastów. Tak przygotowane komórki hodowano 48h lub 72h. Po tym czasie zużyte medium usuwano i powierzchnię dołków przemywano buforem PBS. Następnie przeprowadzano lizę komórek przy użyciu Cell Lysis Buffer Mix. Przygotowane próbki dodawano na płytkę InstantOne wraz z koktajlem przeciwciał I - i II-rzędowych. Po inkubacji dołki płytki przemywano i dodawano Detection Reagent. Po 30 minutach zatrzymywano reakcję z użyciem STOP solution. Absorbancję mierzono czytnikiem płytek (Multiskan Sky, Thermo Fisher Scientific) przy długości fali 450nm.

### **3.9 Ocena wpływu CAF-CM na wrażliwość komórek nowotworowych na zastosowane chemioterapeutyki**

#### **3.9.1 Wrażliwość komórek raka prostaty na cisplatynę**

W pracy doktorskiej oceniano wpływ medium kondycjonowanego z CAF na wrażliwość komórek raka prostaty na badany lek. Jako model zastosowano komórki DU145 traktowane cisplatyną w stężeniach IC10, IC50 i IC90. Stężenia hamujące identyfikowano przy użyciu testu MTT. Na płytkę 96-dołkową wysiewano komórki w gęstości  $2 \times 10^3$  komórek/cm<sup>2</sup>. Po 24h preinkubacji komórki traktowano różnymi stężeniami cisplatyny (0,5 - 20 μM) przez 24h i 48h. Po tym czasie wykonywano test MTT. Obniżenie żywotności komórek obliczano przez porównanie wyników absorbancji komórek traktowanych lekiem z wynikami kontroli, czyli komórek bez dodatku leku. Przy użyciu programu statystycznego GraphPad Prism wygenerowano równanie krzywej i wyznaczono logarytmiczną linię trendu, co umożliwiło uzyskanie wartości stężeń hamujących IC10, IC50 i IC90. Następnie celem analizy wrażliwości linii raka prostaty na wybrane stężenia cisplatyny, komórki wysiewano na płytki 96-dołkowe w gęstości  $2 \times 10^3$  komórek/cm<sup>2</sup>. Po 24h preinkubacji standardowe medium wzrostowe zmieniano na CAF-CM. Komórki inkubowano przez 48h w warunkach wzrostowych. Po tym

czasie zmieniano medium na świeże zawierające lek. Po kolejnych 48h hodowli, wykonywano test MTT i/lub test BrdU. Jako kontrolę stosowano komórki hodowane w standardowym medium wzrostowym w proporcji 1:1 z kompletnym medium fibroblastów.

### **3.9.2 Wrażliwość komórek raka pęcherza moczowego na ciprofloksacynę**

W celu oceny wpływu fibroblastów związanych z rakiem na wrażliwość komórek raka pęcherza moczowego na badany lek wykorzystano komórki HB-CLS-1 traktowane ciprofloksacyną w stężeniach IC10, IC50 i IC90. Stężenia hamujące identyfikowano przy użyciu testu MTT. Na płytkę 96-dołkową wysiewano komórki w gęstości  $2 \times 10^3$  komórek/cm<sup>2</sup>. Po 24h preinkubacji komórki traktowano różnymi stężeniami ciprofloksacyny (100-1000μM) przez dobę, a następnie wykonywano test MTT. Zmniejszenie żywotności komórek obliczano przez porównanie wyników absorbancji komórek traktowanych lekiem z wynikami kontroli, czyli komórek bez dodatku leku. Przy użyciu programu statystycznego GraphPad Prism wygenerowano równanie krzywej i wyznaczono logarytmiczną linię trendu, co umożliwiło uzyskanie wartości stężeń hamujących IC10, IC50 i IC90. Następnie celem analizy wrażliwości linii raka pęcherza moczowego na wybrane stężenia ciprofloksacyny komórki nowotworowe wysiewano na płytce 96-dołkowej w gęstości  $2 \times 10^3$  komórek/cm<sup>2</sup>. Po 24h preinkubacji standardowe medium wzrostowe zmieniano na CAF-CM. Tak przygotowane komórki inkubowano 48h w warunkach wzrostowych. Po tym czasie wymieniano medium na świeże zawierające lek. Po 24h wykonywano test MTT i/lub test BrdU. Jako kontrolę stosowano komórki hodowane w standardowym medium wzrostowym w proporcji 1:1 z kompletnym medium fibroblastów.

### **3.9.3 Ocena wpływu IL-33 na wrażliwość komórek nowotworowych na badane leki**

Aby zaobserwować zmiany po wykluczeniu IL-33 z CAF-CM stosowano przeciwciało neutralizujące IL-33 (Anti-hIL-33-IgG, InvivoGen, USA). Zgodnie z zaleceniami producenta przed każdym eksperymentem przygotowywano świeże medium kondycjonowane CAF z neutralizacją IL-33. CAF-CM z dodatkiem przeciwciała neutralizującego (2μg/ml) inkubowano 30 minut w 37°C. Następnie dodawano roztwór na płytkę z liniami komórek nowotworowych w proporcji 1:1 ze standardowym medium wzrostowym. W pierwszej kolejności analizowano wpływ neutralizacji IL-33 na komórki nowotworowe, a następnie analizowano wpływ neutralizacji IL-33 na wrażliwość komórek raka pęcherza moczowego i raka prostaty na wybrane leki. Linie komórek nowotworowych wysiewano na płytce 96-dołkowej w gęstości

$2 \times 10^3$  komórek/cm<sup>2</sup>. Po 24h preinkubacji standardowe medium wzrostowe zmieniano na przygotowane CAF-CM ze zneutralizowaną IL-33. Jako kontrolę stosowano komórki nowotworowe z CAF-CM bez neutralizacji IL-33. Po 48h hodowli wykonywano test MTT, a w przypadku analizy wrażliwości na płytkę dodawano leki w stężeniu odpowiadającym IC50. Do linii HB-CLS-1 dodawano ciprofloksacynę na 24h. Do linii DU145 dodawano cisplatynę na 48h. Po tym czasie wykonywano test MTT i/lub test BrdU.

#### **3.9.4 Ocena wpływu FGF2 na wrażliwość komórek nowotworowych na badane leki**

Aby zaobserwować zmiany wpływu neutralizacji czynnika wzrostu fibroblastów 2 (FGF2, ang. Fibroblast Growth Factor-2) z CAF-CM stosowano przeciwciało neutralizujące FGF2 (Anti-FGF-2/basic FGF (neutralizing) clone bFM-1, Merck, Niemcy). Zgodnie z zaleceniami producenta, przed każdym eksperymentem przygotowywano świeże CAF-CM z neutralizacją FGF2. CAF-CM z dodatkiem przeciwciała neutralizującego (5µg/ml) inkubowano 1h w 37°C. Następnie roztwory dodawano na płytkę z komórkami nowotworowymi w proporcji 1:1 ze standardowym medium wzrostowym. Na początku analizowano wpływ neutralizacji FGF2 na same komórki nowotworowe, a następnie wpływ na ich wrażliwość na leczenie farmakologiczne. W tym celu linie komórkowe wysiewano na płytki 96-dołkowe w gęstości  $2 \times 10^3$  komórek/cm<sup>2</sup>. Po 24h preinkubacji standardowe medium wzrostowe zmieniano na przygotowane CAF-CM ze zneutralizowanym FGF2. Jako kontrolę stosowano komórki nowotworowe z CAF-CM bez dodatku przeciwciał neutralizujących FGF2. Po 48h hodowli wykonywano test MTT, a w przypadku badania wrażliwości na chemioterapeutyki, na płytkę dodawano leki w stężeniu odpowiadającym IC50. Do linii HB-CLS-1 dodawano ciprofloksacynę na 24h, a do linii DU145 cisplatynę na 48h. Do analizy kolorymetrycznej zastosowano test MTT i test BrdU.

#### **3.10 Ocena wpływu ASCS-CM na wrażliwość komórek nowotworowych na zastosowane chemioterapeutyki**

W pracy doktorskiej sprawdzano również czy mediatory syntetyzowane przez mezenchymalne komórki macierzyste wpływają na wrażliwość komórek nowotworowych na stosowane chemioterapeutyki. Przed przystąpieniem do eksperymentów przygotowano medium kondycjonowane z ASCStelo zgodnie z metodą opisaną w rozdziale 3.2.1.



### **3.10.1 Wrażliwość komórek raka prostaty na cisplatinę**

Komórki raka prostaty wysiewano na płytki 96-dołkowe w gęstości  $2 \times 10^3$  komórek/cm<sup>2</sup>. Po 24h preinkubacji standardowe medium wzrostowe zmieniano na ASCS-CM. Przygotowaną hodowlę inkubowano przez 48h w warunkach wzrostowych. Po tym czasie zmieniano medium na świeże zawierające cisplatinę w stężeniach odpowiadających IC10, IC50 oraz IC90. Po kolejnych 48h hodowli, wykonywano test MTT i/lub test BrdU. Jako kontrolę stosowano komórki hodowane w standardowym medium wzrostowym w proporcji 1:1 z medium linii ASCStelo.

### **3.10.2 Wrażliwość komórek raka pęcherza moczowego na ciprofloksacynę**

Komórki raka pęcherza moczowego wysiewano na płytki 96-dołkowe w gęstości  $2 \times 10^3$  komórek/cm<sup>2</sup>. Po 24h preinkubacji standardowe medium wzrostowe zmieniano na ASCS-CM. Komórki nowotworowe inkubowano przez 48h w warunkach wzrostowych. Po tym czasie zmieniano medium na świeże zawierające ciprofloksacynę w stężeniach odpowiadających IC10, IC50 oraz IC90. Po kolejnych 24h hodowli, wykonywano test MTT i/lub test BrdU. Jako kontrolę stosowano komórki hodowane w standardowym medium wzrostowym w proporcji 1:1 z medium linii ASCStelo.

### **3.11 Analiza statystyczna**

Do analizy uzyskanych wyników wykorzystywano parametryczne i nieparametryczne testy istotności statystycznej. We wszystkich testach jako poziom ufności zastosowano 95%. Wyniki przedstawiono jako średnie z odchyleniem statystycznym (SD, ang. Standard Deviation).

1. Test Shapiro-Wilka – test normalności wykonywano celem weryfikacji hipotezy, że rozkład danych nie odbiega od rozkładu normalnego (rozkład Gaussa). Pozytywny wynik oznacza, że nie stwierdzono istotnego (95%) odchylenia od rozkładu normalnego. Negatywny wynik oznacza, że dane nie pasują do rozkładu normalnego. Po potwierdzeniu rozkładu normalnego, wykonywano test parametryczny, w innym przypadku stosowano test nieparametryczny.
2. T-test – test stosowano do porównania zmiennych dwóch grup w rozkładzie normalnym.

3. ANOVA – analizę wykonywano, aby porównać zmienne w więcej niż dwóch grupach w przypadku rozkładu normalnego.
4. Test ANOVA Kruskala-Wallisa - wykorzystywano jako test nieparametryczny, aby porównać zmienne w więcej niż dwóch grupach.
5. U Manna-Whitneya - wykorzystywano jako test nieparametryczny, aby porównać zmienne w dwóch grupach.

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzano przy użyciu programu GraphPad Prism 9.5.0 (wersja testowa).

## **4 Wyniki**

### **4.1 Wpływ mediatorów syntetyzowanych przez fibroblasty związane z rakiem na komórki raka pęcherza moczowego**

#### **4.1.1 Zmiany aktywności sekrecyjnej komórek nowotworowych**

Zmiany w stężeniach wybranych białek określano na podstawie testu ELISA. Profilowanie cytokin wydzielanych przez komórki nowotworowe po inkubacji z CAF-CM jest niezbędne do określenia co wpływa na aktywność biologiczną tych komórek. Inkubacja z mediatorami zawartymi w CAF-CM zmienia profil białek syntetyzowanych przez komórki raka pęcherza moczowego (Tabela 3). Częsteczki bioaktywne wydzielane przez CAF znacznie zwiększyły stężenie IL-13. Po 48h oraz 72h hodowli odnotowano odpowiednio 1,6-krotny i 2,4-krotny wzrost stężenia tego białka. Zaobserwowano również zmiany w ilości wydzielanej IL-6, odnotowano 1,2-krotny i 1,5-krotny wzrost stężenia po 48h i 72h hodowli w obecności CAF-CM, w porównaniu do komórek kontrolnych. Wspólna hodowla HB-CLS-1 z CAF-CM zmniejszyła poziom IL-1A, stanowił on 56% kontroli po 48h oraz 89% kontroli po 72h. Dodatkowo, po krótszym okresie hodowli w porównaniu do kontroli, zaobserwowano 1,5-krotny wzrost stężenia Interferonu alfa (IFN- $\alpha$ , ang. Interferon alfa). Jednakże, po dłuższym okresie hodowli poziom tego białka był niewykrywalny. Nie zaobserwowano znaczących zmian w stężeniach pozostałych badanych cytokin/chemokin. Poziom IL-10, Interferonu gamma (IFN- $\gamma$ , ang. Interferon gamma) i białka zapalnego makrofagów 1a (MIP-1a, ang. Macrophage Inflammatory Protein 1a) był niewykrywalny.

**Tabela 3.** Zmiany aktywności sekrecyjnej HB-CLS-1 po hodowli z CAF-CM przez 48h i 72h.

	CAF-CM 48h		CAF-CM 72h	
	pg/ml	Zmiana stężenia	pg/ml	Zmiana stężenia
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	2,5E-1	<b>0,6 ↓</b>	4,0E-1	<b>0,9 ↓</b>
IL-1 $\beta$	4,2	0,8 ↓	4,9	1,0
<b>IL-4</b>	1,1E-3	<b>0,8 ↓</b>	n.d	<b>n.d</b>
<b>IL-6</b>	5,3	<b>1,2 ↑</b>	7,5	<b>1,5 ↑</b>
IL-8	16,8	1,0	17,3	1,0
IL-10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IFN- $\gamma$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>IFN-<math>\alpha</math></b>	5,3E-2	<b>1,5 ↑</b>	n.d.	n.d.
GM-CSF	17,3	0,9 ↓	21,0	1,1 ↑
MIP-1a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TGF- $\beta$ 1	8,8	0,7 ↓	7,5	0,9 ↓
<b>IL-13</b>	1,8E-1	<b>1,6 ↑</b>	5,2E-1	<b>2,4 ↑</b>

n.d. – niewykrywalny (ang. not detectable)

Inkubacja z mediatorami zawartymi w CAF-CM, zmienia również profil białek syntetyzowanych przez komórki raka prostaty (Tabela 4). W porównaniu do kontroli, odnotowano znaczny wzrost IL-1 $\alpha$ , 33-krotny po 48h hodowli i 47-krotny po 72h. Zaobserwowano również wzrost stężenia IL-6, po 48h wyniósł 2,0-krotność kontroli, po 72h inkubacji wyniósł 3,6-krotność kontroli. Dodatkowo, wykazano 1,6- i 5,3-krotny wzrost stężenia IL-10, odpowiednio po 48h i 72h hodowli w CAF-CM. Nie odnotowano znacznych różnic w poziomach pozostałych analizowanych cząsteczek. Stężenia IFN-  $\gamma$ , MIP-1a oraz IL-13 były niewykrywalne.

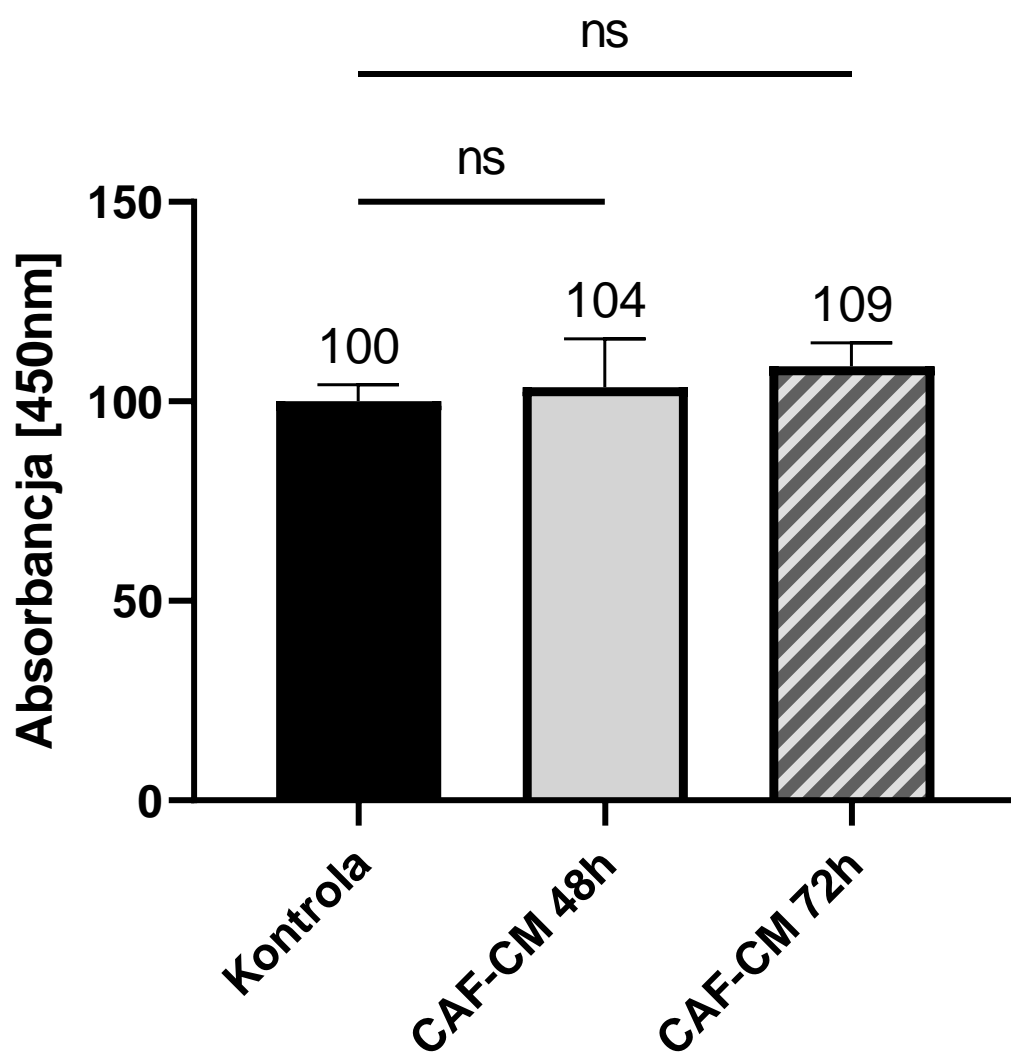
**Tabela 4.** Zmiany aktywności sekrecyjnej DU145 po hodowli z CAF-CM przez 48h i 72h.

	CAF-CM 48h		CAF-CM 72h	
	pg/ml	Zmiana	pg/ml	Zmiana
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	2,0E-2	<b>33 <math>\uparrow</math></b>	2,8E-2	<b>47 <math>\uparrow</math></b>
IL-1 $\beta$	1,1E-3	1,2 $\uparrow$	9,0E-4	n.d.
<b>IL-4</b>	3,0E-3	<b>0,8 <math>\downarrow</math></b>	4,0E-3	<b>0,3 <math>\downarrow</math></b>
<b>IL-6</b>	3,5E-1	<b>2,0 <math>\uparrow</math></b>	6,2E-1	<b>3,6 <math>\uparrow</math></b>
IL-8	17,1	1,0	15,0	0,9 $\downarrow$
<b>IL-10</b>	1,9E-2	<b>1,6 <math>\uparrow</math></b>	6,4E-2	<b>5,3 <math>\uparrow</math></b>
IFN- $\gamma$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IFN- $\alpha$	2,3E-2	0,3 $\downarrow$	2,3E-2	1,5 $\uparrow$
GM-CSF	6,7E-1	1,2 $\uparrow$	5,4E-1	0,9 $\downarrow$
MIP-1a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TGF- $\beta$ 1	13,5	0,8 $\downarrow$	15,7	1,0
IL-13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. niewykrywalny (ang. not detectable)

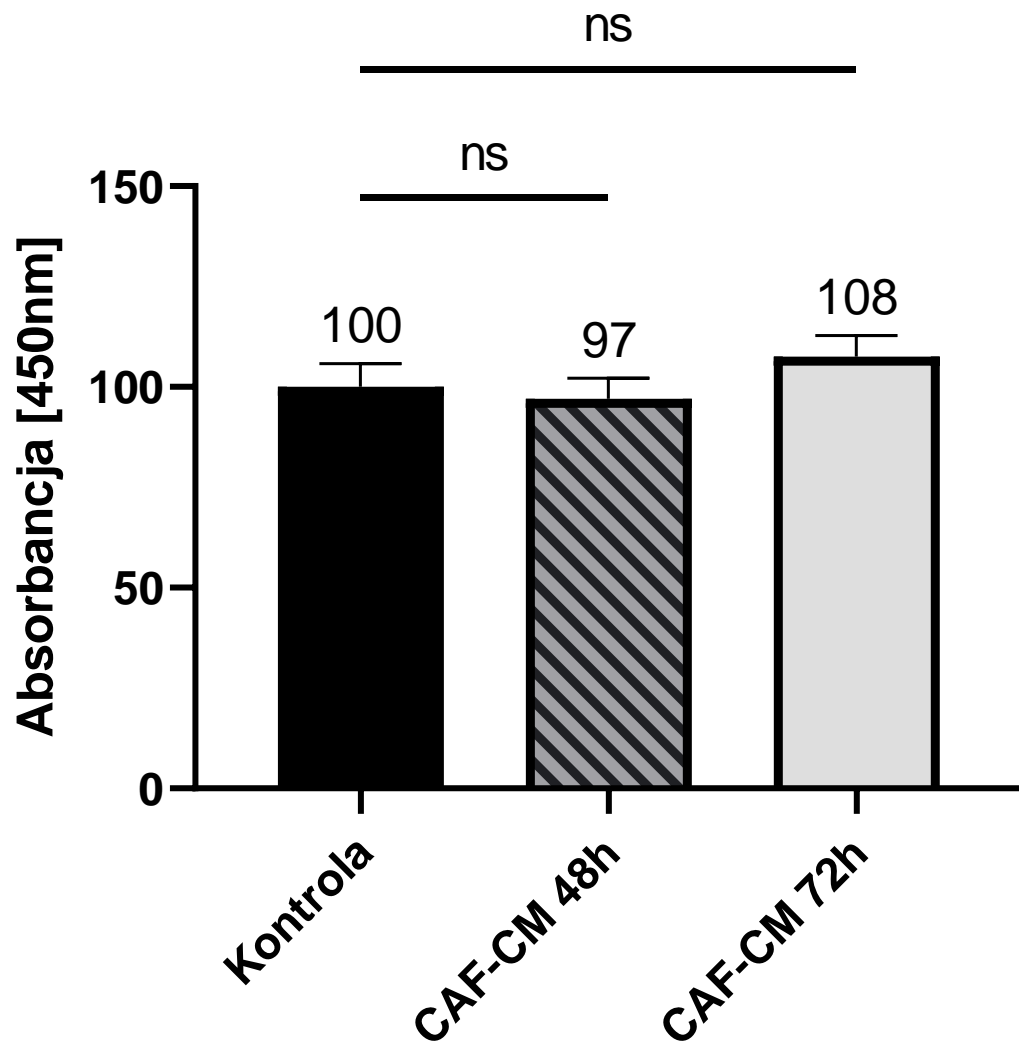
#### 4.1.2 Profilowanie zmian w poziomie IL-33

Poznanie wpływu czynników syntetyzowanych przez fibroblasty związane z rakiem na wydzielanie IL-33 przez komórki raka prostaty i raka pęcherza moczowego wydaje się istotne w ocenie jej roli w TME i wpływu na leczenie. Wyniki przedstawiono jako procent kontroli. Komórki raka pęcherza moczowego w 48-godzinnej hodowli z mediatorami wydzielanymi przez CAF wykazały wyższą ekspresję IL-33 o 4%. Natomiast, w hodowli 72-godzinnej o 9% (Rycina 1). Analiza statystyczna nie wykazała istotności ( $p > 0,05$ ) wykazanych różnic.



**Rycina 1.** Ekspresja IL-33 przez HB-CLS-1 po 48h i 72h hodowli w obecności CAF-CM. Wyniki nieistotne statystycznie oznaczono jako ns.

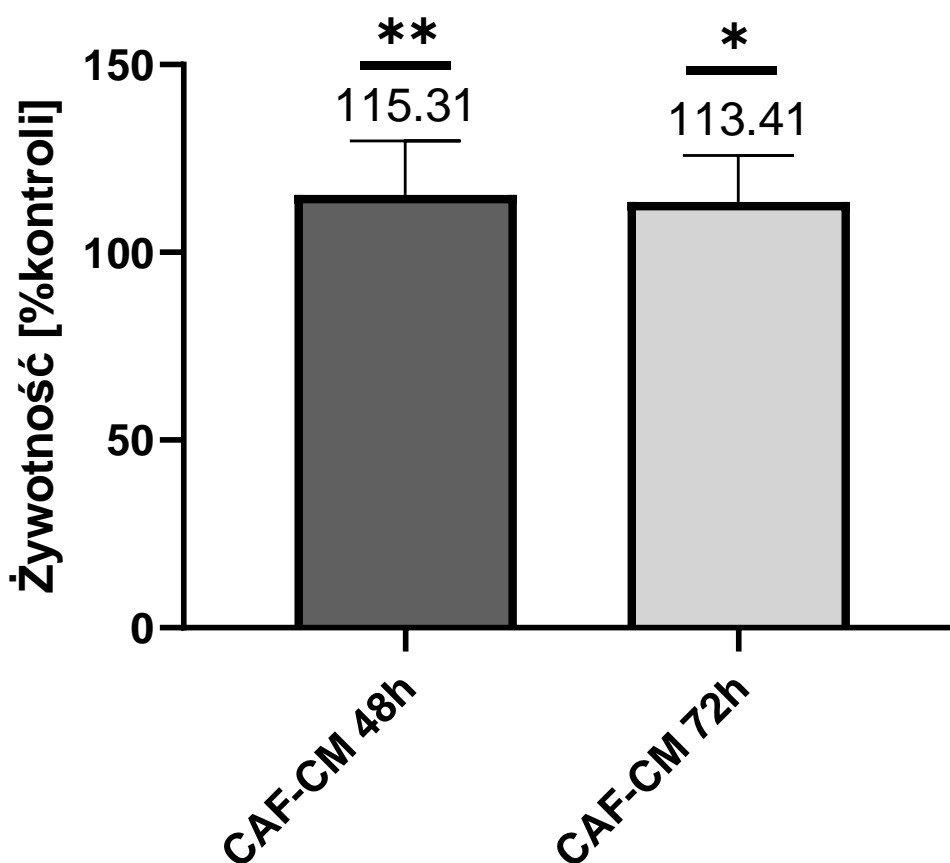
Test wskazał na obniżenie ekspresji IL-33 po 48h inkubacji z CAF-CM o 3% oraz wzrost po 72h inkubacji o 8% (Rycina 2). W analizie statystycznej nie wykazano istotności zaobserwowanych różnic ( $p>0,05$ ).



**Rycina 2.** Ekspresja IL-33 przez DU145 po 48h i 72h hodowli w obecności CAF-CM. Wyniki nieistotne statystycznie oznaczono jako ns.

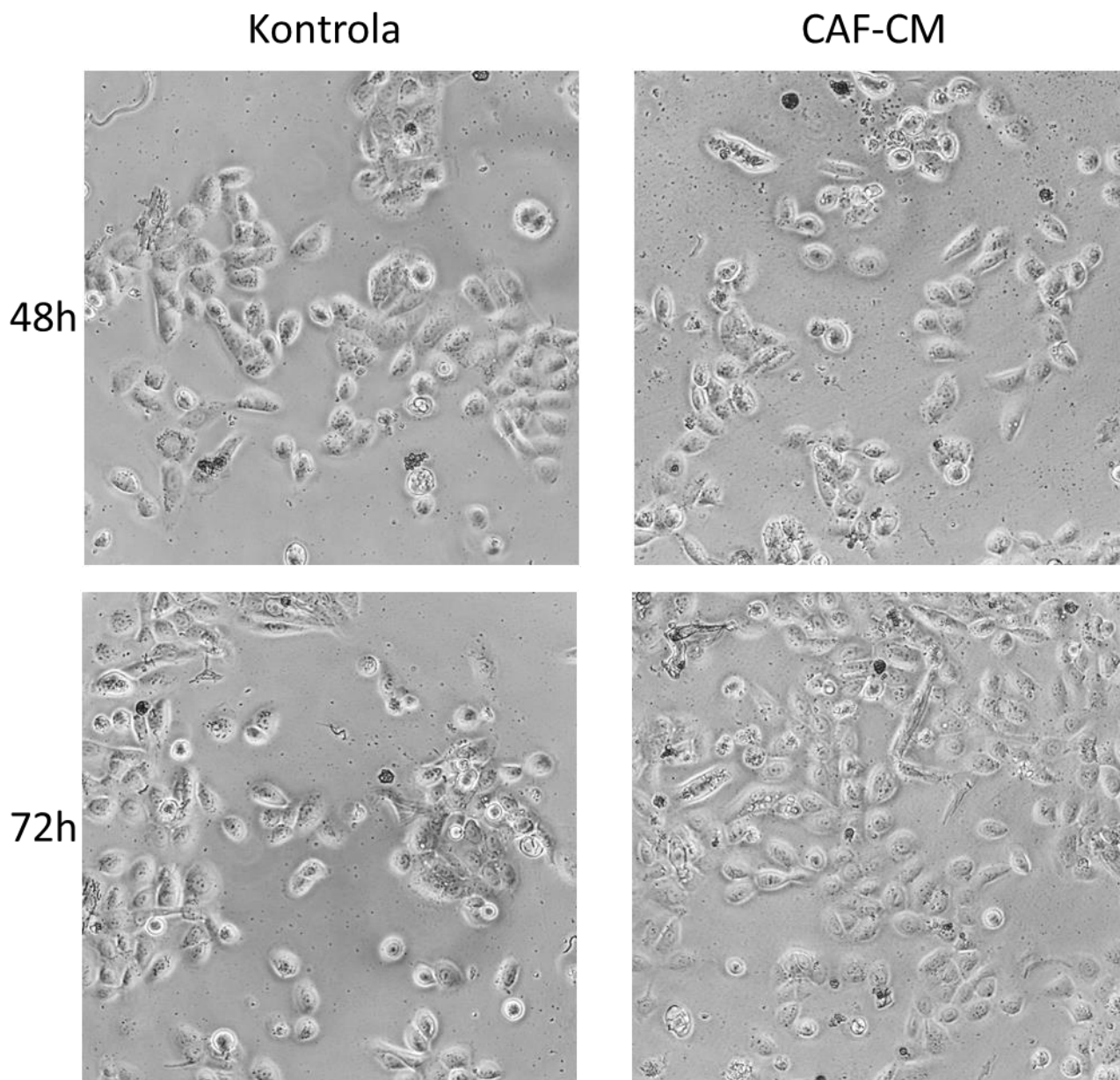
#### 4.1.3 Analiza żywotności komórek nowotworowych

Żywotność definiowano jako aktywność metaboliczną komórek. Im wyższa aktywność dehydrogenazy mitochondrialnej, tym wyższy wynik kolorymetryczny. Wyniki przedstawiono jako wynik procentowy w odniesieniu do kontroli, która stanowi 100%. Częsteczki wydzielane przez fibroblasty związane z rakiem spowodowały wzrost żywotności HB-CLS-1 po 48h oraz 72h, odpowiednio o 15% i 13% (Rycina 3), w porównaniu do kontroli. Analiza statystyczna wykazała istotność otrzymanych wyników ( $p < 0,05$ ). Zmiany w zagęszczeniu badanych komórek można zaobserwować również na Rycinie 4 przedstawiającej morfologię komórek HB-CLS-1 hodowanych w obecności CAF-CM. Nie zauważono widocznych zmian w morfologii po 48h hodowli z CAF-CM. Po 72h hodowli z mediatorami syntetyzowanymi przez CAF w monowarstwie widoczne są komórki o nietypowym, wydłużonym kształcie.



**Rycina 3.** Żywotność HB-CLS-1 hodowanych przez 48h i 72h w obecności CAF-CM. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ).

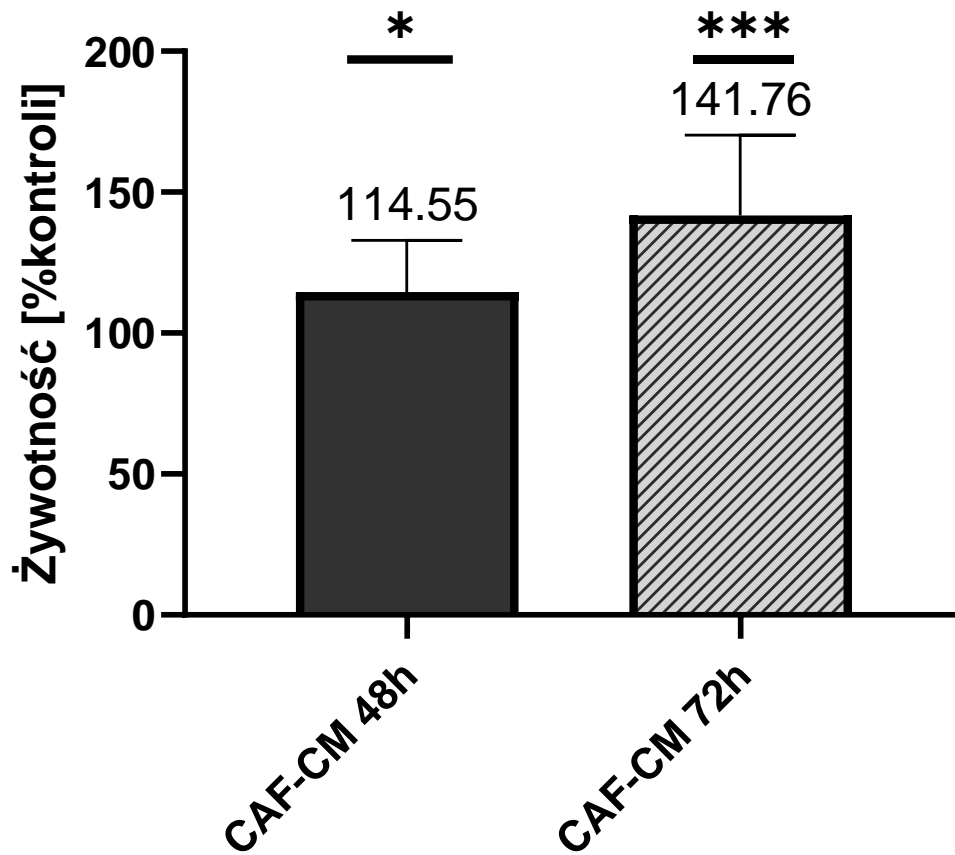




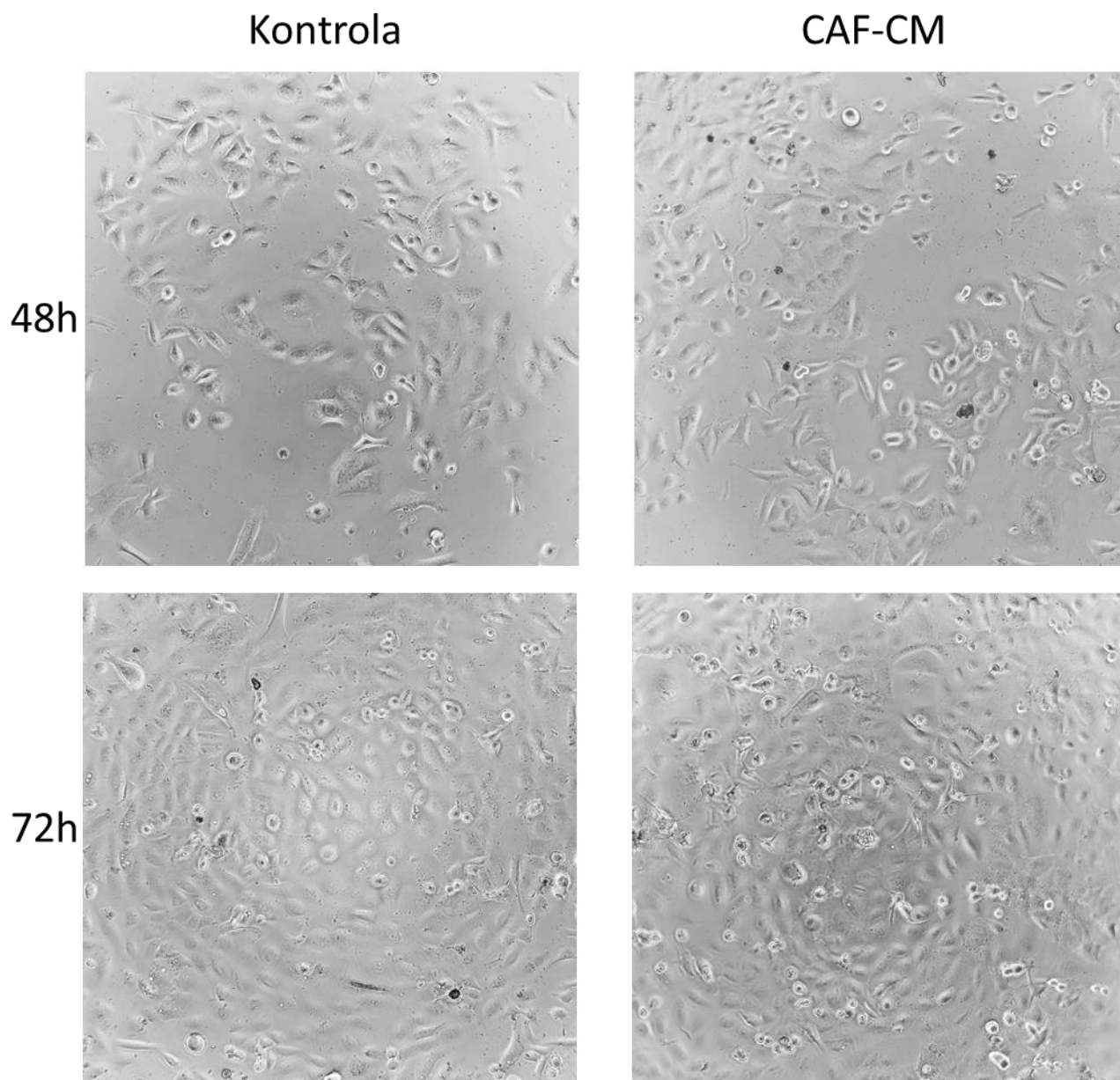
**Rycina 4.** Obserwacje mikroskopowe morfologii komórek linii HB-CLS-1 w obecności CAF-CM. Mikroskop o odwróconej optyce, powiększenie 20x.

Komórki DU145 hodowane z mediatorami syntetyzowanymi przez fibroblasty związane z rakiem wykazały wyższą aktywność metaboliczną (Rycina 5). Po 48h i 72h hodowli zaobserwowano wzrost żywotności odpowiednio o 15% i 42%. W przypadku obu wyników potwierdzono istotność statystyczną ( $p < 0,05$ ). Rycina 6 przedstawia morfologię komórek DU145 hodowanych w obecności CAF-CM. Podobnie, jak w przypadku komórek raka pęcherza moczowego, zaobserwowano zmiany w kształcie komórek nowotworowych po inkubacji

z CAF-CM. Część widocznych komórek przybrała nieregularny, przypominający wrzecionowaty kształt. Odnotowano także większe zagęszczenie komórek w próbach badanych, w porównaniu do kontroli.



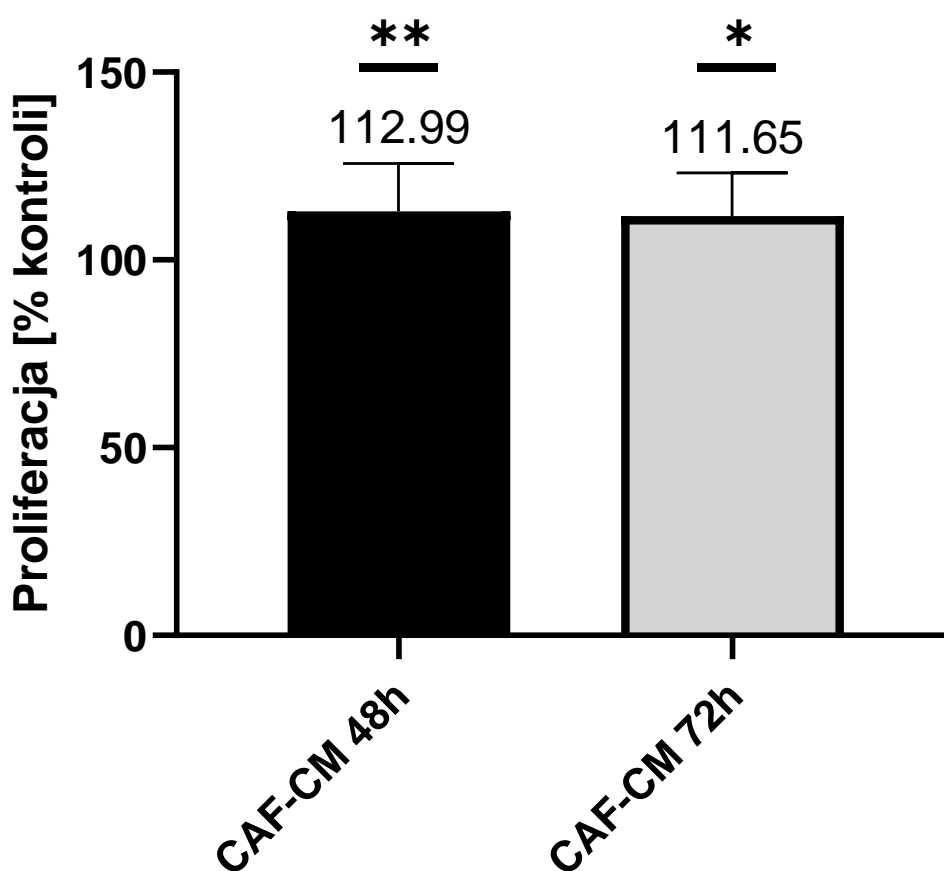
**Rycina 5.** Żywotność DU145 hodowanych przez 48h i 72h w obecności CAF-CM. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ).



**Rycina 6.** Obserwacje mikroskopowe morfologii komórek DU145 w obecności CAF-CM. Mikroskop o odwróconej optyce, powiększenie 20x.

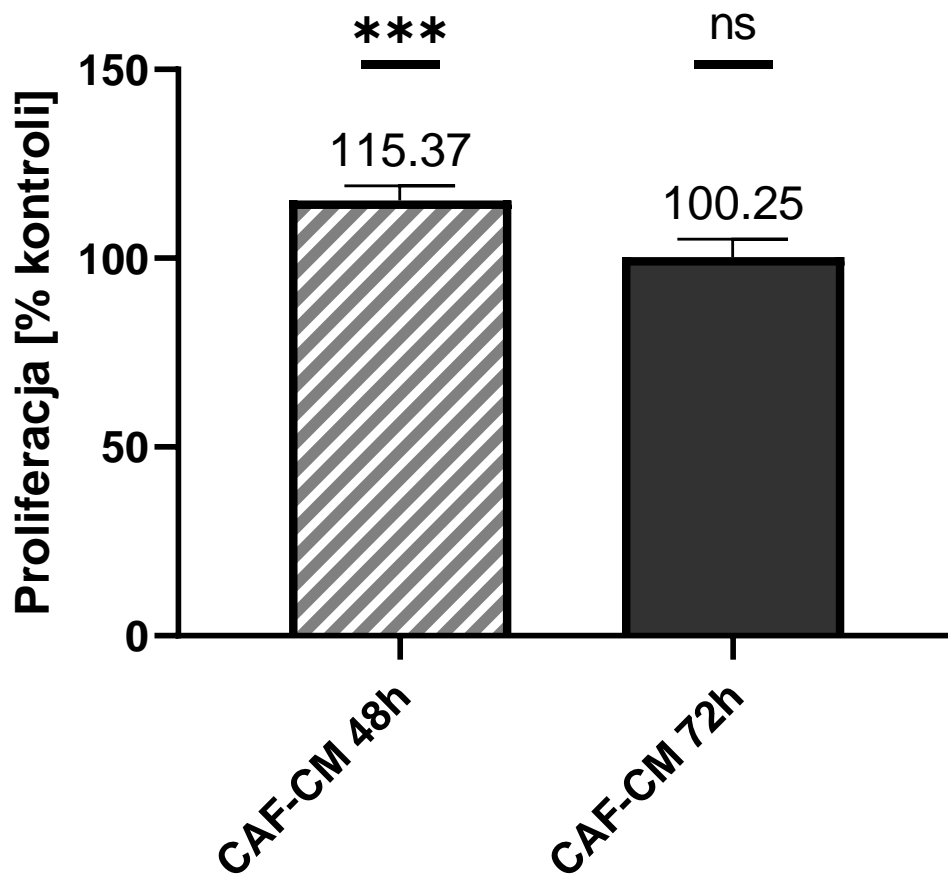
#### 4.1.4 Analiza tempa proliferacji komórek nowotworowych

Proliferację komórek określano na podstawie ilości wbudowanego syntetycznego analogu tymidyny (BrdU) do nici DNA dzielących się komórek. Im wyższy wynik kolorymetryczny, tym wyższa aktywność proliferacyjna komórek. Wyniki przedstawiono w odniesieniu do kontroli, która stanowi 100%. Po 48h inkubacji komórek raka pęcherza moczowego w medium kondycjonowanym z CAF proliferacja tych komórek wzrosła o 13%, w porównaniu do kontroli (Rycina 7). Po kolejnych 24 godzinach, wykazano wzrost o 12%, w porównaniu do kontroli. Analiza statystyczna wykazała istotność obu wyników ( $p < 0,05$ ).



**Rycina 7.** Aktywność proliferacyjna HB-CLS-1 hodowanych przez 48h i 72h w obecności CAF-CM. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ).

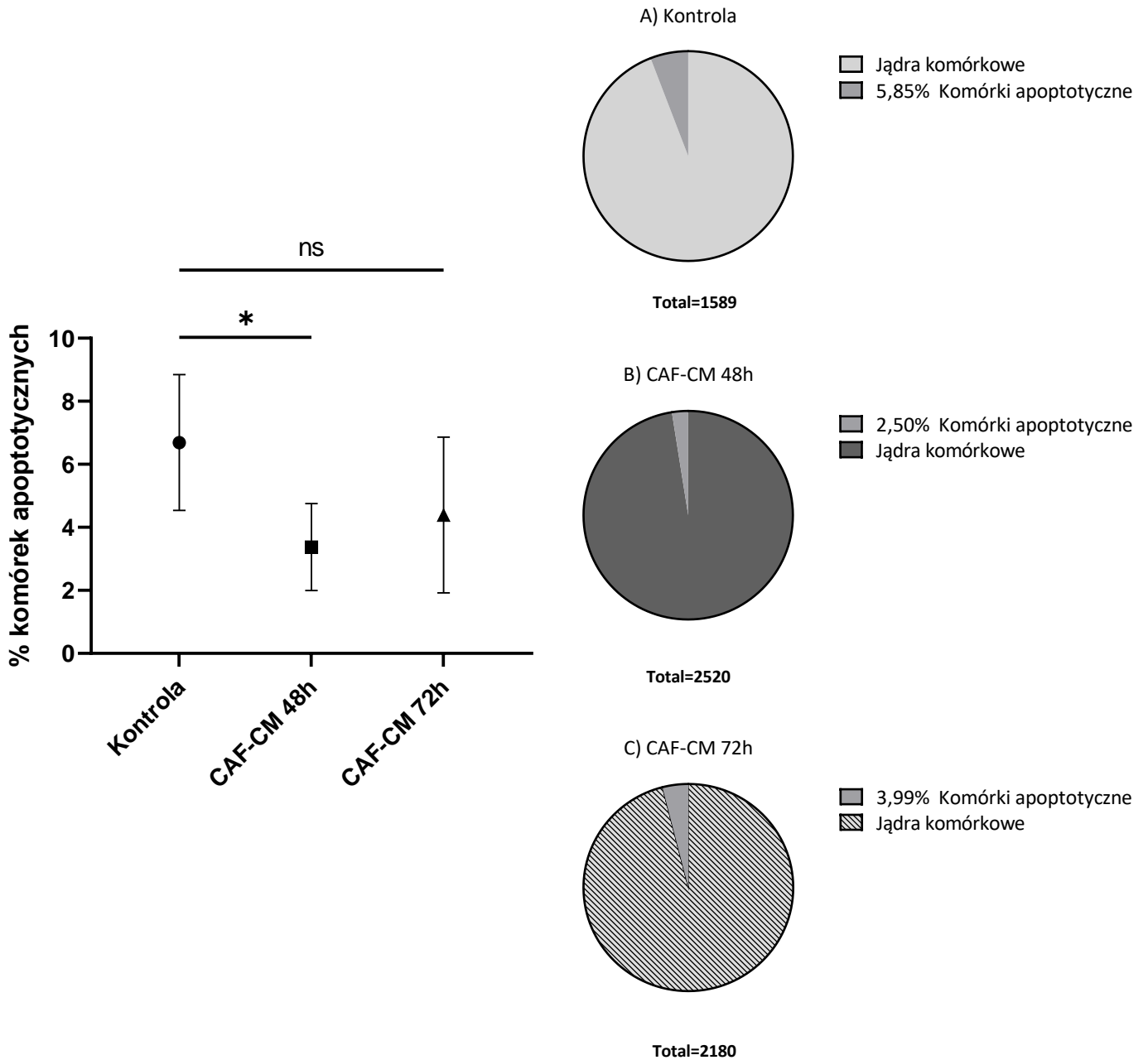
W teście wykazano, że czynniki syntetyzowane przez fibroblasty związane z rakiem wpływają na aktywność proliferacyjną komórek DU145 (Rycina 8). Po 48h inkubacji w obecności CAF-CM, zaobserwowano wyższą proliferację o 15% ( $p < 0,05$ ), w porównaniu do kontroli. Nie wykazano znaczących zmian po 72h hodowli.



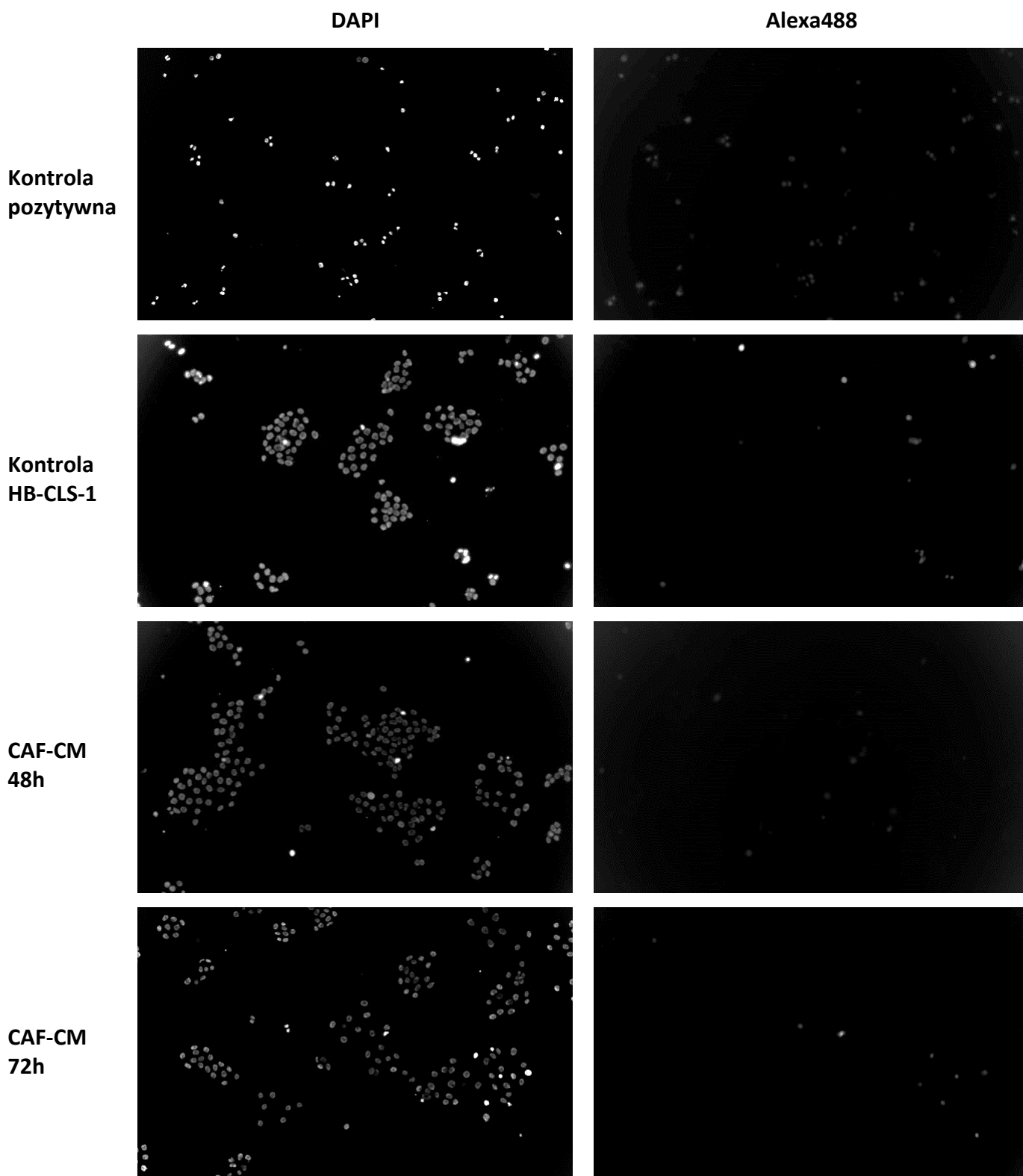
**Rycina 8.** Proliferacja DU145 hodowanych przez 48h i 72h w obecności CAF-CM. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). Wyniki nieistotne statystycznie ( $p > 0,05$ ) oznaczono jako ns.

#### **4.1.5 Ocena apoptozy komórek nowotworowych**

Apoptozę określono poprzez wybarwienie komórek z aktywną kaspazą 3/7. Kaspaza 3/7 aktywowana jest w komórkach apoptotycznych. W celu określenia liczebności komórek, wybarwiono również jądra komórkowe. Częsteczki bioaktywne wydzielane przez CAF zahamowały proces apoptozy komórek nowotworowych. Po 48h inkubacji z CAF-CM wykazano mniejszą liczbę komórek z aktywną kaspazą 3/7 o 3,35% ( $p < 0,05$ ), w porównaniu do kontroli (Rycina 9). Po 72h hodowli z czynnikami wydzielanymi przez fibroblasty związane z rakiem, wykazano niższą liczbę komórek apoptotycznych o 1,86%, jednak analiza statystyczna nie wykazała istotności tego wyniku ( $p > 0,05$ ). Rycina 10 przedstawia komórki z wybarwionymi jądrami komórkowymi (DAPI) oraz komórki z aktywną kaspazą 3/7 (Alexa488). Przedstawiono również kontrole pozytywne, które stanowiły komórki HB-CLS-1 traktowane cisplatyną przez 48 godzin.



**Rycina 9.** Aktywność kaspazy 3/7 w HB-CLS-1 hodowanych w obecności CAF-CM. A) komórki kontrolne, B) komórki inkubowane z CAF-CM przez 48h, C) komórki inkubowane z CAF-CM przez 72h. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). Wyniki statystycznie nieistotne ( $p > 0,05$ ) oznaczono jako ns.

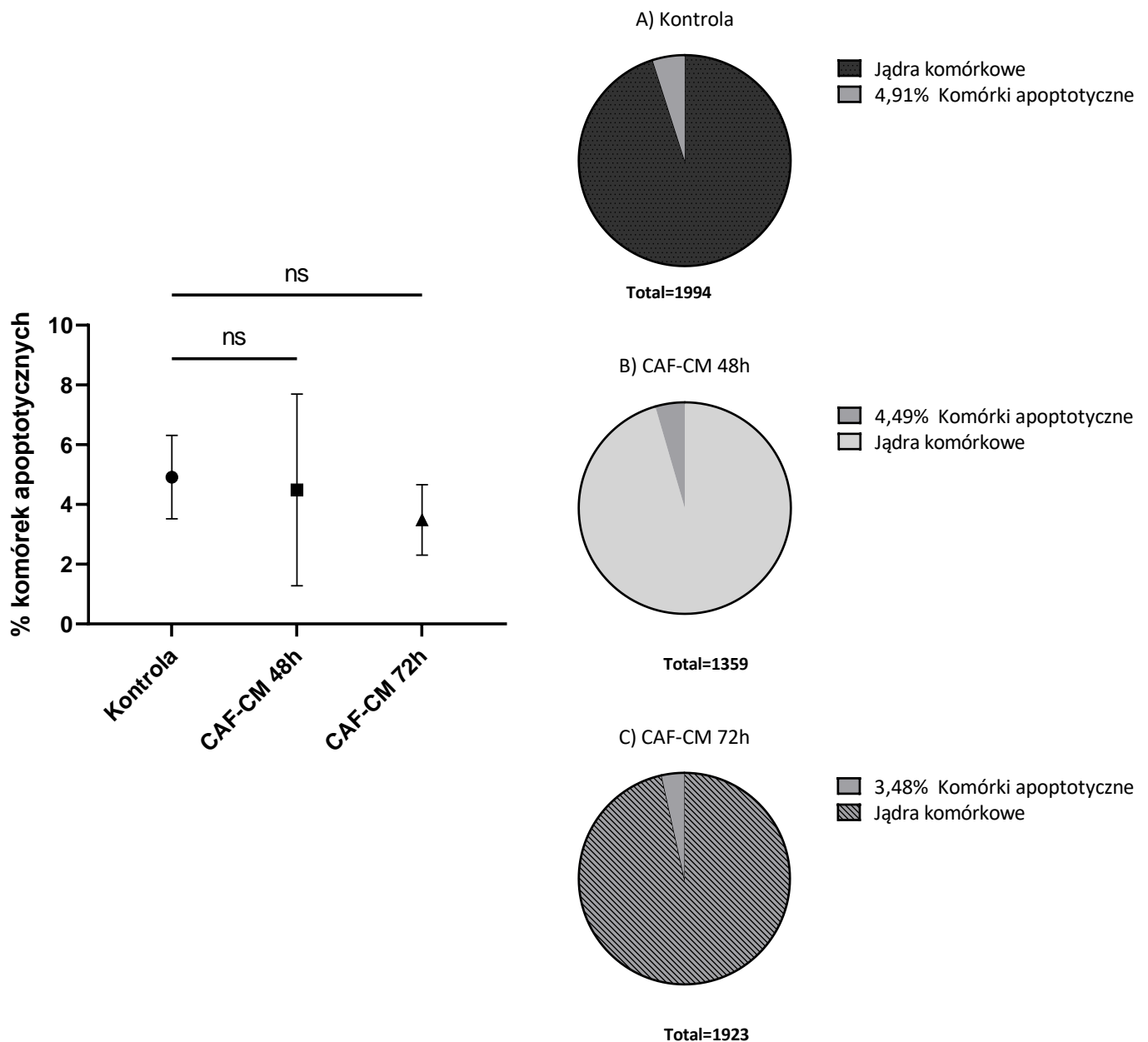


**Rycina 10.** Aktywność kaspazy 3/7 komórkach HB-CLS-1 hodowanych w obecności CAF-CM przez 48h i 72h. Dokumentacja fotograficzna. Powiększenie 20x.

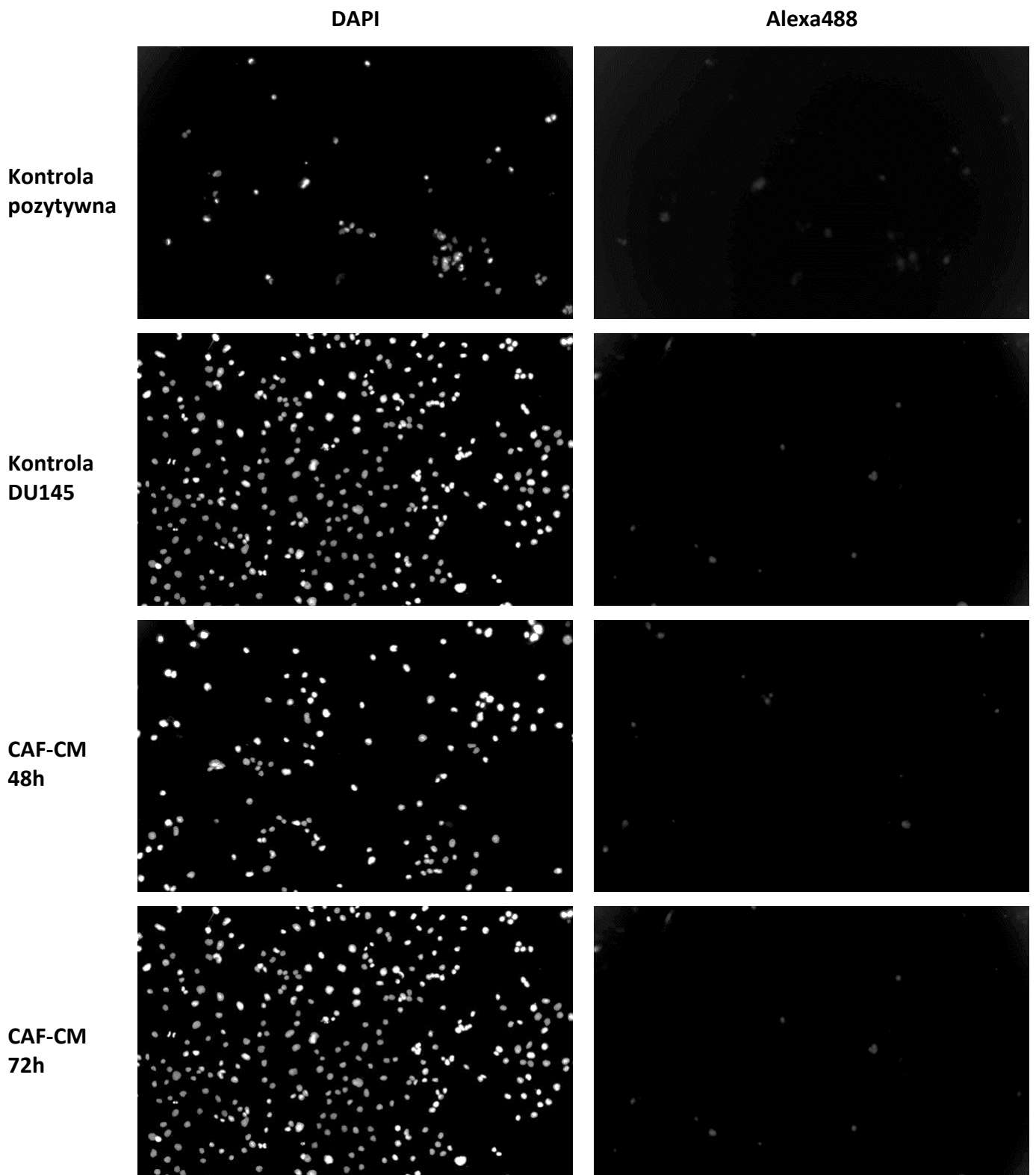
W komórkach kontrolnych DU145 zaobserwowano 4,9% komórek apoptotycznych. Po 48h inkubacji z mediatorami syntetyzowanymi przez CAF, zaobserwowano 4,5% komórek



raka prostaty z aktywną kaspazą 3/7. Z kolei, po 72h inkubacji, liczba komórek apoptotycznych stanowiła 3,5% całkowitej liczby komórek z wybarwionym jądrem komórkowym (Rycina 11). Rycina 12 przedstawia komórki z wybarwionymi jądrami komórkowymi (DAPI) oraz komórki z aktywną kaspazą 3/7 (Alexa488). Przedstawiono również kontrole pozytywne, które stanowiły komórki linii DU145 traktowane cisplatyną przez 48 godzin.



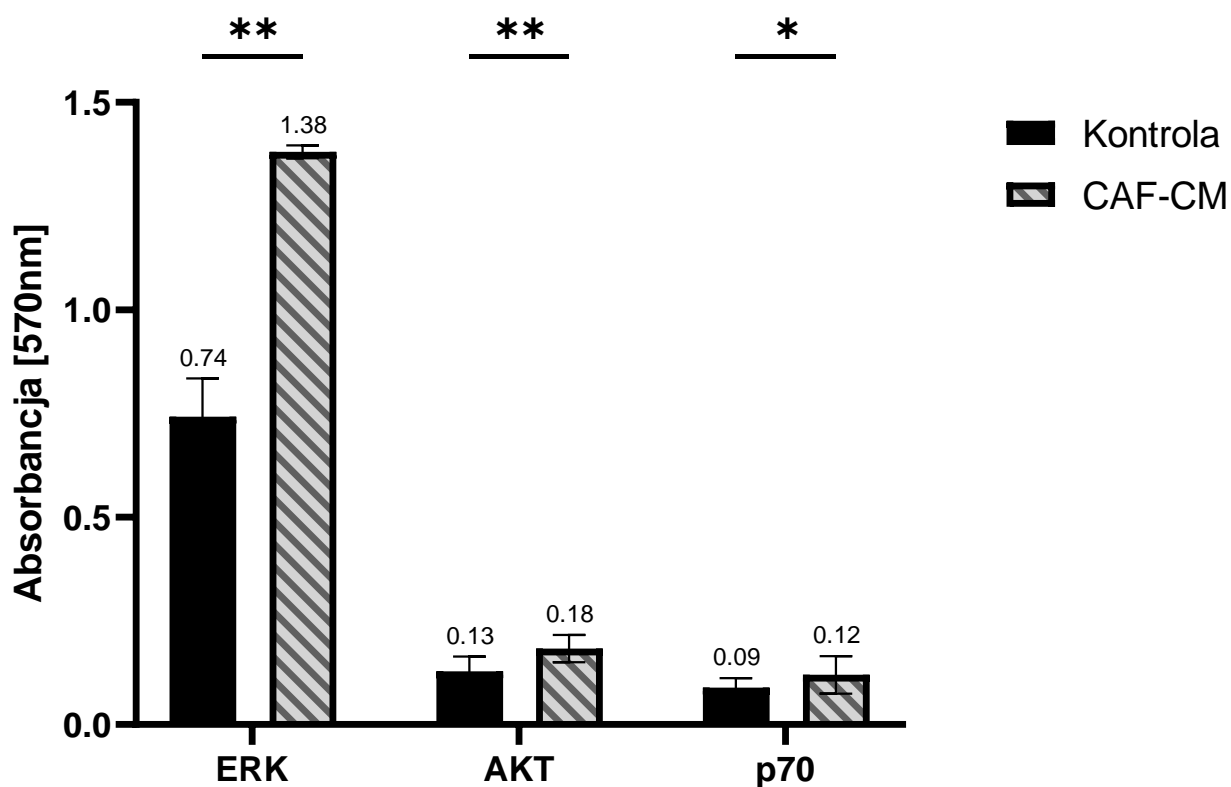
**Rycina 11.** Aktywność kaspazy 3/7 w komórkach DU145 hodowanych w obecności CAF-CM. A) komórki kontrolne, B) komórki inkubowane z CAF-CM przez 48h, C) komórki inkubowane z CAF-CM przez 72h. Wyniki nieistotne statystycznie oznaczono jako ns.



**Rycina 12.** Aktywność kaspazy 3/7 w komórkach DU145 hodowanych w obecności CAF-CM przez 48h i 72h. Dokumentacja fotograficzna. Powiększenie 20x.

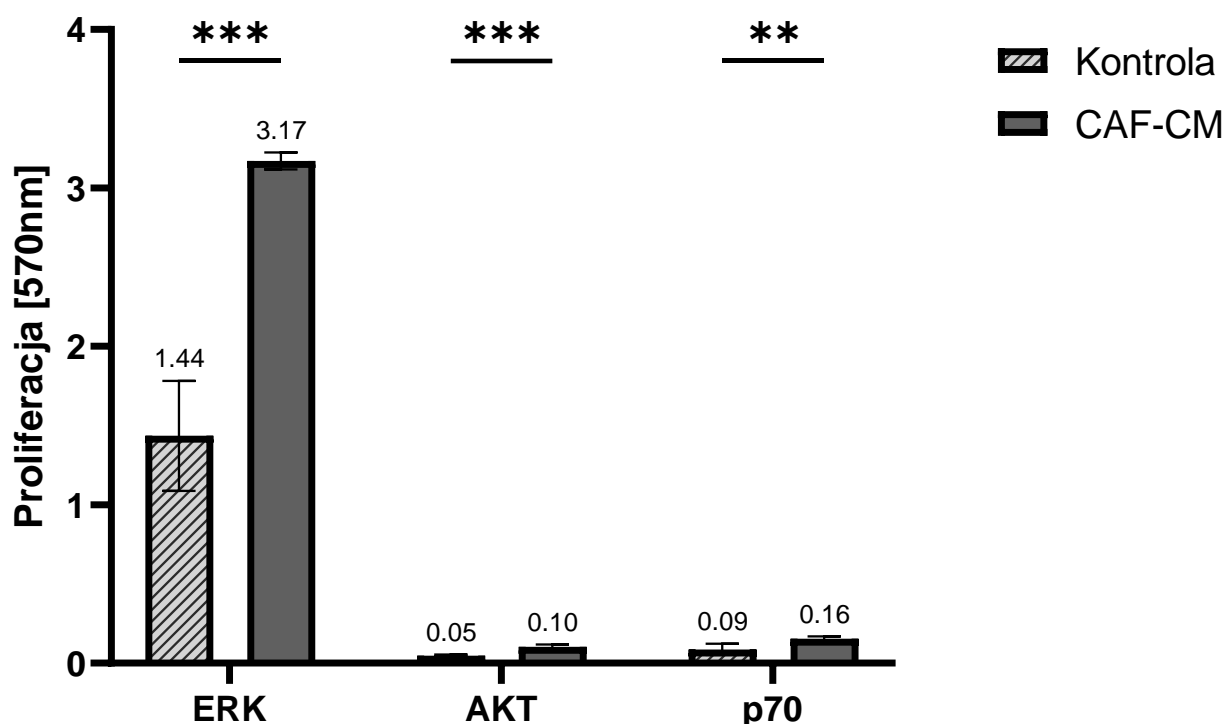
#### 4.1.6 Aktywacja wybranych szlaków sygnalizacyjnych

Celem określenia aktywacji szlaków sygnalizacyjnych wykonywano dostępny komercyjnie test AKT/ERK/p70 S6K Activation Multispecies InstantOne™ ELISA Kit. Hodowla HB-CLS-1 w obecności cząsteczek bioaktywnych wydzielanych przez CAF, zmieniła aktywność badanych szlaków sygnalizacyjnych (Rycina 13). Po 72h inkubacji z CAF-CM zaobserwowano znaczący wzrost ekspresji kinazy ERK 1/2. Odnotowano 1,9-krotny ( $p < 0,05$ ) wzrost w stosunku do kontroli. Dodatkowo, zaobserwowano 1,4-krotny wzrost aktywności kinazy AKT 1/2 ( $p < 0,05$ ) oraz 1,3-krotny wzrost białka rybosomalnego p70 S6K. Należy jednak uwzględnić, że wynik absorbancji przy próbach badanych AKT i p70 S6K jest stosunkowo niski.



**Rycina 13.** Aktywacja ERK/AKT/p70 w komórkach HB-CLS-1 hodowanych w obecności CAF-CM. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ).

Po 72h hodowli DU145 w obecności cząsteczek bioaktywnych wydzielanych przez CAF, zaobserwowano ponad 2-krotny wzrost aktywacji głównej kinazy szlaku MAPK – ERK 1/2 ( $p < 0,05$ ). Ponadto, wykazano również 2-krotny oraz 1,8-krotny wzrost aktywności AKT 1/2 i rybosomalnego białka p70 (Rycina 14). Należy jednak wziąć pod uwagę niski wynik absorbancji przy próbach AKT oraz p70.

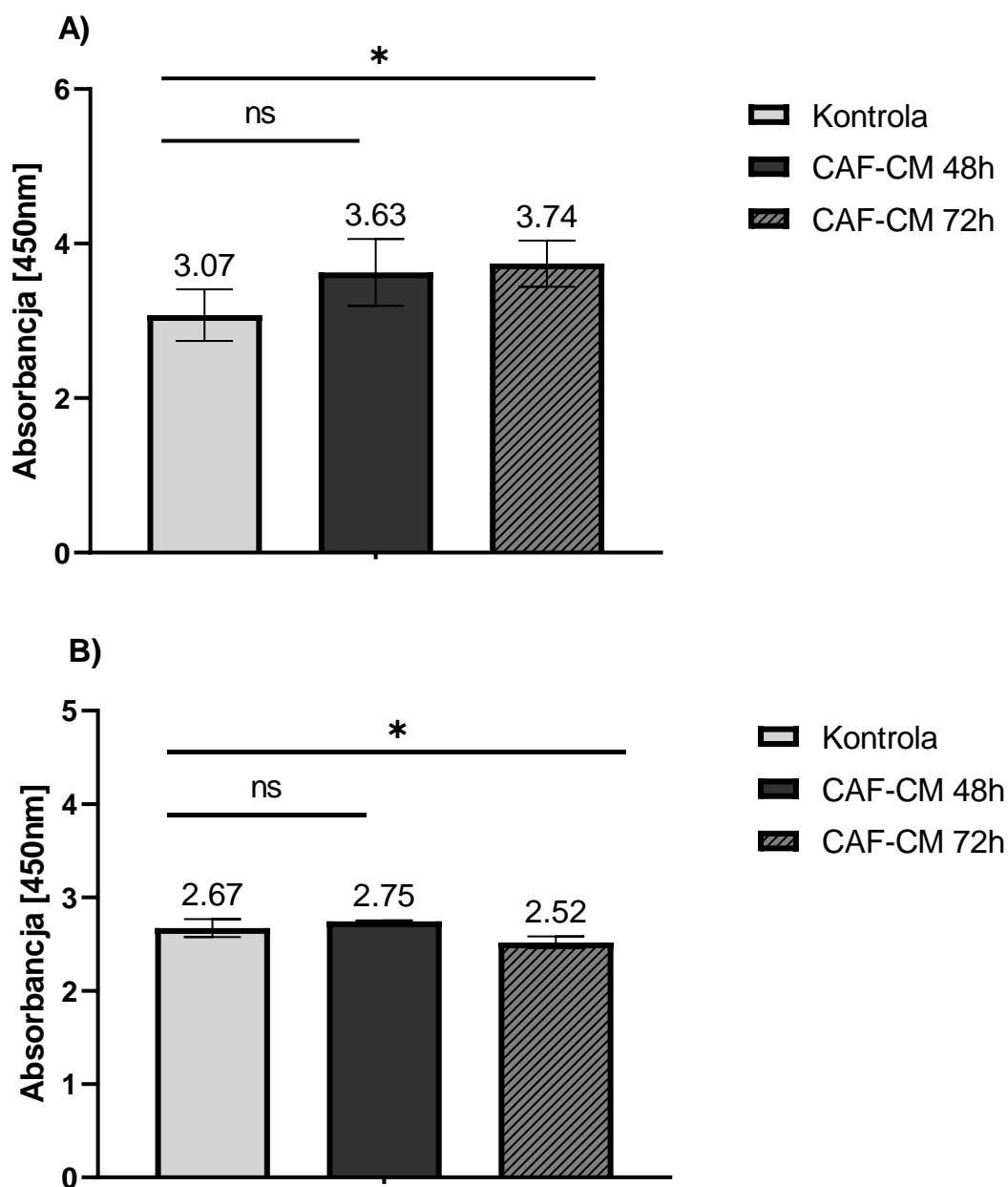


**Rycina 14.** Aktywacja ERK/AKT/p70 w komórkach DU145 hodowanych w obecności CAF-CM. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.7 Analiza zmian ekspresji białka p53

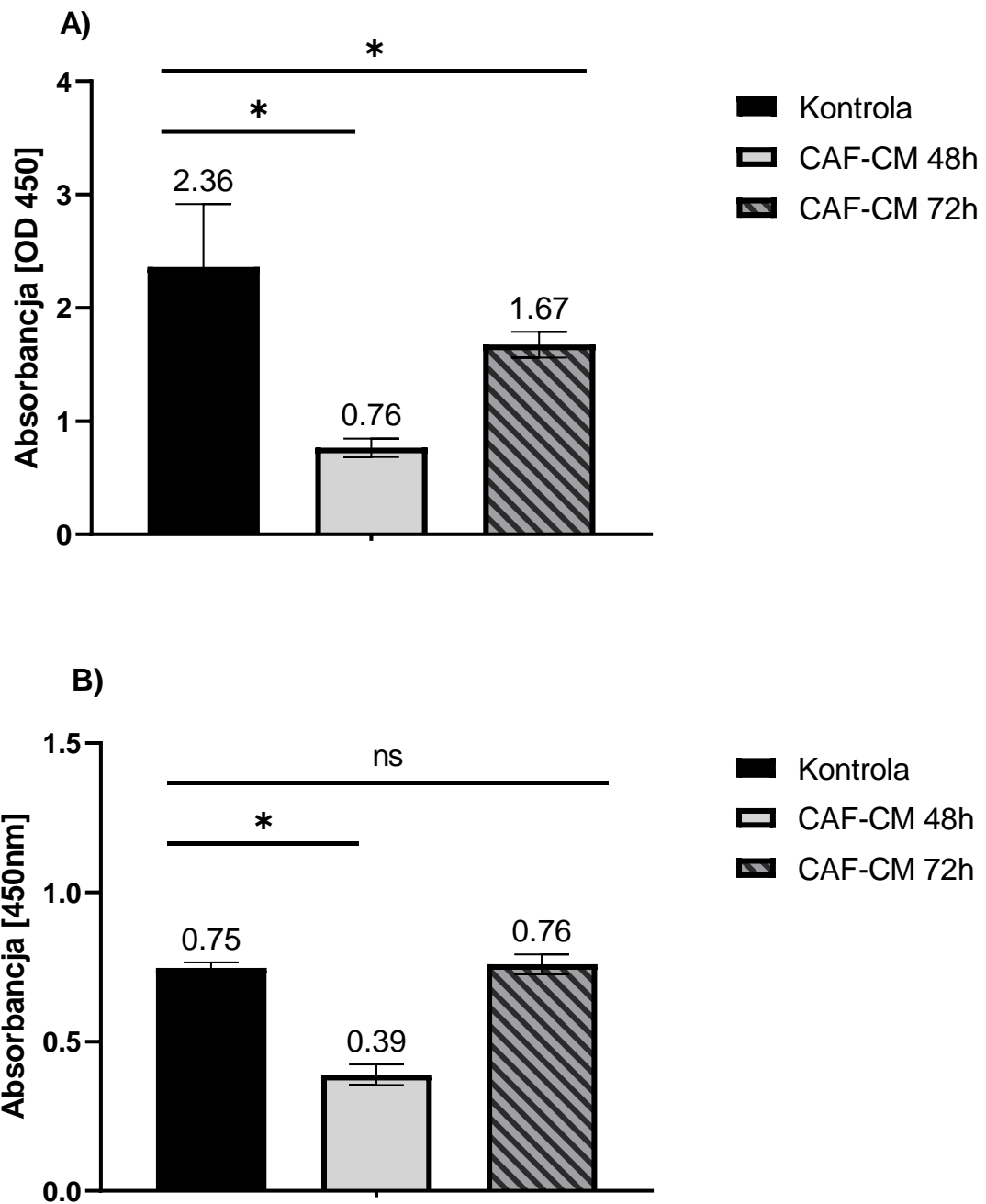
Ekspresję białka p53 analizowano z wykorzystaniem komercyjnie dostępnego testu p53 Human ELISA Kit, umożliwiającego pomiar białka całkowitego oraz jego ufosforylowanej (aktywnej) formy. Analiza wykazała różnice zarówno w ekspresji białka całkowitego, jak i jego aktywnej formy Ser15. Po 48h i 72h hodowli HB-CLS-1 z medium kondycjonowanym z CAF, obserwowano wyższą ekspresję białka całkowitego p53 (Rycina 15A). W przypadku 48h inkubacji, ekspresja białka zwiększyła się 1,18-krotnie ( $p > 0,05$ ), natomiast po 72h hodowli zwiększyła się 1,22-krotnie ( $p < 0,05$ ). Pomiar aktywnej formy białka p53 wykazał natomiast

znaczące statystycznie 1,06-krotne ( $p < 0,05$ ) obniżenie ekspresji. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian Ser15 po 48h inkubacji z CAF-CM (Rycina 15B).



**Rycina 15.** A) ekspresja białka całkowitego p53 oraz B) jego aktywnej formy (Ser15) w HB-CLS-1 hodowanych z CAF-CM przez 48h i 72h. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). Wyniki statystycznie nieistotne ( $p > 0,05$ ) oznaczono jako ns.

Test wykazał różnice w aktywności białka p53 w obu badanych formach w przypadku linii DU145. Wykazano 3,1-krotne ( $p < 0,05$ ) obniżenie ekspresji białka całkowitego po 48h, oraz 1,4-krotne ( $p < 0,05$ ) po 72h hodowli z medium kondycjonowanym z CAF (Rycina 16A). Pomiar aktywnej formy białka p53 również wskazuje na obniżenie jej ekspresji poprzez mediatory syntetyzowane przez CAF (Rycina 16B). Co więcej, odnotowano 1,9-krotne ( $p < 0,05$ ) obniżenie ekspresji Ser15 po 48h hodowli komórek badanych, w porównaniu do kontroli. Nie odnotowano jednak zmian w ekspresji Ser15 po 72h inkubacji.

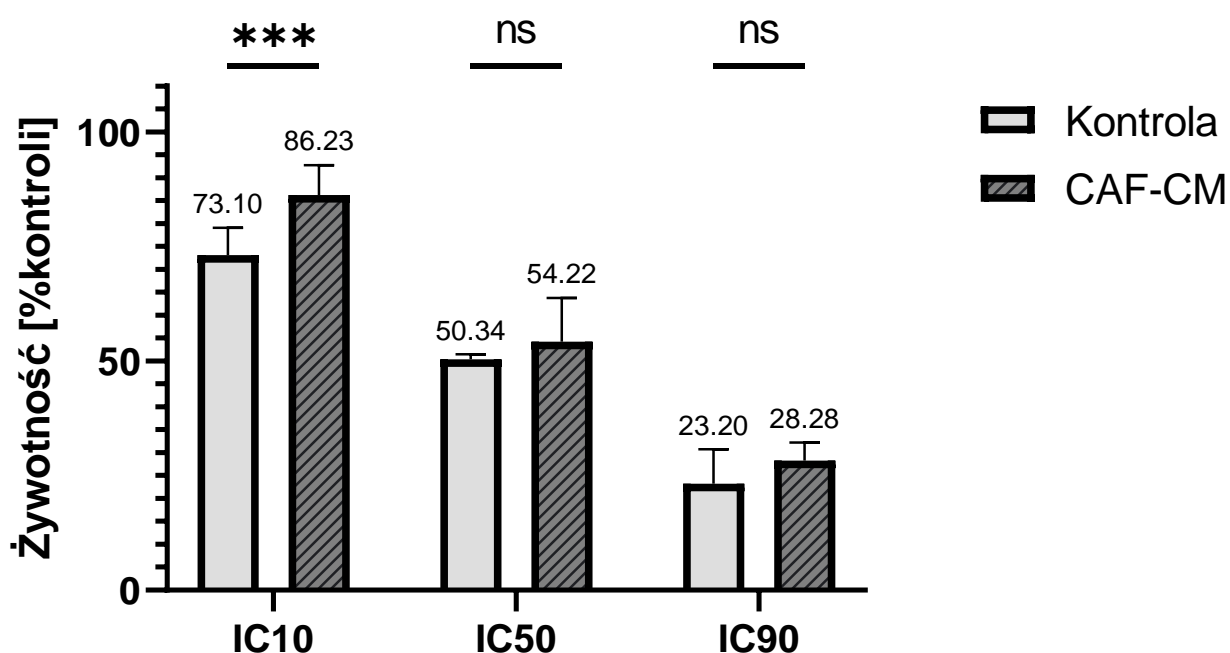


**Rycina 16.** A) poziom białka całkowitego p53 oraz B) jego aktywnej formy (Ser15) w DU145 hodowanych w obecności CAF-CM przez 48h i 72h. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). Wyniki statystycznie nieistotne ( $p > 0,05$ ) oznaczono jako ns.

## 4.2 Ocena wpływu CAF-CM na badane leki w raku pęcherza moczowego i raku prostaty

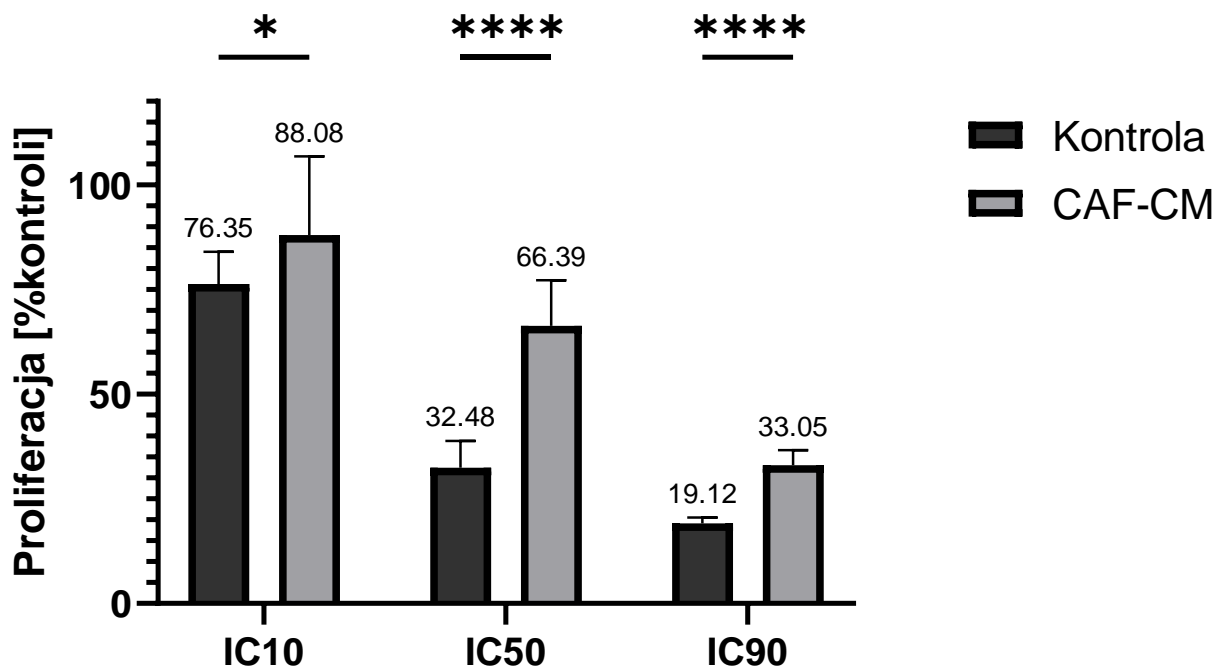
### 4.2.1 Zmniejszenie wrażliwości na zastosowane chemioterapeutyki

Aby sprawdzić jak fibroblasty związane z rakiem wpływają na wrażliwość komórek raka pęcherza moczowego na stosowane leki, przeprowadzono analizę aktywności metabolicznej oraz proliferacyjnej komórek nowotworowych po inkubacji z CAF-CM oraz ciprofloksacyną. Po okresie hodowli w obecności CAF-CM, wykazano znaczące zmiany w żywotności komórek raka pęcherza moczowego po traktowaniu ich ciprofloksacyną (Rycina 17). Zaobserwowano wzrost żywotności komórek raka pęcherza moczowego o 13% ( $p < 0,05$ ) przy stężeniu leku IC10, 4% przy stężeniu IC50 ( $p > 0,05$ ) oraz 5% przy stężeniu IC90 ( $p > 0,05$ ). Co więcej, test aktywności proliferacyjnej również wskazał na spadek wrażliwości HB-CLS-1 na ciprofloksacynę po okresie hodowli z CAF-CM (Rycina 18). Uzyskano wyższą proliferację komórek nowotworowych o 12% dla IC10, 34% dla IC50, oraz 14% dla IC90. Analiza statystyczna wykazała istotność tych wyników ( $p < 0,05$ ).



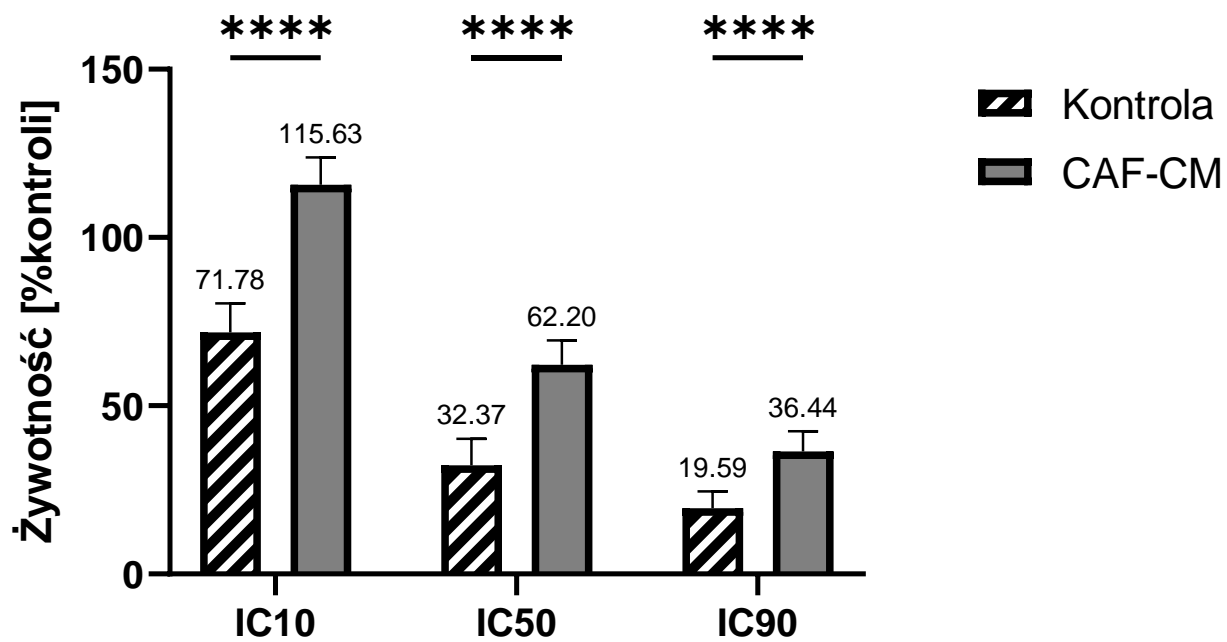
**Rycina 17.** Aktywność metaboliczna HB-CLS-1 hodowanych w obecności CAF-CM oraz ciprofloksacyny w stężeniach IC10, IC50, IC90. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). Wyniki statystycznie nieistotne ( $p > 0,05$ ) oznaczono jako ns.



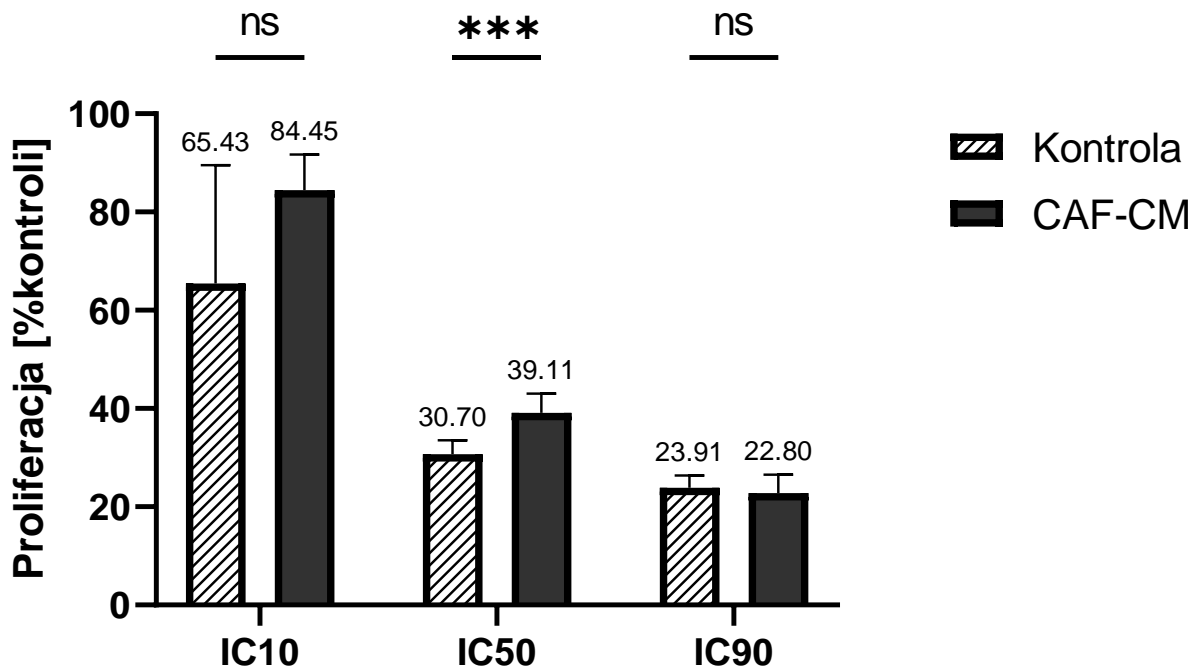


**Rycina 18.** Aktywność proliferacyjna HB-CLS-1 hodowanych w obecności CAF-CM oraz ciprofloksacyny w stężeniach IC10, IC50, IC90. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). Wyniki statystycznie nieistotne ( $p > 0,05$ ) oznaczono jako ns.

W przypadku komórek raka prostaty hodowanych z CAF-CM oraz cisplatyną, w obu wykonanych eksperymentach zaobserwowano istotne zmiany we wrażliwości komórek DU145 na leczenie cisplatyną. Test aktywności metabolicznej wykazał wyższą żywotność komórek hodowanych w obecności CAF-CM i poddanych działaniu leku, w porównaniu z komórkami kontrolnymi (Rycina 19). Odnotowano wzrost żywotności o 44% ( $p < 0,05$ ), 30% ( $p < 0,05$ ) oraz 17% ( $p < 0,05$ ), odpowiednio dla stężeń cisplatyny IC10, IC50 oraz IC90. Dodatkowo, test BrdU wykazał istotny wzrost o 8% ( $p < 0,05$ ) proliferacji DU145 przy stężeniu IC50 (Rycina 20). Nie wykazano istotności statystycznej różnic w proliferacji przy pozostałych stężeniach cisplatyny – wzrost proliferacji o 19% ( $p > 0,05$ ) dla IC10 oraz obniżenie proliferacji o 1% ( $p > 0,05$ ) dla IC90.



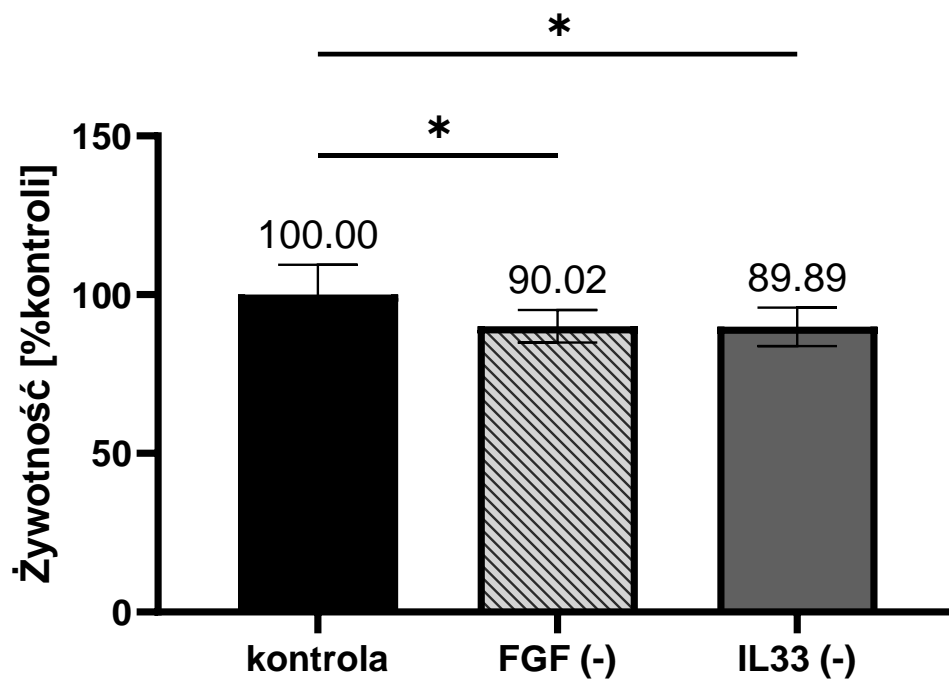
**Rycina 19.** Aktywność metaboliczna DU145 hodowanych w obecności CAF-CM oraz cisplatyny w stężeniach IC10, IC50, IC90. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). Wyniki statystycznie nieistotne ( $p > 0,05$ ) oznaczono jako ns.



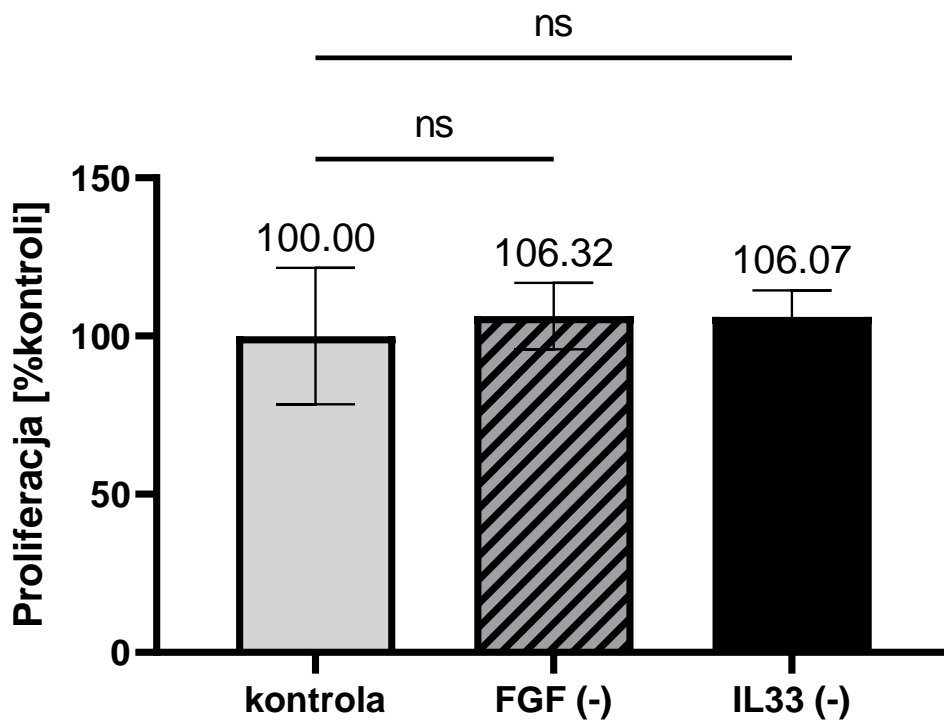
**Rycina 20.** Aktywność proliferacyjna DU145 hodowanych w obecności CAF-CM oraz cisplatyny w stężeniach IC10, IC50, IC90. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). Wyniki statystycznie nieistotne ( $p > 0,05$ ) oznaczono jako ns.

#### 4.2.2 Zwiększenie wrażliwości komórek nowotworowych na badane leki poprzez wykluczenie FGF/IL-33 z mikrośrodowiska nowotworowego

Wcześniejsze wyniki wykazały zmniejszenie wrażliwości komórek raka pęcherza moczowego i raka prostaty na leki po inkubacji z CAF-CM. Przeanalizowano zatem, czy wykluczenie cząsteczek, takich jak IL-33 lub FGF2 zmienia wpływ fibroblastów związanych z rakiem na badane linie komórek nowotworowych. W przypadku HB-CLS-1 test MTT wykazał, że neutralizacja zarówno FGF2, jak i IL-33 z CAF-CM zmniejsza żywotność komórek poddanych działaniu ciprofloksacyny (Rycina 21). Po dodaniu leku do komórek hodowanych z CAF-CM i przeciwciałami neutralizującymi FGF/IL-33 zaobserwowano niższą żywotność o 10% ( $p < 0,05$ ), w porównaniu do komórek z hodowanych z samym CAF-CM. W badaniu BrdU zaobserwowano wzrost proliferacji o 6% ( $p > 0,05$ ) w obu próbach badanych, w porównaniu do kontroli (Rycina 22). Jednakże, analiza statystyczna nie wykazała istotności tych wyników. Nie obserwuje się różnic w morfologii komórek z CAF-CM oraz przeciwciałami neutralizującymi, w porównaniu do komórek z pełnym CAF-CM (Rycina 23).

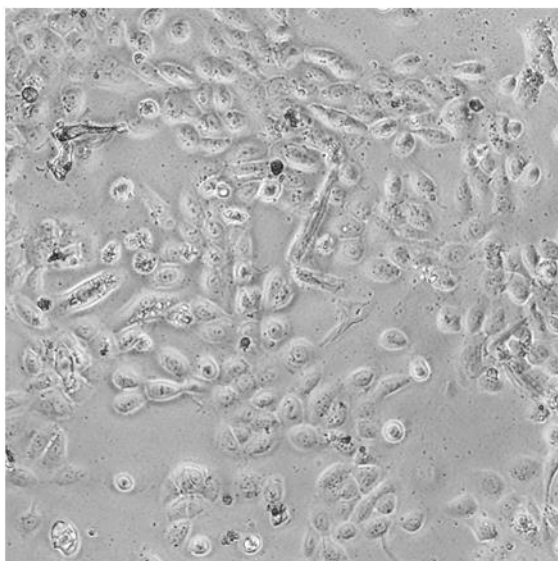


**Rycina 21.** Wpływ wykluczenia FGF/IL-33 z CAF-CM na wrażliwość komórek HB-CLS-1 na ciprofloksacynę – Test MTT. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). Wyniki statystycznie nieistotne ( $p > 0,05$ ) oznaczono jako ns.

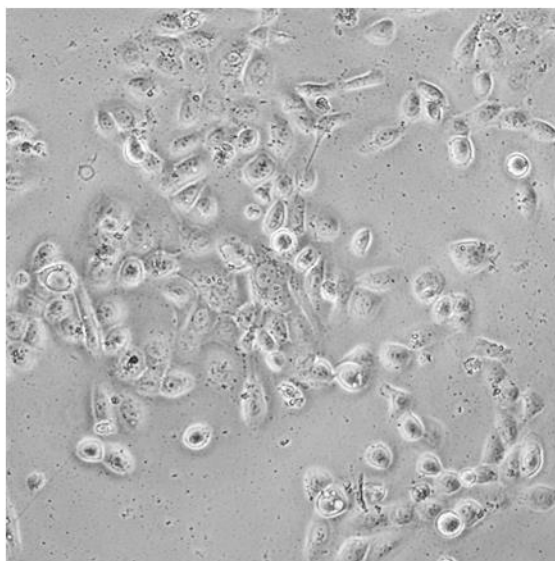


**Rycina 22.** Wpływ wykluczenia FGF/IL-33 z CAF-CM na wrażliwość komórek HB-CLS-1 na ciprofloksacynę – Test BrdU. Wyniki statystycznie nieistotne ( $p > 0,05$ ) oznaczono jako ns.

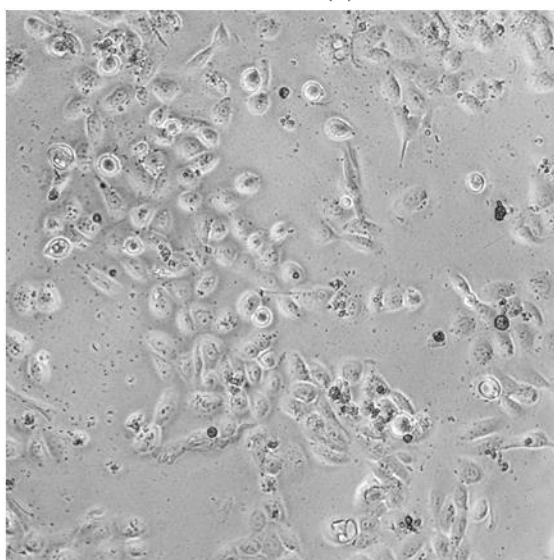
Kontrola



FGF (-)

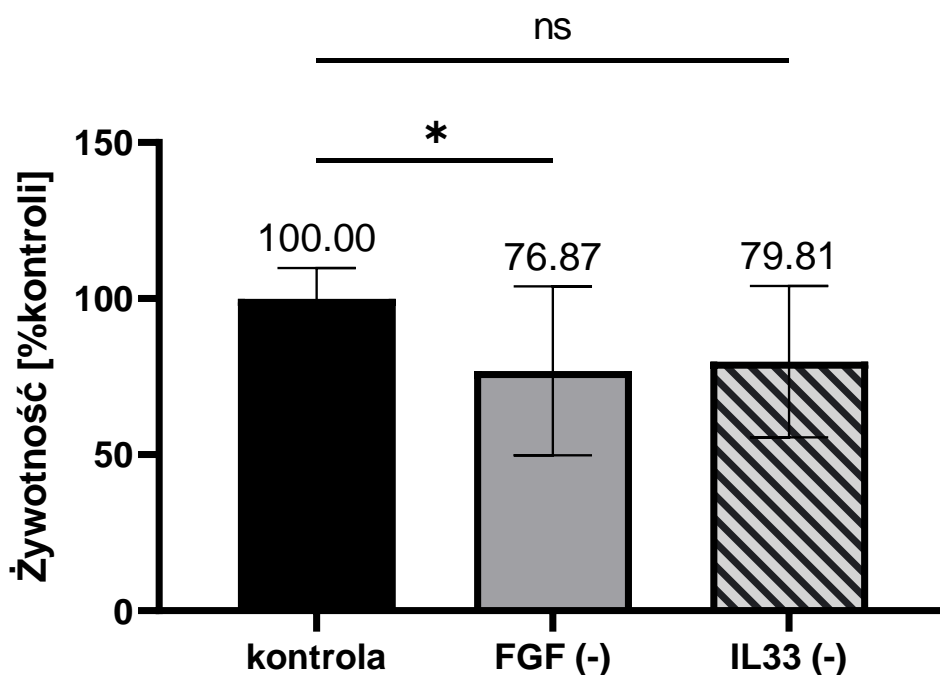


IL-33 (-)

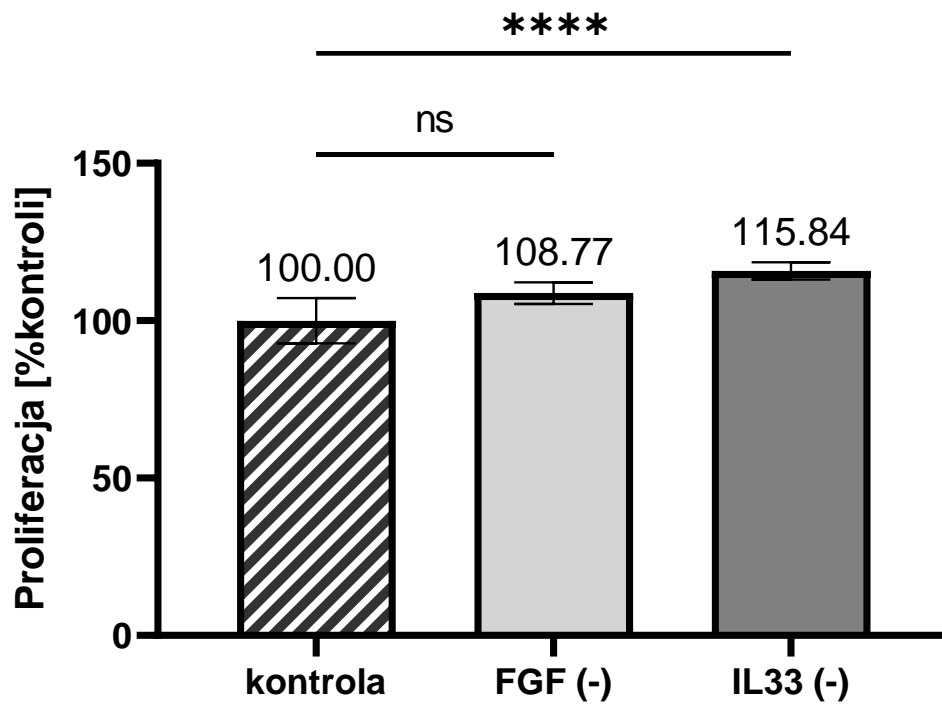


**Rycina 23.** Komórki HB-CLS-1 hodowane w obecności CAF-CM i/lub przeciwciałem neutralizującym FGF/IL-33. Obserwacja mikroskopowa, powiększenie 20x. FGF(-) – przeciwciało neutralizujące FGF. IL-33(-) – przeciwciało neutralizujące IL-33.

Analiza aktywności metabolicznej DU145 natomiast wykazała, że wykluczenie cząsteczki FGF2 z CAF-CM zmniejsza żywotność komórek nowotworowych o 23% ( $p < 0,05$ ) (Rycina 24). Co za tym idzie, zwiększa ich wrażliwość na lek. Z kolei wykluczenie IL-33 z CAF-CM zmniejszyło żywotność DU145 o 20% ( $p > 0,05$ ), w porównaniu do kontroli. Jednak analiza statystyczna nie wykazała istotności tego wyniku. W teście BrdU zaobserwowano, że wykluczenie którejkolwiek z badanych cząsteczek wiąże się z większą proliferacją komórek raka prostaty. Wykluczając FGF z CAF-CM uzyskano 9% ( $p > 0,05$ ) wyższą proliferację, natomiast wykluczenie IL-33 spowodowało istotny statystycznie wzrost proliferacji o 15% ( $p < 0,05$ ) (Rycina 25). Nie zaobserwowano zmian w morfologii komórek po dodaniu przeciwciał neutralizujących do CAF-CM (Rycina 26). Uzyskane wyniki sugerują związek wrażliwości komórek nowotworowych na lek z cząsteczką FGF2.



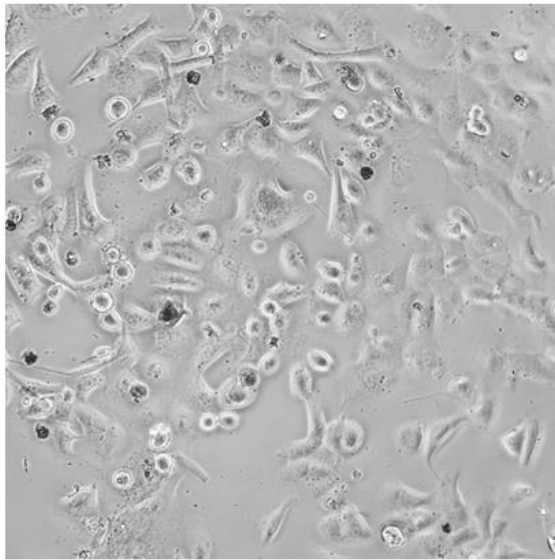
**Rycina 24.** Wpływ wykluczenia FGF/IL-33 z CAF-CM na wrażliwość komórek DU145 na cisplatynę – Test MTT. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). Wyniki statystycznie nieistotne ( $p > 0,05$ ) oznaczono jako ns.



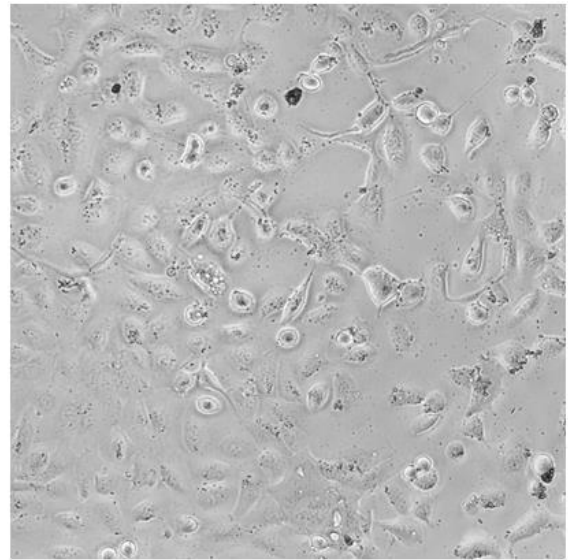
**Rycina 25.** Wpływ wykluczenia FGF/IL-33 z CAF-CM na wrażliwość komórek DU145 na cisplatynę – Test BrdU. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). Wyniki statystycznie nieistotne ( $p > 0,05$ ) oznaczono jako ns.



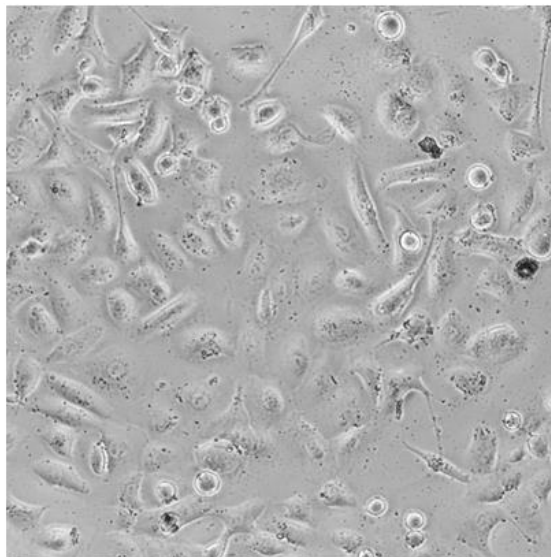
Kontrola



FGF (-)



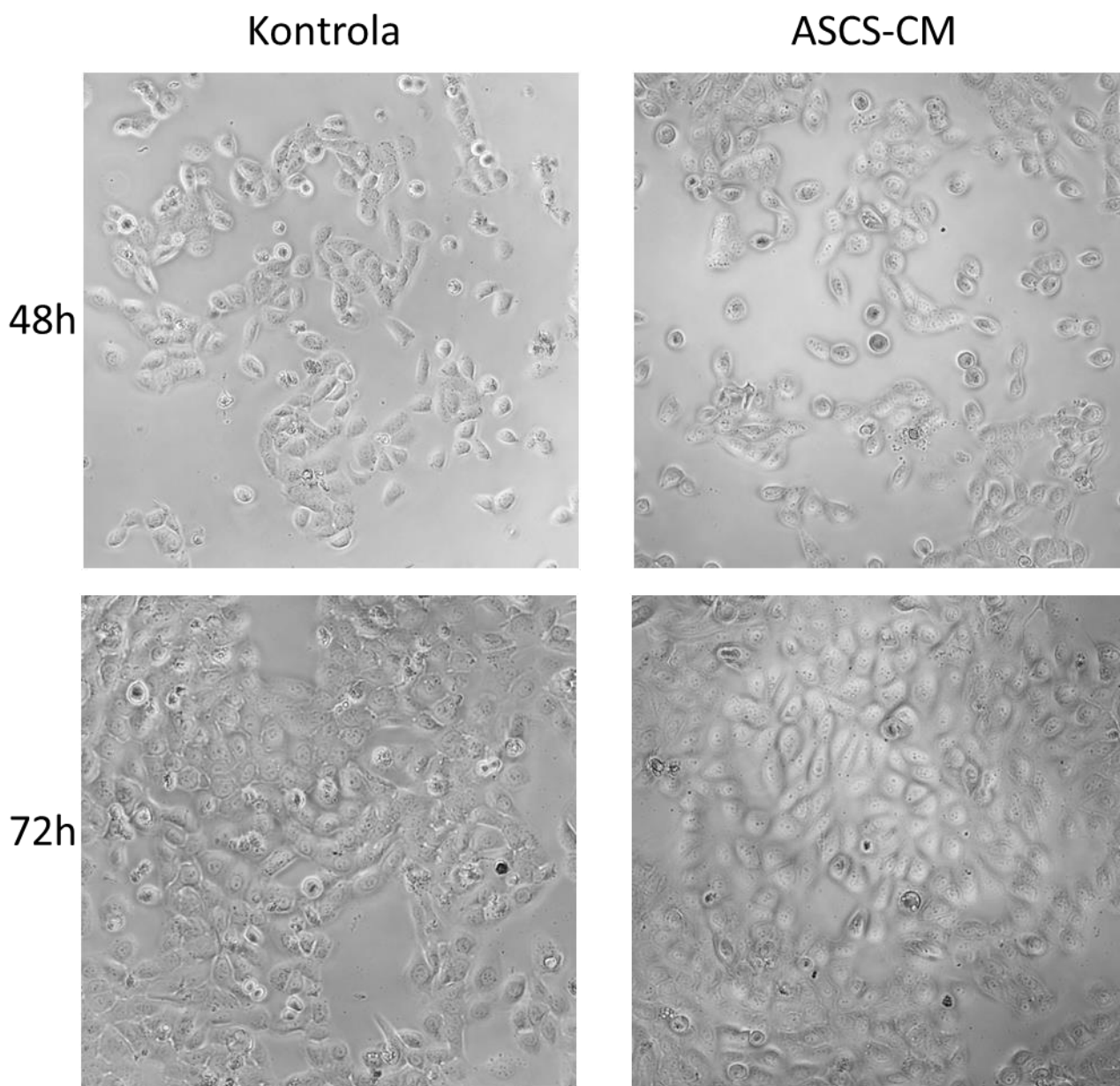
IL-33 (-)



**Rycina 26.** Komórki DU145 hodowane w obecności CAF-CM i przeciwciałem neutralizującym FGF/IL-33. Obserwacja mikroskopowa, powiększenie 20x. FGF(-) – przeciwciało neutralizujące FGF. IL-33(-) – przeciwciało neutralizujące IL-33.

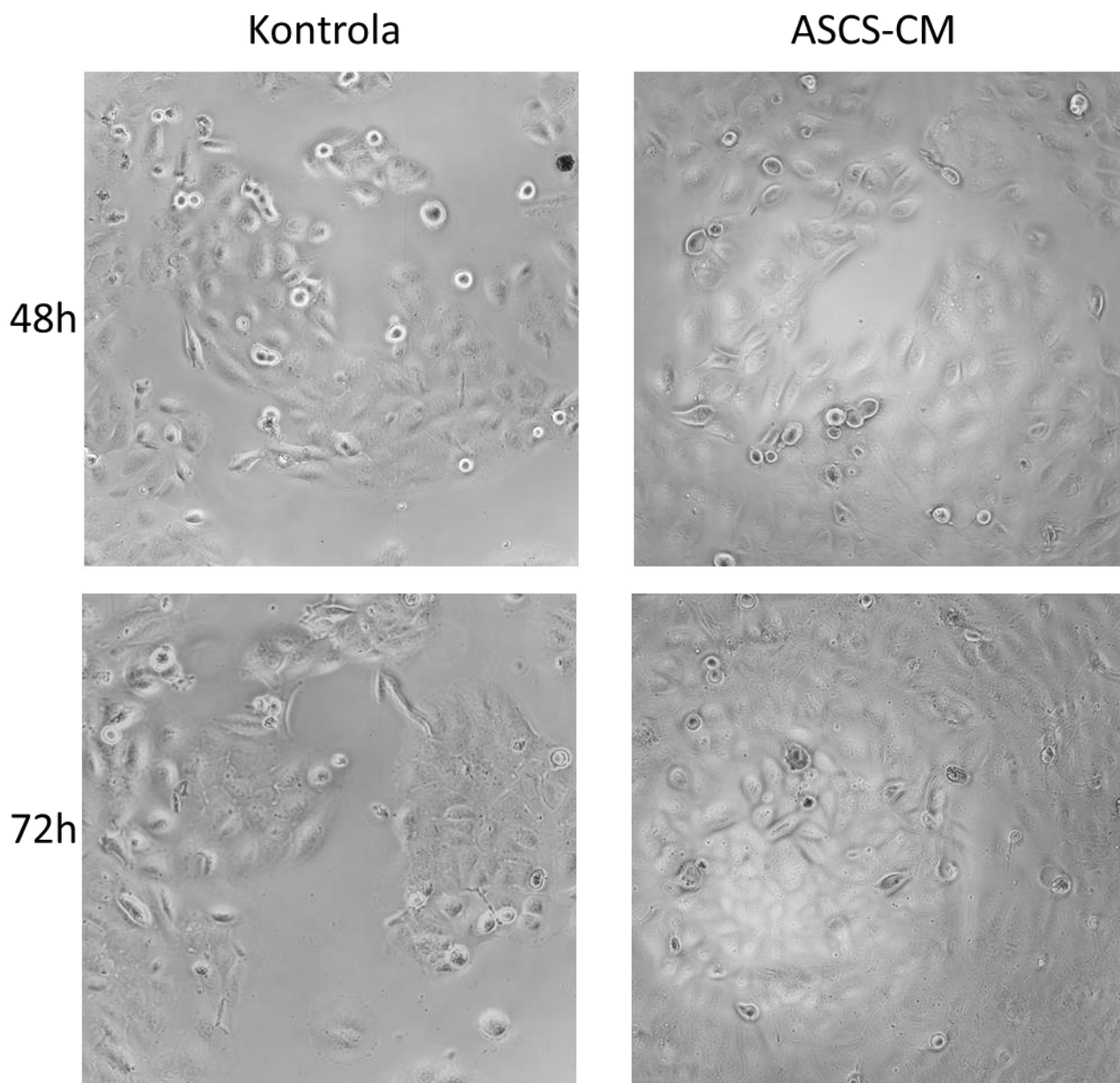
### 4.3 Wpływ ASCS-CM na komórki raka pęcherza moczowego i raka prostaty

HB-CLS-1 wykazywały zmiany morfologiczne po hodowli w obecności rozpuszczalnych mediatorów syntetyzowanych przez ASCS (Rycina 27). W obrębie monowarstwy pojawiły się komórki o nietypowych kształtach dla tej linii komórkowej oraz o zwiększonej objętości.



**Rycina 27.** Obserwacja mikroskopowa morfologii komórek HB-CLS-1 w obecności ASCS-CM przez 48h i 72h. Mikroskop o odwróconej optyce, powiększenie 20x.

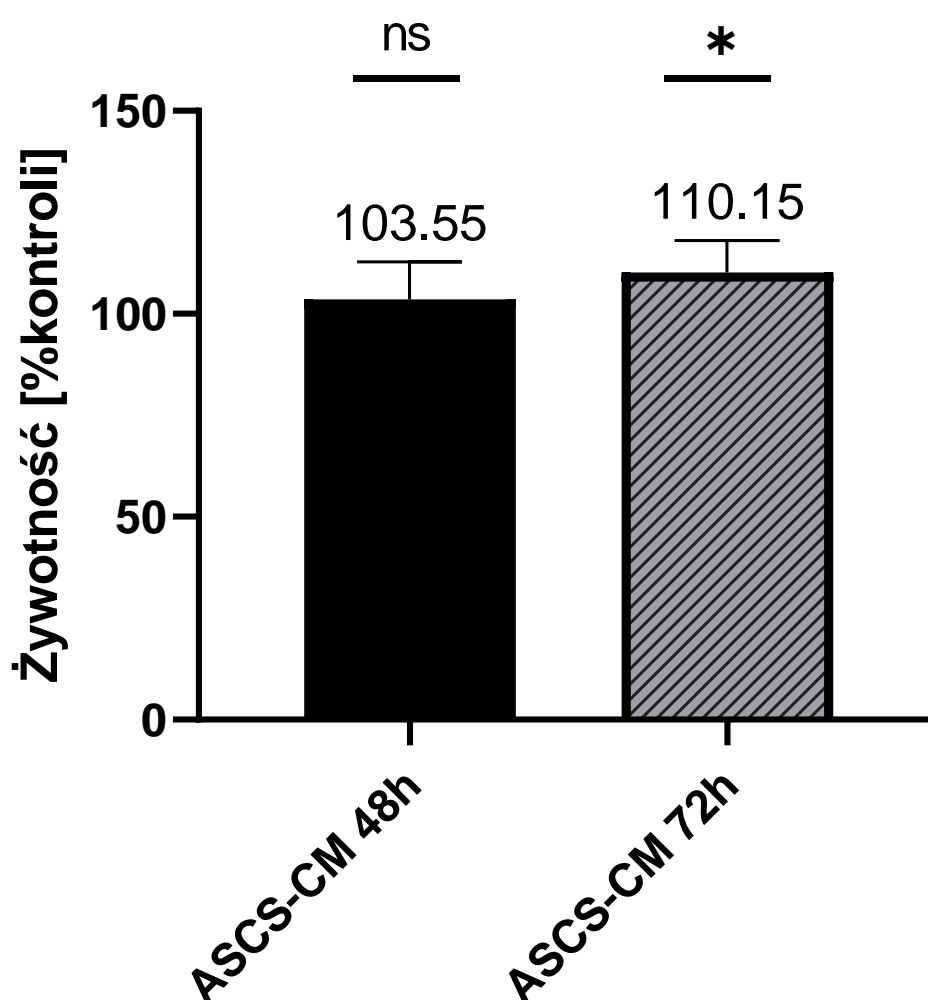
DU145 również wykazywały zmiany morfologiczne po hodowli w obecności rozpuszczalnych mediatorów syntetyzowanych przez ASCS (Rycina 28). W obrębie monowarstwy obserwowano komórki o zwiększonej objętości, w porównaniu do kontroli. Nie odnotowano zmian w kształcie komórek badanej linii raka prostaty.



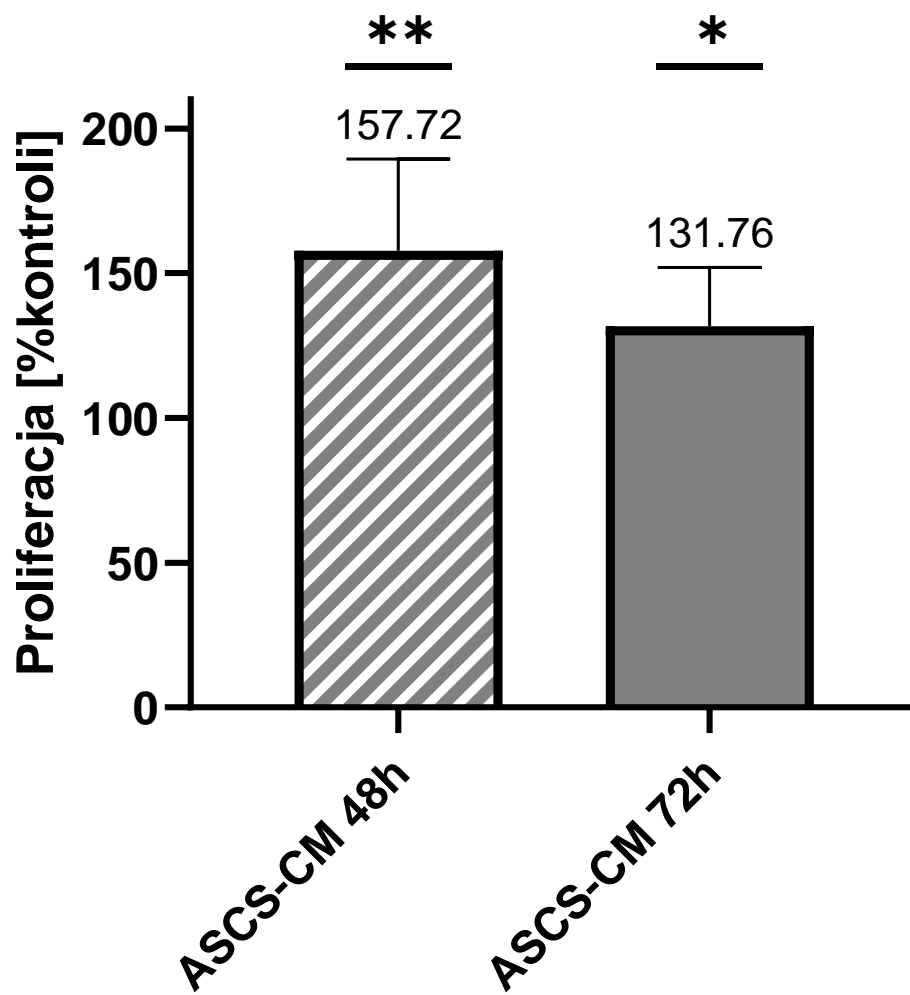
**Rycina 28.** Obserwacja mikroskopowa morfologii komórek DU145 w obecności ASCS-CM po 48h i 72h. Mikroskop o odwróconej optyce, powiększenie 20x.

#### 4.3.1 Żywotność i proliferacja komórek nowotworowych

Do oceny żywotności komórek wykorzystano test aktywności metabolicznej komórek – test MTT, natomiast do pomiaru poziomu proliferacji komórek, zastosowano test BrdU. Wyniki przedstawiono w odniesieniu do kontroli, która stanowi 100%. Cząsteczki zawarte w medium kondycjonowanym z ASCS zwiększyły żywotność komórek HB-CLS-1 o 4% ( $p>0,05$ ), oraz 10% ( $p<0,05$ ), odpowiednio po 48h i 72h hodowli z CM (Rycina 29). Wykazano również wyższą proliferację, w porównaniu do kontroli. Po 48h i 72h hodowli w obecności ASCS-CM, zaobserwowano 58% ( $p<0,05$ ) i 32% ( $p<0,05$ ) wyższy poziom proliferacji (Rycina 30).

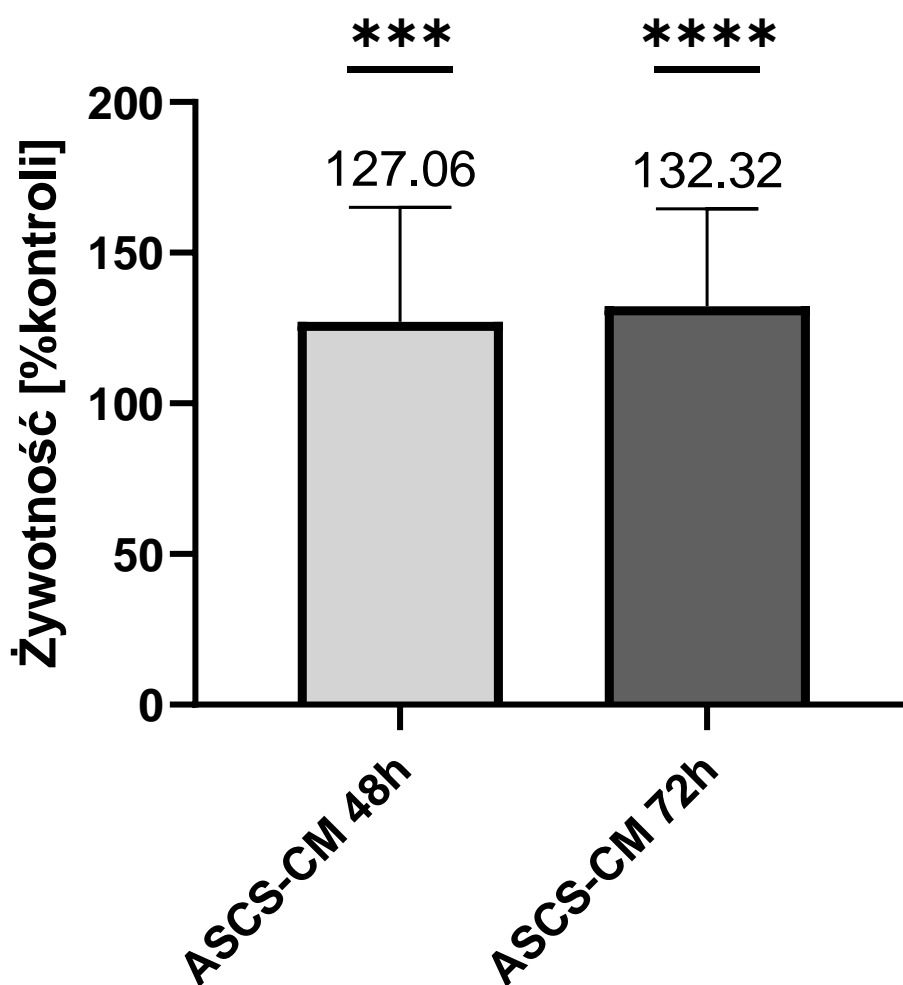


**Rycina 29.** Żywotność komórek HB-CLS-1 po hodowli w obecności ASCS-CM przez 48h i 72h. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p<0,05$ ). Wyniki statystycznie nieistotne ( $p>0,05$ ) oznaczono jako ns.

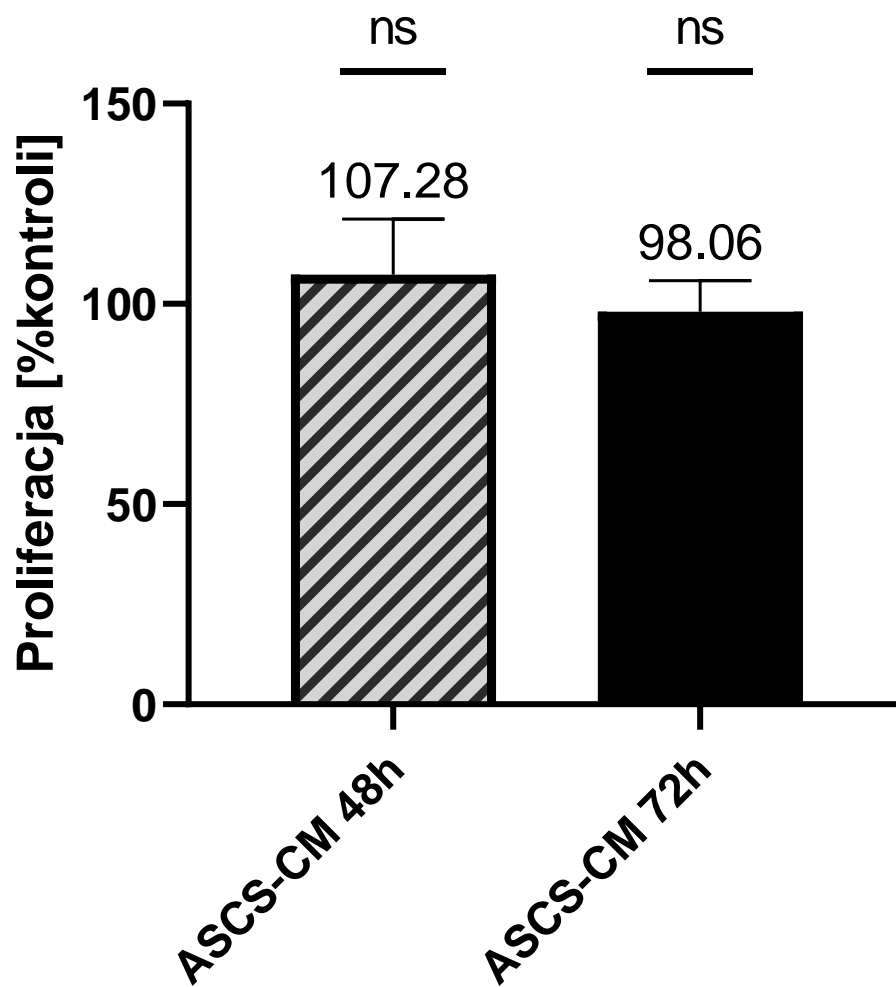


**Rycina 30.** Aktywność proliferacyjna komórek HB-CLS-1 po hodowli w obecności ASCS-CM przez 48h i 72h. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ).

Aktywność metaboliczna i proliferacyjna komórek DU145 również ulegały zmianie pod wpływem mediatorów wydzielanych przez ASCS. Żywotność komórek nowotworowych wzrosła o 27% ( $p < 0,05$ ) oraz 32% ( $p < 0,05$ ), odpowiednio po 48h i 72h hodowli w ASCS-CM (Rycina 31). Wykazano również wzrost proliferacji o 7% ( $p > 0,05$ ), w porównaniu do kontroli po 48h inkubacji z ASCS-CM (Rycina 32). Z kolei, po 72h hodowli zaobserwowano obniżenie aktywności proliferacyjnej badanych komórek o 2% ( $p > 0,05$ ).



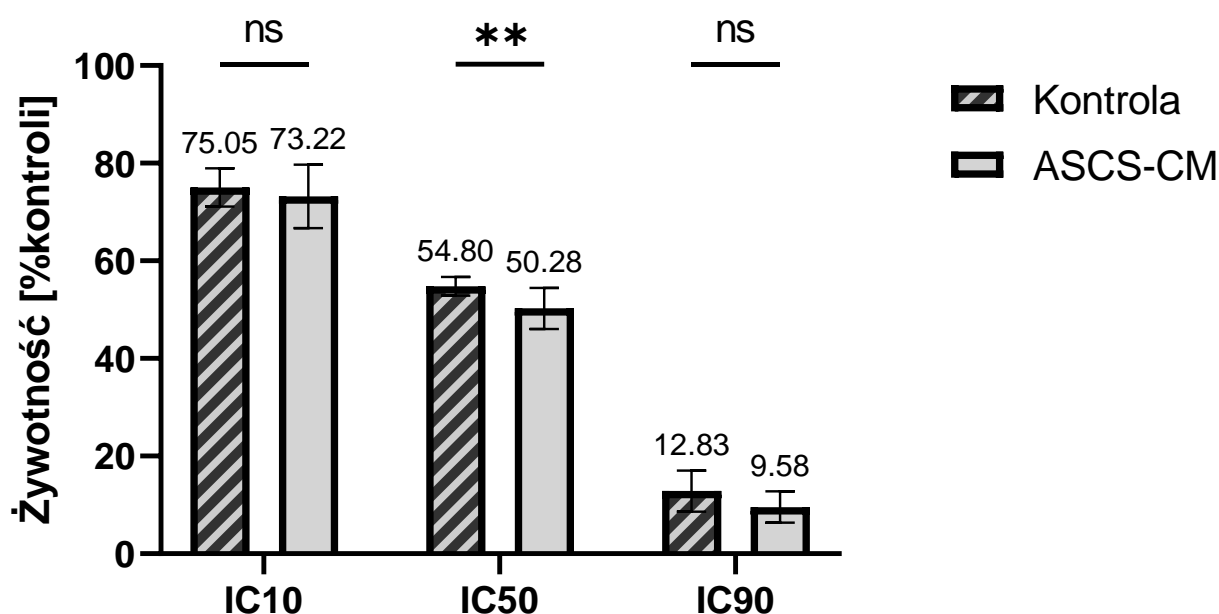
**Rycina 31.** Aktywność metaboliczna komórek DU145 po hodowli z ASCS-CM przez 48h i 72h. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ).



**Rycina 32.** Aktywność proliferacyjna komórek DU145 po hodowli z ASCS-CM przez 48h i 72h. Wyniki statystycznie nieistotne ( $p > 0,05$ ) oznaczono jako ns.

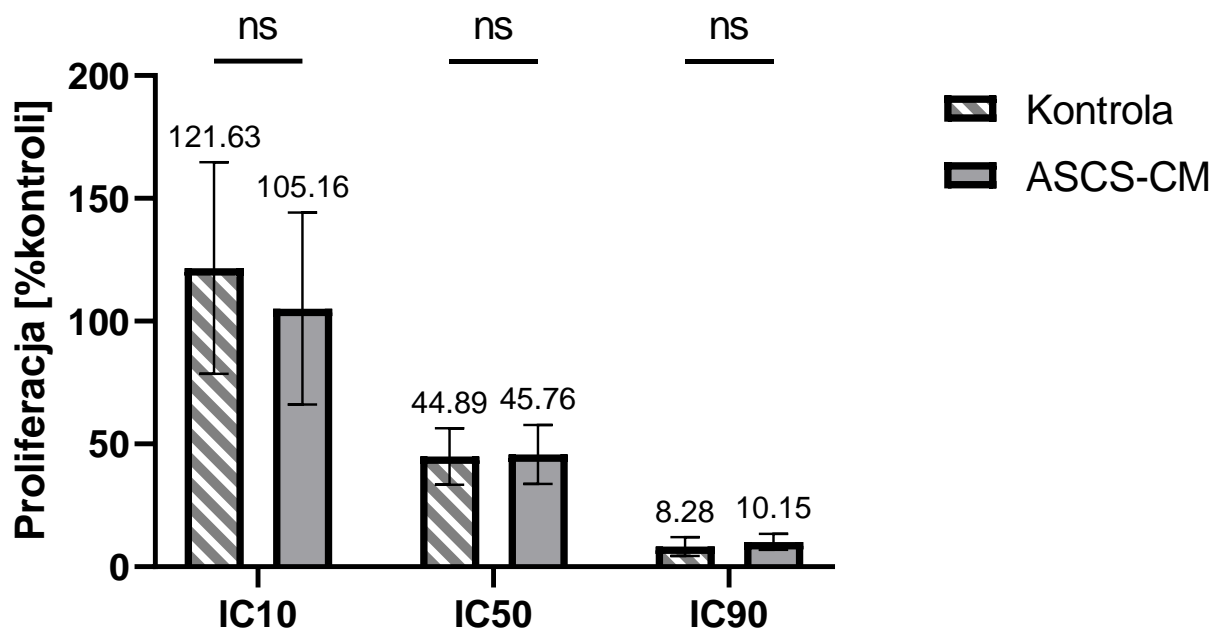
#### 4.3.2 Wpływ ASCS-CM na wrażliwość komórek HB-CLS-1 na ciprofloksacynę

Wrażliwość komórek raka pęcherza moczowego na ciprofloksacynę oceniano stosując testy MTT i BrdU. Rozpuszczalne mediatory syntetyzowane przez ASCS wpłynęły na wrażliwość komórek HB-CLS-1 na ciprofloksacynę. Odnotowano zmniejszoną żywotność HB-CLS-1 po hodowli z CM przy IC10, IC50 i IC90, odpowiednio o 2%, 5% i 3% (Rycina 33). Analiza statystyczna wykazała istotność uzyskanej różnicy ( $p < 0,05$ ) przy stężeniu ciprofloksacyny IC50. Zaobserwowano również zmiany w aktywności proliferacyjnej komórek (Rycina 34). W porównaniu do kontroli wykazano obniżoną proliferację HB-CLS-1 po hodowli z CM, przy stężeniu IC10 o 16%. Przy pozostałych stężeniach wykryto wyższą proliferację dla IC50 oraz IC90. Analiza statystyczna nie wykazała istotności tych wyników ( $p > 0,05$ ).



**Rycina 33.** Aktywność metaboliczna komórek HB-CLS-1 hodowanych z ASCS-CM oraz ciprofloksacyny w stężeniach IC10, IC50, IC90. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). Wyniki statystycznie nieistotne ( $p > 0,05$ ) oznaczono jako ns.

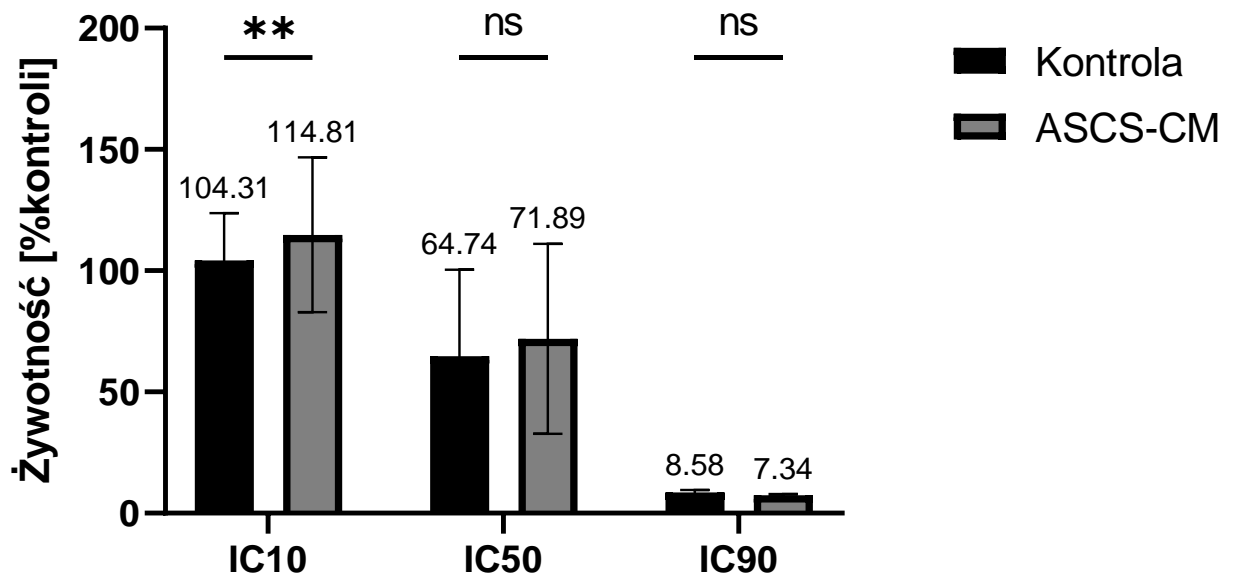




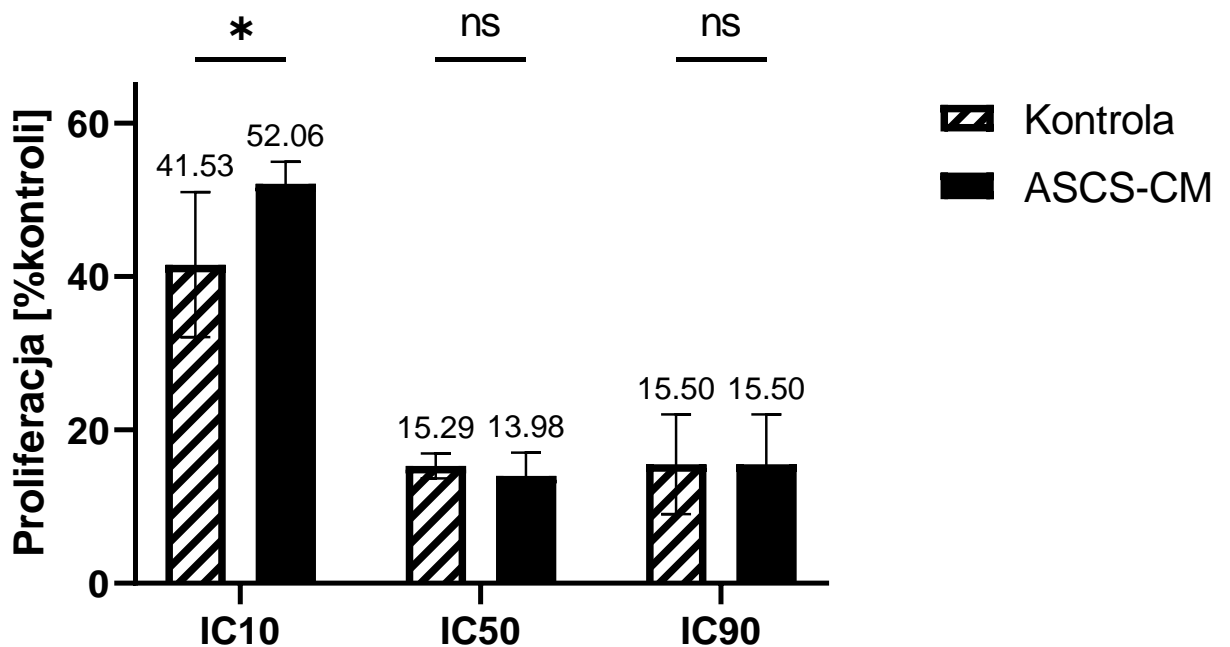
**Rycina 34.** Aktywność proliferacyjna komórek HB-CLS-1 hodowanych z ASCS-CM oraz ciprofloksacyny w stężeniach IC10, IC50, IC90. Wyniki statystycznie nieistotne ( $p > 0,05$ ) oznaczono jako ns.

#### 4.3.3 Wpływ ASCS-CM na wrażliwość komórek DU145 na cisplatynę

Wrażliwość komórek DU145 na cisplatynę po okresie hodowli z ASCS-CM oceniono poprzez pomiar aktywności metabolicznej i proliferacyjnej komórek. Test MTT wykazał istotne zmiany we wrażliwości DU145 na cisplatynę w stężeniu IC10. Zaobserwowano wyższą aktywność metaboliczną komórek hodowanych w obecności ASCS-CM o 10% ( $p < 0,05$ ) (Rycina 35). Test aktywności proliferacyjnej również wskazał na istotne zmniejszenie wrażliwości DU145 na cisplatynę w stężeniu IC10, po okresie hodowli w ASCS-CM (Rycina 36). W porównaniu do kontroli zaobserwowano 11% wyższą proliferację ( $p < 0,05$ ). Podobnie, jak przy ocenie żywotności, nie wykazano istotności statystycznej uzyskanych różnic dla stężenia IC50, która wyniosła 1%. Nie zaobserwowano zmian w proliferacji przy stężeniu cisplatyny IC90.



**Rycina 35.** Aktywność metaboliczna komórek DU145 hodowanych z ASCS-CM oraz cisplatyną w stężeniach IC10, IC50, IC90. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). Wyniki statystycznie nieistotne ( $p > 0,05$ ) oznaczono jako ns.



**Rycina 36.** Aktywność proliferacyjna komórek DU145 hodowanych z ASCS-CM oraz cisplatyną w stężeniach IC10, IC50, IC90. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie.

## 5 Dyskusja

Nie podlega wątpliwości, że komórek nowotworowych nie można traktować jako komórek o jednakowym fenotypie. Pozostają one w ciągłej „komunikacji” ze środowiskiem zewnętrznym. Aktywnie oddziałują z mikrośrodowiskiem guza, które zawiera różne komórki i cząsteczki. Już w 1889 roku ukazała się hipoteza „ziarna i gleby” (ang. seed and soil theory) zaproponowana przez Stephana Pagete. Zgodnie z tą teorią, komórki nowotworowe to „ziarno”, a mikrośrodowisko to „gleba”. To właśnie „gleba” ma szczególne znaczenie dla „ziarna”. Stwierdzono, że jedno nie może istnieć bez drugiego [55]. Między innymi ta koncepcja skłania środowisko naukowe do prowadzenia intensywnych badań nad TME. Jednym z jego głównych składników są fibroblasty związane z rakiem. CAF, jak wcześniej wspomniano, charakteryzują się wysoką heterogenicznością. Ich funkcja biologiczna w mikrośrodowisku guza może być różna w zależności od pochodzenia i fenotypu. Liczne badania wykazały, że odgrywają one istotną rolę w progresji guza [29,31–33,35,37,39,40,56]. Jednakże, mechanizmy interakcji komórek nowotworowych z fibroblastami związanymi z rakiem w dalszym ciągu wymagają wyjaśnienia. Również cząsteczki wydzielane przez CAF są heterogenne. Poprzez oddziaływania parakryne i autokryne zmiennie wpływają na otaczane przez nie komórki nowotworowe [57].

Pomimo wielu badań wskazujących na rolę CAF w promowaniu progresji guza, pojawiają się również dowody na ich odwrotną rolę. W jednym z takich badań Hutton i wsp. wyznaczyli dwie odrębne linie fibroblastów trzustkowych: CD105<sup>-</sup> oraz CD105<sup>+</sup>. W eksperymencie CAF CD105<sup>+</sup> umożliwiały wzrost guza *in vivo*. Z kolei, CAF CD105<sup>-</sup> znacząco hamowały wzrost raka trzustki. Zaobserwowano, że fenotyp ten z udziałem komórek dendrytycznych zależy od odporności adaptacyjnej. Sugeruje to, że fibroblasty CD105<sup>-</sup> sprzyjają oporności przeciwnowotworowej [58]. Innym przykładem heterogenicznych oddziaływań CAF na komórki nowotworowe jest badanie wpływu podtypu fibroblastów związanych z rakiem - apCAF na linie raka płuc. Wskazano, że apCAF mogą posiadać funkcje hamujące wzrost komórek raka płuc. Płucne fibroblasty prezentujące antygen bezpośrednio aktywowały limfocyty T CD4<sup>+</sup>, ale również poprzez wydzielanie kompleksu C1Q hamowały ich apoptozę. Białkowy kompleks C1Q stanowi część wrodzonego układu odpornościowego [59]. Warte uwagi jest również badanie przeprowadzone przez Grauel i wsp. [60]. Udowodnili oni, że w warunkach *in vivo* neutralizacja TGF- $\beta$  z mikrośrodowiska guza wywołuje sprzyjające

warunki terapeutyczne. Po zablokowaniu cząsteczek TGF- $\beta$  pojawiły się podzbiory CAF wyjątkowo wrażliwe na interferon oraz wrażliwe na ekspresję chemokiny CXCR3. W kolejnej części badania przeprowadzono eksperyment polegający na poddaniu zwierząt terapii anty TGF- $\beta$ . W efekcie końcowym osiągnięto wzrost naciekania limfocytów T do TME oraz zmniejszenie gęstości białek ECM. Autorzy zasugerowali, że koreluje to z rozwojem oporności przeciwnowotworowej i wyższą skutecznością immunoterapii [60].

Zdecydowana większość badań wskazuje jednak na promującą rolę CAF w stosunku do komórek nowotworowych [61]. Fibroblasty związane z rakiem mogą stanowić przeważającą część guza i wytwarzać duże ilości macierzy pozakomórkowej. Ich łączna objętość może przekraczać objętość komórek nowotworowych w guzie. W raku piersi wykazano, że głównym mechanizmem promocji progresji guza jest wywołane przez CAF środowisko immunosupresyjne. Costa i wsp. w swoim badaniu wyróżnili podzbiór CAF-S1, jako kluczowy induktor immunosupresji. Powodował on nie tylko przyciąganie limfocytów T, ale również ich różnicowanie w komórki CD25+ FOXP3+. Co więcej, podtyp CAF-S1 zwiększał zdolność regulatorowych komórek T do hamowania proliferacji efektorowych limfocytów T. Wysunięto hipotezę, że w ten sposób fibroblasty związane z rakiem przyczyniają się do oporności na immunoterapię [62]. Z kolei badanie przeprowadzone przez Kato i wsp. podkreśla główną rolę IL-6 w inicjacji immunosupresji guza. W ich badaniu wspólna hodowla komórek raka przetyku z CAF powodowała przyspieszenie wzrostu guza u myszy. Prowadziło to do zwiększenia ilości limfocytów naciekających nowotwór FOXP3+, mających zdolność immunosupresji względem limfocytów efektorowych. W hodowli *in vitro* zidentyfikowano silne wydzielanie IL-6 w kokulturze fibroblastów z komórkami guza. Po zablokowaniu IL-6 następowała regresja guza [63].

Aktualne prowadzone badania podkreślają fakt, że CAF można eliminować lub ukierunkować, jednak konieczne w dalszym ciągu jest lepsze zrozumienie biologii tych komórek i ich funkcji w poszczególnych nowotworach. Poszerzenie wiedzy o mikrośrodowisku guza niewątpliwie poprawi efekty końcowe leczenia raka. Biorąc pod uwagę podwójną rolę mikrośrodowiska nowotworowego w prezentowanej rozprawie doktorskiej analizowano wpływ CAF pochodzących z raka prostaty na cechy biologiczne komórek nowotworowych - raka prostaty i raka pęcherza moczowego. Po hodowli badanych komórek nowotworowych z mediatorami syntetyzowanymi przez fibroblasty związane z rakiem, pojawiły się komórki

nowotworowe o nietypowej dla badanych linii morfologii. Po inkubacji z CAF-CM pojawiły się komórki o wrzecionowatym kształcie. Shan i wsp. również obserwowali zmiany wyglądu komórek po hodowli z CAF-CM, jednak w tym przypadku badano raka trzustki. Podobnie jak w niniejszym badaniu, obserwowano komórki o niejednoznacznej morfologii, w kierunku kształtu wrzecionowatego [64]. Na analogiczne zmiany wskazał również zespół Kashima, badający wpływ CAF na przerzuty raka płaskonabłonkowego przetyku [65]. W innym badaniu raka prostaty również widoczny był wydłużony kształt badanych komórek na skutek hodowli z CAF [66]. Jako najczęstszą przyczyną zmian morfologicznych komórek uznaje się indukcję przejścia epitelialno-mezenchymalnego. Prowadzi to właśnie do wydłużenia kształtu oraz utraty zdolności adhezyjnych. Co z kolei przyczynia się do rozprzestrzeniania komórek nowotworowych [67]. Potwierdza to hipotezę, że to właśnie fibroblasty związane z rakiem odpowiadają za indukcję EMT. Co więcej, CAF mogą promować przejście epitelialno-mezenchymalne poprzez parakrynną sygnalizację IL-6 zarówno w raku pęcherza moczowego, jak i raku prostaty [68,69]. W prezentowanej pracy doktorskiej udokumentowano, że hodowla komórek nowotworowych w CAF-CM prowadzi do zmian w zakresie panelu wydzielanych białek. Analiza wykazała m.in. wzrost sekrecji IL-6. Jej nadekspresję raportuje się w wielu nowotworach [70–72]. Uważa się, że prowadzi to do proliferacji, angiogenezy oraz zahamowania apoptozy komórek nowotworowych [72]. W przypadku linii raka prostaty zaobserwowano również wyższy poziom IL-1 $\alpha$ , IL-10 oraz niższy poziom IL-4 w stosunku do kontroli. W linii raka pęcherza moczowego po inkubacji z CAF-CM wykryto wyższą sekrecję IFN $\alpha$  po dwóch dniach hodowli, wyższy poziom IL-13 oraz obniżoną ekspresję IL-4. Interleukina 4 jest cytokiną niezbędną do indukcji i utrzymania odpowiedzi immunologicznej typu 2. W mikrośrodowisku guza odgrywa rolę pronowotworową, współtworząc środowisko immunosupresyjne. Może jednak również odgrywać rolę przeciwnowotworową poprzez stymulację odpowiedzi immunologicznej [73,74]. Wyniki uzyskane w przedstawianej pracy doktorskiej nie wskazują na jej udział w promowaniu proliferacji badanych linii raka prostaty i raka pęcherza moczowego oraz oporności na stosowane leki. Dodatkowo, w niniejszej pracy przeprowadzono osobną analizę ekspresji IL-33. Należy ona do rodziny cytokin IL-1. Jej najsilniejszą ekspresję w niehematologicznych komórkach obserwuje się w komórkach nabłonka, śródbłonka i fibroblastach [75]. Niewątpliwie są to najczęściej identyfikowane komórki w mikrośrodowisku nowotworowym [62]. IL-33 jest aktywnie wydzielana również przez uszkodzone komórki [75]. Może ona zatem stanowić istotny regulator progresji

nowotworu. Poprzez zwiększoną ekspresję tej cząsteczki w TME powstaje wysoce immunosupresyjne środowisko. Przyczynia się to do oporności komórek nowotworowych na leczenie, promocję inwazji i powstawania przerzutów. IL-33 może modulować odpowiedź immunologiczną oraz TME. Jej wysoka ekspresja w tkance guza skorelowana jest ze złym rokowaniem. Istnieją jednak sprzeczne doniesienia, sugerujące również jej ochronną rolę w niektórych nowotworach, takich jak rak trzustki czy okrężnicy [75,76]. W omawianej pracy doktorskiej nie zaobserwowano znaczących statystycznie zmian w stężeniu wydzielanej IL-33 przez linię komórek raka pęcherza i raka prostaty po interakcji z CAF-CM. Feng i wsp. przeprowadzili analizę wydzielania IL-33 oraz jej wpływu na wydzielanie cytokin prozapalnych w raku jajnika. Co ważne, w badaniu monocytu wyizolowane od pacjentek z rakiem jajnika stymulowane IL-33 wykazywały podobne właściwości, jak komórki stymulowane CAF-CM. Odnotowano m.in., że IL-33 oraz CAF-CM podwyższają stężenie cytokin, takich jak IL-10 i TGF- $\beta$ . Badanie ujawniło, że wzajemne oddziaływania między CAF oraz monocytami w TME może wpływać na biologiczne właściwości komórek nowotworowych [77]. Wyniki te częściowo korelują z otrzymanymi w prezentowanej pracy doktorskiej. Analiza panelu białek uwidoczniała wyższe stężenie IL-10 po stymulacji CAF-CM w przypadku raka prostaty oraz wyższe stężenie IL-13 w przypadku raka pęcherza moczowego, w porównaniu do kontroli. Jednakże, aby potwierdzić oddziaływanie IL-33 z badanymi komórkami nowotworowymi, w dalszej części eksperymentu analizowano jej wpływ na wrażliwość na wybrane chemioterapeutyki.

W przypadku obu badanych linii komórek nowotworowych, rozpuszczalne mediatory syntetyzowane przez CAF znacząco zwiększały ich żywotność i proliferację. Wcześniejsze badania *in vitro* innych linii komórkowych raka prostaty również dowiodły, że CAF-CM sprzyja ich żywotności i proliferacji. Po ośmiu dniach hodowli komórek raka prostaty z CM z fibroblastów związanych z rakiem, Sun i wsp. zaobserwowali dwukrotny wzrost liczby komórek [78]. Yu i wsp., z kolei, dwukrotny wzrost żywotności w porównaniu do kontroli zaobserwowali już po czterech dniach hodowli komórek raka prostaty z CAF. W przytoczonym badaniu zastosowano kokulturę, a nie medium kondycjonowane, co mogło przetożyć się na szybszą proliferację komórek [79]. W przedstawianej pracy doktorskiej, w przypadku linii DU145 zarówno żywotność, jak i proliferacja wzrosła już po dwóch dniach hodowli z CAF-CM. Po trzech dniach nie odnotowano wzrostu proliferacji komórek, co wynika z dużego

zagęszczenia hodowli. Badania *in vivo* również sygnalizują że fibroblasty związane z rakiem mogą promować zwiększenie objętości guza prostaty [80]. Jemaa i wsp. podają, że istotną rolę w przyspieszaniu proliferacji komórek raka prostaty odgrywa IL-1 $\alpha$  oraz IL-6 [81]. Rojas i wsp. zaobserwowali, że ekspozycja na indukowaną przez IL-6 fosforylację STAT3 wiąże się z utratą E-kadheryny w badanej linii raka prostaty. Z kolei, po zastosowaniu inhibitora STAT3, IL-6 nie wywierała wpływu na ekspresję E-kadheryn. Wynik ten sugeruje, że IL-6 powoduje progresję raka prostaty przez aktywację STAT3 oraz indukcję EMT poprzez sygnalizację IGF-1R [69]. W omawianej pracy, wzrost poziomu obu tych cząsteczek (IL-1 $\alpha$ , IL-6) odnotowano właśnie w stosunku do linii raka prostaty po inkubacji z CAF-CM. Wskazuje to na powiązanie z otrzymanymi wynikami wysokiej żywotności i proliferacji DU145 pod wpływem CAF. W przypadku linii raka pęcherza moczowego HB-CLS-1 również odnotowano zwiększoną żywotność i proliferację tych komórek już po dwóch dniach hodowli z CAF-CM. Wyniki te są zgodne z wynikami dla linii raka pęcherza moczowego T24. Yang i wsp. stosowali medium kondycjonowane z CAF do analizy wpływu cząsteczek w nim zawartych na proliferację i inwazję komórek raka pęcherza moczowego. Po trzech dniach wspólnej hodowli zaobserwowano statystycznie istotny wzrost proliferacji badanych komórek w porównaniu do kontroli [82]. Goulet i wsp. wykazali, że podtyp CAF, gdzie ekspresja IL-6 jest zwiększona promuje proliferację komórek raka pęcherza moczowego [68]. Biorąc pod uwagę zmiany morfologii komórek HB-CLS-1 wskazujące na EMT oraz zmiany ekspresji IL-6 po hodowli z CAF-CM, można wnioskować, że te mechanizmy indukują zwiększoną żywotność i proliferację badanych komórek. W przedstawianej pracy doktorskiej wykazano również zmiany w apoptozie komórek nowotworowych indukowane mediatorami syntetyzowanymi przez CAF. Wyniki uzyskane przez Li i wsp. również sugerują, że CAF wpływają na apoptozę komórek nowotworowych. Po inkubacji CAF-CM z komórkami płaskonabłonkowego raka płuc zahamowano stres oksydacyjny wywołany apoptozą. W badaniu *in vivo* potwierdzono, że ta oporność spowodowana była czynnikami wydzielanymi do mikrośrodowiska przez CAF – m.in. metaloproteinazami [83]. Również w raku prostaty wskazuje się na rolę MMP w hamowanie apoptozy komórek nowotworowych. Zahamowanie ekspresji MMP-9 w komórkach DU145 wiąże się ze zmniejszoną sygnalizacją IGF-1R i może również indukować działanie antyproliferacyjne tych komórek [84]. Dodatkowo, w kolejnym badaniu z użyciem linii DU145, hamowanie MMP-9 indukowało rozszczepienie kaspazy-8 i kaspazy-7 [85]. Shan i wsp. w badaniu *in vitro* odkryli, że również egzosomy wydzielane przez CAF hamują apoptozę

komórek raka pęcherza moczowego. Dodatkowo, autorzy zaobserwowali chemooporność badanych komórek nowotworowych indukowaną egzosomami poprzez EMT [86]. Otrzymane dane w niniejszej pracy doktorskiej w przypadku obu linii świadczą o udziale mediatorów syntetyzowanych przez fibroblasty związane z rakiem w promowaniu wzrostu guza.

W związku z doniesieniami demonstrującymi pronowotworowe działanie CAF, w omawianej pracy przeprowadzono analizę ich wpływu na aktywację wybranych szlaków sygnalizacyjnych. Kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym 1/2 jest kluczowym składnikiem wewnątrzkomórkowego szlaku MAPK. Odgrywa ważną rolę w regulacji proliferacji, różnicowania, apoptozy, odpowiedzi na stres oksydacyjny i wiele innych procesów komórkowych. ERK należąca do kinaz MAPK odgrywa rolę w przekazywaniu sygnału zewnątrzkomórkowego do celów wewnątrzkomórkowych [87]. Nadekspresja tej kinazy sprzyja proliferacji i zwiększa próg apoptozy komórek nowotworowych. Oprócz powyższego, ERK jest również zaangażowana w proces tworzenia masy guza. Ciągła aktywacja szlaku MAPK może sprzyjać transformacji prawidłowych komórek w nowotworowe [88,89]. Kolejnym analizowanym białkiem w niniejszej pracy była serynowo-treoninowa kinaza Akt. Stanowi ona ważny element szlaku sygnalizacyjnego PI3K/Akt. Akt reguluje cykl komórkowy, przeżycie i starzenie komórek. W procesie nowotworowym jej nadekspresja ma istotny udział w promowaniu przejścia EMT, a tym samym w migracji i inwazji komórek nowotworowych. Oprócz aktywności pronowotworowej, jej wysoka ekspresja może wiązać się ze starzeniem komórkowym zależnym od p53/p21 [90]. W związku z tym, w niniejszej pracy analizowano również zmiany w stężeniu białka p53 w komórkach nowotworowych po hodowli z CAF-CM. Szlaki sygnałowe Akt/ERK są uznawane za krytyczne dla procesu nowotworowego z uwagi na ich kluczową rolę jako wewnątrzkomórkowych mediatorów sygnału przeżycia i proliferacji komórek [91]. Ostatnią analizowaną w przedstawianej pracy cząsteczką była kinaza rybosomalna p70S6K. Ma ona plejotropowy wpływ na syntezę białek, metabolizm komórkowy, wzrost komórek, ich ruchliwość oraz odpowiedź na uszkodzenia DNA. Deregulacja p70S6K odnotowywana jest w wielu nowotworach. Do jej nadekspresji przyczynia się m.in. hiperaktywacja Akt. Powiązana jest również z parakrynnym działaniem CAF. Sugeruje się, że p70S6K może wpływać na starzenie się fibroblastów, co z kolei może wywoływać ich właściwości pronowotworowe [92]. W prezentowanej pracy doktorskiej wykazano, że CAF parakrynnie oddziałuje na ufosforylowane formy ERK 1/2, AKT 1/2/3 oraz p70S6K



w komórkach nowotworowych. Zarówno dla linii raka pęcherza moczowego, jak i dla linii raka prostaty odnotowano wyższą aktywność badanych białek w porównaniu do kontroli. Wyniki te są zgodne ze wcześniejszymi obserwacjami. Przy analizie należy jednak uwzględnić, że otrzymano stosunkowo niski wynik absorbancji prób badanych Akt i p70S6K. Kharaziha i wsp. w badaniu mechanizmów oporności raka prostaty na sorafenib analizowali kluczowe szlaki sygnalizacyjne. Fosforylacja kinazy Akt utrzymywała się w obecności CAF, umożliwiając w ten sposób przeżycie komórek nowotworowych po potraktowaniu ich badanym lekiem. Spekuluje się, że nadekspresja tej cząsteczki stymulowana przez CAF przyczynia się do zmniejszenia wrażliwości raka prostaty na chemioterapeutyki [93]. W pokrewnym badaniu, obserwowano fosforylację ERK po traktowaniu komórek nowotworowych medium kondycjonowanym z CAF. Stwierdzono, że to parakrylna sygnalizacja CAF z komórkami nowotworowymi poprzez szlak sygnalizacyjny HGF-MEK-ERK 1/2 odpowiedzialna jest za chemooporność raka wątrobowokomórkowego [94]. W raku pęcherza moczowego fosforylacja Akt i ERK również przyczynia się do oporności guza na chemioterapeutyki [95]. Kim i wsp. w badaniu kohortowym wyselekcjonowali podgrupę pacjentów z wysoką ekspresją p70S6K. Wskazano, że szlak mTOR poprzez p70S6K ściśle wiąże się z nawrotem nieinwazyjnego raka pęcherza moczowego i to właśnie wysoki poziom p70S6K stanowi czynnik predykcyjny [96]. W raku prostaty z kolei obserwuje się, że p70S6K ma kluczowe znaczenie dla proliferacji i moduluje ono poziom cykliny D1. Cyklina ta uznawana jest za ważny protoonkogen, a jej nadekspresja wykrywana jest w większości nowotworów. W badaniu *in vitro* udowodniono, że defosforylacja p70S6K zmniejsza ekspresję cykliny D1 i tym samym hamuje proliferację komórek nowotworowych [97]. Aby sprawdzić, jak aktywacja powyższych szlaków sygnalizacyjnych wpływa na starzenie się komórek nowotworowych w omawianej pracy doktorskiej analizowano ekspresję białka p53 w formie całkowitej i ufosforylowanej. W obu liniach komórkowych zaobserwowano istotny statystycznie spadek formy ufosforylowanej po 48h lub 72h inkubacji z CAF-CM. Białko p53 jest scharakteryzowane jako gen supresorowy nowotworów. Jego inaktywacja prowadzi do rozwoju i progresji raka oraz do lekooporności [98]. Wyciszenie tego białka wykrywa się również w raku prostaty i raku pęcherza moczowego [98,99]. Jest to zgodne z wynikami niniejszej pracy. Uzyskany efekt świadczący o podwyższonej ekspresji Akt oraz obniżonej aktywności p53 można wytłumaczyć ujemnym sprzężeniem zwrotnym. Gottlieb i wsp. wyjaśnili, że w zależności od sygnałów, zależny od p53 spadek ekspresji Akt może prowadzić do śmierci komórki. Z kolei podwyższony

poziom Akt może prowadzić do aktywacji Mdm2 oraz inaktywacji p53 [100]. Hipoteza ta wyjaśnia wyniki uzyskane w przedstawianej pracy badawczej. Podsumowując, wszystkie obserwacje sugerują postawienie hipotezy, że to CAF poprzez parakrynną aktywację szlaków sygnalizacyjnych z udziałem Akt/ERK/p70 przyczyniają się do wzrostu i chemooporności guzów pęcherza moczowego i prostaty.

W kolejnej części pracy doktorskiej, aby potwierdzić parakrynną rolę CAF na oporność komórek raka prostaty i raka pęcherza moczowego, analizowano ich wrażliwość na wybrane chemioterapeutyki po inkubacji z CAF-CM. Mając na uwadze aktualne statystyki dotyczące zachorowań na raka wciąż poszukiwane są przyczyny zachorowań, nawrotów czy oporności na dostępne terapie. Uważa się, że lekooporność jest głównym ograniczeniem skuteczności leczenia chorób nowotworowych. Początkowo dobrym rozwiązaniem wydawały się terapie skojarzone, jednak z biegiem czasu koniecznością stało się opracowywanie nowych strategii terapeutycznych [101]. Przez długi czas skupiano się wyłącznie na komórkach nowotworowych, jednak wyniki badań wykazały, że to mikrośrodowisko guza odpowiada za regulowanie mechanizmów oporności komórek nowotworowych [102]. W niniejszej pracy odnotowano obniżoną wrażliwość komórek raka pęcherza moczowego i raka prostaty na zastosowane chemioterapeutyki po wystawieniu ich na parakrynną rolę CAF. Wykazano, że czynniki syntetyzowane przez fibroblasty związane z rakiem sprzyjają oporności na stosowane cząsteczki terapeutyczne. Już wcześniej raportowano, że CAF mogą wpływać na lekooporność. W badaniu raka przełyku, gdzie stosowano CAF-CM oraz cisplatynę zaobserwowano zwiększoną proliferację, a tym samym zmniejszenie wrażliwości komórek nowotworowych na badaną cząsteczkę. Badacze podkreślili parakrynną rolę CAF, m.in. w aktywacji Akt i ERK1/2, co prowadzi do zahamowania śmierci komórek i aktywnej ich proliferacji [103]. Cheteh i wsp. po inkubacji komórek raka prostaty z CAF-CM oraz przy zastosowaniu kokultury zaraportowali obniżoną wrażliwość na deoksyrybicynę. Podobnie, jak w niniejszym badaniu aktywność p53 była osłabiona w komórkach raka prostaty traktowanych deoksyrybicyną w obecności CAF-CM. Wysłunięto więc przypuszczenie, że CAF poprzez zwiększenie wewnątrzkomórkowego poziomu glutationu zmniejszają stres oksydacyjny, poprawiają akumulację leku, osłabiają uszkodzenia DNA oraz osłabiają indukcję p53 [104]. W przypadku raka pęcherza moczowego, Long i wsp. odnotowali podwyższoną proliferację, obniżoną apoptozę oraz obniżoną wrażliwość na cisplatynę po współhodowli z fibroblastami

związanymi z rakiem. Dodatkowo, wskazano również na wysoką fosforylację Akt w badanej próbie. Autorzy zasugerowali, że oporność na cisplatynę spowodowana jest szlakiem sygnalizacyjnym IGF-1/ER $\beta$ /Bcl-2, w którym jedną z kluczowych ról odgrywa kinaza Akt [105]. Wyniki te korelują z wynikami uzyskanymi w niniejszej pracy doktorskiej. Na ich podstawie można stwierdzić, że CAF parakrynnie obniżają wrażliwość na stosowane chemioterapeutyki poprzez aktywację szlaków sygnalizacyjnych oraz regulację ekspresji p53.

W związku z heterogenicznością i plastycznością CAF, ukierunkowanie terapii w określone cząsteczki TME oraz szlaki sygnalizacyjne, a nie w same komórki wydaje się obiecującą strategią [61]. Jedną z analizowanych cząsteczek w przedstawianej pracy był czynnik wzrostu fibroblastów 2 (FGF2, ang. Fibroblast Growth Factor-2). Czynniki wzrostu fibroblastów (FGF, ang. Fibroblast Growth Factors) biorą udział w różnych procesach biologicznych, w tym również w karcynogenezie. Z jej udziałem regulowane są mechanizmy takie, jak mitogeneza, różnicowanie, angiogeneza, przeżycie czy ruchliwość komórek. Aktualnie istnieją dowody potwierdzające obecność FGF w mikrośrodowisku wielu nowotworów oraz ich działanie pronowotworowe, w tym wspieranie proliferacji, przeżycia, migracji i inwazyjności komórek nowotworowych. FGF pośredniczy w aktywacji wielu szlaków sygnalizacyjnych, także w takich z udziałem ERK 1/2 i Pi3k/Akt. Jak wcześniej wskazano mogą one odpowiadać za chemooporność komórek raka. Dodatkowo, IL-6 bierze udział w regulacji FGF, a ta z kolei promuje przejście epitelialno-mezenchymalne. Nieprawidłowa sygnalizacja czynników wzrostu fibroblastów jest raportowana m.in. w nowotworach układu płciowo-moczowego, jak raka prostaty i raka pęcherza moczowego [106–108]. Pecqueux i wsp. zasugerowali, że ekspresja FGF2 może stanowić niekorzystny czynnik prognostyczny w raku prostaty. Wykazano, że stymulacja FGF2 prowadzi do zaburzeń równowagi chromosomalnej i indukcji pęknięć DNA w warunkach *in vitro* i *in vivo*. W badaniu hamowania sygnalizacji FGF dochodziło do odwrócenia aberracji i pęknięć DNA, spowodowanych przez FGF2 [109]. W meta-analizie Mcniel i Tschlis zaobserwowali, że nowotwory wykazujące wysoką ekspresję FGF2, charakteryzują się również nadekspresją Akt3, co koreluje ze złym rokowaniem u pacjentów z rakiem pęcherza moczowego. Autorzy zasugerowali użyteczność kliniczną z ukierunkowania terapii na szlak FGF2/KDM2B-EZH2/miR-101EZH2 [110]. Knelson i wsp. w badaniu *in vitro*, stosując przeciwciało neutralizujące FGF2, odnotowali zniesienie efektu różnicowania spowodowanego użyciem CM z linii nerwiaka zarodkowego i idących za tym

zmian w sygnalizacji TME [111]. W innym badaniu scharakteryzowano specyficzne przeciwciało monoklonalne anty-FGF2, a następnie analizowano jego zastosowanie w czerniaku. Blokowanie FGF2 upośledziło wzrost guza oraz zmniejszyło angiogenezę w guzach przerzutowych [112]. Sugeruje się zatem, że wykluczenie FGF2 z mikrośrodowiska guza ma charakter przeciwnowotworowy. Również w niniejszej pracy zauważono pozytywny efekt blokowania FGF2 w badanych liniach raka prostaty i raka pęcherza moczowego. Przy inkubacji komórek nowotworowych z CAF-CM ze zneutralizowanym FGF2, odnotowano wyższą wrażliwość na zastosowane leki. Kolejną blokowaną cząsteczką była IL-33. Analiza nie wykazała jej udziału w chemooporności DU145, co prawdopodobnie związane jest z brakiem jej nadekspresji w tym modelu komórkowym. W przypadku raka pęcherza moczowego odnotowano, że wykluczenie IL-33 z CAF-CM wpływa na wrażliwość komórek nowotworowych. W porównaniu do kontroli, otrzymano niższą żywotność HB-CLS-1 inkubowanych w CM bez IL-33 po traktowaniu hodowli ciprofloksacyną. Wynik ten nie koreluje z brakiem nadekspresji tej cząsteczki w zastosowanym modelu komórkowym. W sekretomie HB-CLS-1 stwierdzono jednak nadekspresję IL-13 po hodowli z CAF-CM. Zhanga i wsp. w badaniu *in vivo* potwierdzili, że fibroblasty reagują na IL-13, która może regulować aktywność IL-33, zmniejszając ją. Odkryto, że tłumienie IL-13 zwiększa aktywność IL-33 [113]. Zgodnie z tym, zidentyfikowana nadekspresja IL-13 mogła stłumić aktywność IL-33 w badanym sekretomie. Aby wyjaśnić wpływ wykluczenia IL-33 na wrażliwość raka pęcherza moczowego na leczenie należałoby potwierdzić uzyskane wyniki w modelu *in vivo*.

Kolejną grupą komórek identyfikowanych w mikrośrodowisku guza są mezenchymalne komórki macierzyste. To komórki o silnym tropizmie do środowiska guza, mogące spowalniać albo przyspieszać wzrost guza. Podobnie jest w przypadku ich wpływu na wrażliwość komórek nowotworowych na leczenie. Dokumentuje się zarówno hamowanie oporności terapeutycznej, jak i jej promowanie. He i wsp. wykazali, że MSC-CM może uwrażliwiać komórki raka piersi na radioterapię. Zauważono, że medium kondycjonowane z MSC wraz z radioterapią hamuje szlak sygnałowy Stat3. Odkryto również, że MSC parakrynnie mogą hamować wzrost guza [114]. Przeciwnie wyniki uzyskano m.in. dla szpiczaka mnogiego. Zaobserwowano, że MSC poprzez produkcję CXCL13 zwiększają oporność komórek nowotworowych na bortenzomib [115]. Co ciekawe, Skolekova i wsp. wskazali, że MSC pod wpływem cisplatyny nie ulegają apoptozie, ale część badanych komórek ulega starzeniu.

W badaniu *in vivo* MSC promowały wzrost komórek raka piersi, a przy jednoczesnym stosowaniu cisplatyny prowadziły do chemooporności guza. Zespół wskazał, że jest to związane z podwyższonym poziomem cytokin, takich jak IL-6 i IL-8 wytwarzanych przez MSC wystawione na działanie cisplatyny. Poza zmianami profilu cytokin, odnotowano również zmiany w aktywacji wielu szlaków sygnalizacyjnych [116]. Opisane badanie koreluje z obserwacją w przedstawianej pracy. Po inkubacji linii komórek raka prostaty z samym MSC-CM zaobserwowano wyższą żywotność w porównaniu do kontroli. Dodatkowo, po hodowli DU145 z MSC-CM, a następnie potraktowaniu komórek nowotworowych cisplatyną wykazano ich zmniejszoną wrażliwość na zastosowany chemioterapeutyk w stężeniu odpowiadającym IC10. Z drugiej strony, wyniki uzyskane w stosunku do linii komórek raka pęcherza moczowego sugerują, że w przypadku tego nowotworu MSC mogą zwiększać jego wrażliwość na ciprofloksacynę. Mimo, że samo MSC-CM podobnie, jak w przypadku linii raka prostaty promowało żywotność i proliferację HB-CLS-1. Wcześniejsze badania prowadzone na innej linii komórkowej raka pęcherza moczowego – T24, wskazały na indukowanie oporności tych komórek na ciprofloksacynę [117]. Różnice we wrażliwości komórek nowotworowych na rozpuszczalne mediatory mogą wynikać ze specyficznych właściwości biologicznych MSC oraz pozostałych elementów TME, ich pochodzenia i fenotypu. Biorąc pod uwagę rozbieżność w publikowanych wynikach, konieczne są dodatkowe badania, aby w pełni zrozumieć rolę MSC w oporności terapeutycznej.

Podsumowując, mikrośrodowisko nowotworowe stanowi złożoną i niejednorodną przestrzeń wokół guza. Jak wcześniej wskazano, istnieje wiele dowodów, że to właśnie zrąb guza jest głównym regulatorem komórek nowotworowych. Przedstawiane w prezentowanej rozprawie doktorskiej badanie *in vitro* wskazuje na ścisłą zależność między czynnikami wydzielanymi przez fibroblasty związane z rakiem, a komórkami raka prostaty i raka pęcherza moczowego. Wyniki ilustrują, że CAF parakrynnie promują wzrost i proliferację komórek nowotworowych. Wykazano, że efekt ten jest spowodowany działaniem cząsteczek uwalnianych z komórek raka pod parakrynnym wpływem CAF, takich jak IL-6, która inicjuje EMT. Dodatkowo, CAF poprzez wydzielanie czynników zewnątrzkomórkowych wpływają na aktywację szlaków sygnalizacyjnych z udziałem Akt/ERK/p70 oraz obniżenie ekspresji p53. To również przyczynia się nie tylko do wzrostu, ale też chemooporności komórek nowotworowych. Wyniki sugerują, że neutralizacja FGF2 z mikrośrodowiska guza poprawia

spowodowaną przez CAF-CM lekooporność. Z kolei, aby wyjaśnić wpływ wykluczenia IL-33 na wrażliwość raka pęcherza moczowego na chemioterapeutyki, należałoby potwierdzić otrzymane wyniki w modelu *in vivo*. W przypadku sekretomu MSC, niewątpliwie cząsteczki w nim zawarte oddziałują z komórkami nowotworowymi, również zwiększając ich żywotność i proliferację. Jednakże, nie uzyskano jednoznacznego potwierdzenia ich wpływu na wrażliwość komórek raka prostaty i raka pęcherza moczowego na zastosowane cząsteczki terapeutyczne. Aby w pełni zrozumieć ich rolę w odpowiedzi na leczenie, należy w dalszym ciągu badać ich wpływ na poszczególne grupy komórek w TME.

## 6 Wnioski

1. Fibroblasty związane z rakiem parakrynnie promują wzrost i proliferację komórek raka prostaty i raka pęcherza moczowego poprzez regulację ich sekretomu.
2. Mediatory syntetyzowane przez fibroblasty związane z rakiem obniżają wrażliwość komórek raka prostaty i raka pęcherza moczowego na stosowane chemioterapeutyki poprzez aktywację szlaków sygnalizacyjnych oraz regulowanie ekspresji białka p53.
3. Neutralizacja cząsteczek FGF z mikrośrodowiska guza wydaje się być obiecującym kierunkiem badań nad strategią zwalczania lekooporności komórek raka prostaty i raka pęcherza moczowego.
4. Mezenchymalne komórki macierzyste parakrynnie promują wzrost i proliferację komórek raka prostaty i raka pęcherza moczowego, a także wpływają na oporność komórek nowotworowych na stosowane leki.

## Wykaz tabel i rycin

<b>Tabela 1.</b> Charakterystyka użytych linii komórkowych. ....	23
<b>Tabela 2.</b> Warunki hodowli zastosowanych linii komórkowych. ....	25
<b>Tabela 3.</b> Zmiany aktywności sekrecyjnej HB-CLS-1 po hodowli z CAF-CM przez 48h i 72h. ...	36
<b>Tabela 4.</b> Zmiany aktywności sekrecyjnej DU145 po hodowli z CAF-CM przez 48h i 72h. ....	37
<b>Rycina 1.</b> Ekspresja IL-33 przez HB-CLS-1 po 48h i 72h hodowli w obecności CAF-CM. Wyniki nieistotne statystycznie oznaczono jako ns. ....	38
<b>Rycina 2.</b> Ekspresja IL-33 przez DU145 po 48h i 72h hodowli w obecności CAF-CM. Wyniki nieistotne statystycznie oznaczono jako ns. ....	39
<b>Rycina 3.</b> Żywotność HB-CLS-1 hodowanych przez 48h i 72h w obecności CAF-CM. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). ....	40
<b>Rycina 4.</b> Obserwacje mikroskopowe morfologii komórek linii HB-CLS-1 w obecności CAF-CM. Mikroskop o odwróconej optyce, powiększenie 20x. ....	41
<b>Rycina 5.</b> Żywotność DU145 hodowanych przez 48h i 72h w obecności CAF-CM. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). ....	42
<b>Rycina 6.</b> Obserwacje mikroskopowe morfologii komórek DU145 w obecności CAF-CM. Mikroskop o odwróconej optyce, powiększanie 20x. ....	43
<b>Rycina 7.</b> Aktywność proliferacyjna HB-CLS-1 hodowanych przez 48h i 72h w obecności CAF-CM. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). ....	44
<b>Rycina 8.</b> Proliferacja DU145 hodowanych przez 48h i 72h w obecności CAF-CM. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). Wyniki nieistotne statystycznie ( $p > 0,05$ ) oznaczono jako ns. ....	45
<b>Rycina 9.</b> Aktywność kaspazy 3/7 w HB-CLS-1 hodowanych w obecności CAF-CM. A) komórki kontrolne, B) komórki inkubowane z CAF-CM przez 48h, C) komórki inkubowane z CAF-CM przez 72h. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). Wyniki statystycznie nieistotne ( $p > 0,05$ ) oznaczono jako ns. ....	47
<b>Rycina 10.</b> Aktywność kaspazy 3/7 komórkach HB-CLS-1 hodowanych w obecności CAF-CM przez 48h i 72h. Dokumentacja fotograficzna. Powiększenie 20x. ....	48



- Rycina 11.** Aktywność kaspazy 3/7 w komórkach DU145 hodowanych w obecności CAF-CM. A) komórki kontrolne, B) komórki inkubowane z CAF-CM przez 48h, C) komórki inkubowane z CAF-CM przez 72h. Wyniki nieistotne statystycznie oznaczono jako ns. 49
- Rycina 12.** Aktywność kaspazy 3/7 w komórkach DU145 hodowanych w obecności CAF-CM przez 48h i 72h. Dokumentacja fotograficzna. Powiększenie 20x. 50
- Rycina 13.** Aktywacja ERK/AKT/p70 w komórkach HB-CLS-1 hodowanych w obecności CAF-CM. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). 51
- Rycina 14.** Aktywacja ERK/AKT/p70 w komórkach DU145 hodowanych w obecności CAF-CM. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). 52
- Rycina 15.** A) ekspresja białka całkowitego p53 oraz B) jego aktywnej formy (Ser15) w HB-CLS-1 hodowanych z CAF-CM przez 48h i 72h. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). Wyniki statystycznie nieistotne ( $p > 0,05$ ) oznaczono jako ns. 53
- Rycina 16.** A) poziom białka całkowitego p53 oraz B) jego aktywnej formy (Ser15) w DU145 hodowanych w obecności CAF-CM przez 48h i 72h. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). Wyniki statystycznie nieistotne ( $p > 0,05$ ) oznaczono jako ns. 55
- Rycina 17.** Aktywność metaboliczna HB-CLS-1 hodowanych w obecności CAF-CM oraz ciprofloksacyny w stężeniach IC10, IC50, IC90. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). Wyniki statystycznie nieistotne ( $p > 0,05$ ) oznaczono jako ns. 56
- Rycina 18.** Aktywność proliferacyjna HB-CLS-1 hodowanych w obecności CAF-CM oraz ciprofloksacyny w stężeniach IC10, IC50, IC90. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). Wyniki statystycznie nieistotne ( $p > 0,05$ ) oznaczono jako ns. 57
- Rycina 19.** Aktywność metaboliczna DU145 hodowanych w obecności CAF-CM oraz cisplatyny w stężeniach IC10, IC50, IC90. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). Wyniki statystycznie nieistotne ( $p > 0,05$ ) oznaczono jako ns. 58
- Rycina 20.** Aktywność proliferacyjna DU145 hodowanych w obecności CAF-CM oraz cisplatyny w stężeniach IC10, IC50, IC90. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). Wyniki statystycznie nieistotne ( $p > 0,05$ ) oznaczono jako ns. 59
- Rycina 21.** Wpływ wykluczenia FGF/IL-33 z CAF-CM na wrażliwość komórek HB-CLS-1 na ciprofloksacynę – Test MTT. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). Wyniki statystycznie nieistotne ( $p > 0,05$ ) oznaczono jako ns. 60
- Rycina 22.** Wpływ wykluczenia FGF/IL-33 z CAF-CM na wrażliwość komórek HB-CLS-1 na ciprofloksacynę – Test BrdU. Wyniki statystycznie nieistotne ( $p > 0,05$ ) oznaczono jako ns. 61

- Rycina 23.** Komórki HB-CLS-1 hodowane w obecności CAF-CM i/lub przeciwciałem neutralizującym FGF/IL-33. Obserwacja mikroskopowa, powiększenie 20x. FGF(-) – przeciwciała neutralizujące FGF. IL-33(-) – przeciwciała neutralizujące IL-33. 62
- Rycina 24.** Wpływ wykluczenia FGF/IL-33 z CAF-CM na wrażliwość komórek DU145 na cisplatinę – Test MTT. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). Wyniki statystycznie nieistotne ( $p > 0,05$ ) oznaczono jako ns. 63
- Rycina 25.** Wpływ wykluczenia FGF/IL-33 z CAF-CM na wrażliwość komórek DU145 na cisplatinę – Test BrdU. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). Wyniki statystycznie nieistotne ( $p > 0,05$ ) oznaczono jako ns. 64
- Rycina 26.** Komórki DU145 hodowane w obecności CAF-CM i przeciwciałem neutralizującym FGF/IL-33. Obserwacja mikroskopowa, powiększenie 20x. FGF(-) – przeciwciała neutralizujące FGF. IL-33(-) – przeciwciała neutralizujące IL-33. 65
- Rycina 27.** Obserwacja mikroskopowa morfologii komórek HB-CLS-1 w obecności ASCS-CM przez 48h i 72h. Mikroskop o odwróconej optyce, powiększenie 20x. 66
- Rycina 28.** Obserwacja mikroskopowa morfologii komórek DU145 w obecności ASCS-CM po 48h i 72h. Mikroskop o odwróconej optyce, powiększenie 20x. 67
- Rycina 29.** Żywotność komórek HB-CLS-1 po hodowli w obecności ASCS-CM przez 48h i 72h. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). Wyniki statystycznie nieistotne ( $p > 0,05$ ) oznaczono jako ns. 68
- Rycina 30.** Aktywność proliferacyjna komórek HB-CLS-1 po hodowli w obecności ASCS-CM przez 48h i 72h. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). 69
- Rycina 31.** Aktywność metaboliczna komórek DU145 po hodowli z ASCS-CM przez 48h i 72h. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). 70
- Rycina 32.** Aktywność proliferacyjna komórek DU145 po hodowli z ASCS-CM przez 48h i 72h. Wyniki statystycznie nieistotne ( $p > 0,05$ ) oznaczono jako ns. 71
- Rycina 33.** Aktywność metaboliczna komórek HB-CLS-1 hodowanych z ASCS-CM oraz ciprofloksacyny w stężeniach IC10, IC50, IC90. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). Wyniki statystycznie nieistotne ( $p > 0,05$ ) oznaczono jako ns. 72
- Rycina 34.** Aktywność proliferacyjna komórek HB-CLS-1 hodowanych z ASCS-CM oraz ciprofloksacyny w stężeniach IC10, IC50, IC90. Wyniki statystycznie nieistotne ( $p > 0,05$ ) oznaczono jako ns. 73

**Rycina 35.** Aktywność metaboliczna komórek DU145 hodowanych z ASCS-CM oraz cisplatyną w stężeniach IC10, IC50, IC90. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). Wyniki statystycznie nieistotne ( $p > 0,05$ ) oznaczono jako ns. 74

**Rycina 36.** Aktywność proliferacyjna komórek DU145 hodowanych z ASCS-CM oraz cisplatyną w stężeniach IC10, IC50, IC90. Gwiazdką oznaczono wyniki istotne statystycznie. 74

## Piśmiennictwo

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394–424.
3. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(2):87–108.
4. Soerjomataram I, Bray F. Planning for tomorrow: global cancer incidence and the role of prevention 2020–2070. *Nat Rev Clin Oncol.* 2021;18(10):663–72.
5. World Health Organization. The Global Cancer Observatory Poland, <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/616-poland-fact-sheets.pdf>, data wejścia 13.07.2023.
6. Peng S, Yang K, Chan WP, Wang Y, Lin L, Yen AM, et al. Impact of the COVID-19 pandemic on a population-based breast cancer screening program. *Cancer.* 2020;126(24):5202–5.
7. Alagoz O, Lowry KP, Kurian AW, Mandelblatt JS, Ergun MA, Huang H, et al. Impact of the COVID-19 Pandemic on Breast Cancer Mortality in the US: Estimates From Collaborative Simulation Modeling. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute.* 2021;113(11):1484–94.
8. Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. Vol. 15, *Nature Reviews Clinical Oncology.* Nature Publishing Group; 2018. p. 81–94.
9. National Cancer Institute at the National Institutes of Health. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/tumor-heterogeneity>, data wejścia 03.02.2023.
10. Tyner JW, Haderk F, Kumaraswamy A, Baughn LB, van Ness B, Liu S, et al. Understanding Drug Sensitivity and Tackling Resistance in Cancer. *Cancer Res.* 2022;82(8):1448–60.

11. Son B, Lee S, Youn H, Kim E, Kim W, Youn B. The role of tumor microenvironment in therapeutic resistance. *Oncotarget*. 2017;8(3):3933–45.
12. Arneth B. Tumor Microenvironment. *Medicina (Kaunas)*. 2019;56(1):15.
13. Zeng D, Wu J, Luo H, Li Y, Xiao J, Peng J, et al. Tumor microenvironment evaluation promotes precise checkpoint immunotherapy of advanced gastric cancer. *J Immunother Cancer*. 2021;9(8):e002467.
14. Yang YHK. Aging of mesenchymal stem cells: Implication in regenerative medicine. *Regen Ther*. 2018;9:120–2.
15. Papait A, Stefani FR, Cargnoni A, Magatti M, Parolini O, Silini AR. The Multifaceted Roles of MSCs in the Tumor Microenvironment: Interactions With Immune Cells and Exploitation for Therapy. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8.
16. Poggi A, Varesano S, Zocchi MR. How to Hit Mesenchymal Stromal Cells and Make the Tumor Microenvironment Immunostimulant Rather Than Immunosuppressive. *Front Immunol*. 2018;9.
17. Zhang L, Xiang J, Zhang F, Liu L, Hu C. MSCs can be a double-edged sword in tumorigenesis. *Front Oncol*. 2022;12.
18. Lazennec G, Lam PY. Recent discoveries concerning the tumor - mesenchymal stem cell interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2016;1866(2):290–9.
19. Haga H, Yan IK, Takahashi K, Wood J, Zubair A, Patel T. Tumour cell–derived extracellular vesicles interact with mesenchymal stem cells to modulate the microenvironment and enhance cholangiocarcinoma growth. *J Extracell Vesicles*. 2015;4(1):24900.
20. Li X, Fan Q, Peng X, Yang S, Wei S, Liu J, et al. Mesenchymal/stromal stem cells: necessary factors in tumour progression. *Cell Death Discov*. 2022;8(1):333.
21. Bhagat TD, von Ahrens D, Dawlaty M, Zou Y, Baddour J, Achreja A, et al. Lactate-mediated epigenetic reprogramming regulates formation of human pancreatic cancer-associated fibroblasts. *Elife*. 2019;8.

22. Brennen WN, Kisteman LN, Isaacs JT. Rapid selection of mesenchymal stem and progenitor cells in primary prostate stromal cultures. *Prostate*. 2016;76(6):552–64.
23. Zhao L, Hantash BM. TGF- $\beta$ 1 Regulates Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. 2011;127–41.
24. Atiya H, Frisbie L, Pressimone C, Coffman L. Mesenchymal Stem Cells in the Tumor Microenvironment. 2020;31–42.
25. Liu Q, Li J, Zhang X, Liu Y, Liu Q, Xiao L, et al. Human amniotic mesenchymal stem cells inhibit hepatocellular carcinoma in tumour-bearing mice. *J Cell Mol Med*. 2020;24(18):10525–41.
26. Levy O, Brennen WN, Han E, Rosen DM, Musabeyezu J, Safaee H, et al. A prodrug-doped cellular Trojan Horse for the potential treatment of prostate cancer. *Biomaterials*. 2016;91:140–50.
27. Kurniawati I, Liu MC, Hsieh CL, Do AD, Sung SY. Targeting Castration-Resistant Prostate Cancer Using Mesenchymal Stem Cell Exosomes for Therapeutic MicroRNA-let-7c Delivery. *Frontiers in Bioscience-Landmark*. 2022;27(9):256.
28. Greco KA, Franzen CA, Foreman KE, Flanigan RC, Kuo PC, Gupta GN. PLK-1 Silencing in Bladder Cancer by siRNA Delivered With Exosomes. *Urology*. 2016;91:241.e1-241.e7.
29. Parisi L, Rihs S, La Scala GC, Schnyder I, Katsaros C, Degen M. Discovery and characterization of heterogeneous and multipotent fibroblast populations isolated from excised cleft lip tissue. *Stem Cell Res Ther*. 2022;13(1):469.
30. Lendahl U, Muhl L, Betsholtz C. Identification, discrimination and heterogeneity of fibroblasts. *Nat Commun*. 2022;13(1):3409.
31. Galbo PM, Zang X, Zheng D. Molecular Features of Cancer-associated Fibroblast Subtypes and their Implication on Cancer Pathogenesis, Prognosis, and Immunotherapy Resistance. *Clinical Cancer Research*. 2021;27(9):2636–47.
32. Ringuette Goulet C, Bernard G, Tremblay S, Chabaud S, Bolduc S, Pouliot F. Exosomes Induce Fibroblast Differentiation into Cancer-Associated Fibroblasts through TGF $\beta$  Signaling. *Molecular Cancer Research*. 2018;16(7):1196–204.

33. Biffi G, Oni TE, Spielman B, Hao Y, Elyada E, Park Y, et al. IL1-Induced JAK/STAT Signaling Is Antagonized by TGF $\beta$  to Shape CAF Heterogeneity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Discov.* 2019;9(2):282–301.
34. de Vincenzo A, Belli S, Franco P, Telesca M, Iaccharino I, Botti G, et al. Paracrine recruitment and activation of fibroblasts by c-Myc expressing breast epithelial cells through the IGFs/IGF-1R axis. *Int J Cancer.* 2019;145(10):2827–39.
35. Geng X, Chen H, Zhao L, Hu J, Yang W, Li G, et al. Cancer-Associated Fibroblast (CAF) Heterogeneity and Targeting Therapy of CAFs in Pancreatic Cancer. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9.
36. Li X, Sun Z, Peng G, Xiao Y, Guo J, Wu B, et al. Single-cell RNA sequencing reveals a pro-invasive cancer-associated fibroblast subgroup associated with poor clinical outcomes in patients with gastric cancer. *Theranostics.* 2022;12(2):620–38.
37. Chen Y, McAndrews KM, Kalluri R. Clinical and therapeutic relevance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Clin Oncol.* 2021;18(12):792–804.
38. Kuo IY, Yang YE, Yang PS, Tsai YJ, Tzeng HT, Cheng HC, et al. Converged Rab37/IL-6 trafficking and STAT3/PD-1 transcription axes elicit an immunosuppressive lung tumor microenvironment. *Theranostics.* 2021;11(14):7029–44.
39. Monteran L, Erez N. The Dark Side of Fibroblasts: Cancer-Associated Fibroblasts as Mediators of Immunosuppression in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol.* 2019;10.
40. Wang L, Zhang F, Cui J, Chen L, Chen Y, Liu B. CAFs enhance paclitaxel resistance by inducing EMT through the IL-6/JAK2/STAT3 pathway. *Oncol Rep.* 2018;
41. Huang W, Zhang L, Yang M, Wu X, Wang X, Huang W, et al. Cancer-associated fibroblasts promote the survival of irradiated nasopharyngeal carcinoma cells via the NF- $\kappa$ B pathway. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 2021;40(1):87.
42. Steer A, Cordes N, Jendrossek V, Klein D. Impact of Cancer-Associated Fibroblast on the Radiation-Response of Solid Xenograft Tumors. *Front Mol Biosci.* 2019;6.

43. Joyce JA. Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2005;7(6):513–20.
44. Bejarano L, Jordão MJC, Joyce JA. Therapeutic Targeting of the Tumor Microenvironment. *Cancer Discov*. 2021;11(4):933–59.
45. Lenvatinib in Combination With Pembrolizumab Versus Treatment of Physician’s Choice in Participants With Advanced Endometrial Cancer (MK-3475-775/E7080-G000-309 Per Merck Standard Convention [KEYNOTE-775]) - Study Results - ClinicalTrials.gov, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT03517449>, data wejścia 25.02.2023.
46. Study of Safety and Efficacy of Novel Immunotherapy Combinations in Patients With Triple Negative Breast Cancer (TNBC). - Full Text View - ClinicalTrials.gov, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03742349>, data wejścia 25.02.2023.
47. Roma-Rodrigues C, Mendes R, Baptista P V., Fernandes AR. Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci*. 2019;20(4).
48. Immunization of Patients With Non Small Cell Lung Cancer (NSCLC), <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00793208>, data wejścia 18.06.2023.
49. First-in-human Safety and Tolerability of MP0317 in Patients With Relapsed/Refractory Advanced Solid Tumors, <https://clinicaltrials.gov/study/NCT00793208>, data wejścia 18.06.2023.
50. Bader JE, Voss K, Rathmell JC. Targeting Metabolism to Improve the Tumor Microenvironment for Cancer Immunotherapy. *Mol Cell*. 2020;78(6):1019–33.
51. Ahmed Ghallab. In vitro test systems and their limitations. 2013;12:1024–6.
52. Antunes N, Kundu B, Kundu SC, Reis RL, Correlo V. In Vitro Cancer Models: A Closer Look at Limitations on Translation. *Bioengineering*. 2022;9(4):166.
53. Schlatterer K, Esmaili A, Massa T, Apostolidis S, Chandra P. Applicability of a Host-mediated In Vivo/ In Vitro Model in Screening for the Carcinogenic Potential of Chemicals. *Anticancer Res*. 2022;42(9):4199–206.
54. Maj M, Kokocha A, Bajek A, Drewa T. The interplay between adipose-derived stem cells and bladder cancer cells. *Sci Rep*. 2018;8(1).



55. Paget S. Distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Cancer Metastasis Rev.* 1989;98–101.
56. Ma Z, Chen M, Yang X, Xu B, Song Z, Zhou B, et al. The Role of Cancer-associated Fibroblasts in Tumorigenesis of Gastric Cancer. *Curr Pharm Des.* 2018;24(28):3297–302.
57. Sun H, Wang X, Wang X, Xu M, Sheng W. The role of cancer-associated fibroblasts in tumorigenesis of gastric cancer. *Cell Death Dis.* 2022;13(10):874.
58. Hutton C, Heider F, Blanco-Gomez A, Banyard A, Kononov A, Zhang X, et al. Single-cell analysis defines a pancreatic fibroblast lineage that supports anti-tumor immunity. *Cancer Cell.* 2021;39(9):1227-1244.e20.
59. Kerdidani D, Aerakis E, Verrou KM, Angelidis I, Douka K, Maniou MA, et al. Lung tumor MHCII immunity depends on in situ antigen presentation by fibroblasts. *Journal of Experimental Medicine.* 2022;219(2).
60. Grauel AL, Nguyen B, Ruddy D, Laszewski T, Schwartz S, Chang J, et al. TGF $\beta$ -blockade uncovers stromal plasticity in tumors by revealing the existence of a subset of interferon-licensed fibroblasts. *Nat Commun.* 2020;11(1):6315.
61. Lavie D, Ben-Shmuel A, Erez N, Scherz-Shouval R. Cancer-associated fibroblasts in the single-cell era. *Nat Cancer.* 2022;3(7):793–807.
62. Costa A, Kieffer Y, Scholer-Dahirel A, Pelon F, Bourachot B, Cardon M, et al. Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. *Cancer Cell.* 2018;33(3):463-479.e10.
63. Kato T, Noma K, Ohara T, Kashima H, Katsura Y, Sato H, et al. Cancer-Associated Fibroblasts Affect Intratumoral CD8<sup>+</sup> and FoxP3<sup>+</sup> T Cells Via IL6 in the Tumor Microenvironment. *Clinical Cancer Research.* 2018;24(19):4820–33.
64. Shan T, Chen S, Chen X, Lin WR, Li W, Ma J, et al. Prometastatic mechanisms of CAF-mediated EMT regulation in pancreatic cancer cells. *Int J Oncol.* 2017;50(1):121–8.
65. Kashima H, Noma K, Ohara T, Kato T, Katsura Y, Komoto S, et al. Cancer-associated fibroblasts (CAFs) promote the lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2019;144(4):828–40.

66. Jaeschke A, Jacobi A, Lawrence MG, Risbridger GP, Frydenberg M, Williams ED, et al. Cancer-associated fibroblasts of the prostate promote a compliant and more invasive phenotype in benign prostate epithelial cells. 2020;
67. De C, Santos B. The role of lysosome alterations in bladder cancer progression. 2017.
68. Goulet CR, Champagne A, Bernard G, Vandal D, Chabaud S, Pouliot F, et al. Cancer-associated fibroblasts induce epithelial–mesenchymal transition of bladder cancer cells through paracrine IL-6 signalling. *BMC Cancer*. 2019;19(1):137.
69. Rojas A, Liu G, Coleman I, Nelson PS, Zhang M, Dash R, et al. IL-6 promotes prostate tumorigenesis and progression through autocrine cross-activation of IGF-IR. *Oncogene*. 2011;30(20):2345–55.
70. Rupert JE, Narasimhan A, Jengelley DHA, Jiang Y, Liu J, Au E, et al. Tumor-derived IL-6 and trans-signaling among tumor, fat, and muscle mediate pancreatic cancer cachexia. *Journal of Experimental Medicine*. 2021;218(6).
71. Weng YS, Tseng HY, Chen YA, Shen PC, Al Haq AT, Chen LM, et al. MCT-1/miR-34a/IL-6/IL-6R signaling axis promotes EMT progression, cancer stemness and M2 macrophage polarization in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer*. 2019;18(1):42.
72. Kumari N, Dwarakanath BS, Das A, Bhatt AN. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumor Biology*. 2016;37(9):11553–72.
73. Mao C, Ding Y, Xu N. A Double-Edged Sword Role of Cytokines in Prostate Cancer Immunotherapy. *Front Oncol*. 2021;11:688489.
74. Song X, Traub B, Shi J, Kornmann M. Possible Roles of Interleukin-4 and -13 and Their Receptors in Gastric and Colon Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021;22(2):727.
75. Choi MR, Sosman JA, Zhang B. The Janus Face of IL-33 Signaling in Tumor Development and Immune Escape. *Cancers (Basel)*. 2021;13(13).
76. Fournié JJ, Poupot M. The Pro-tumorigenic IL-33 Involved in Antitumor Immunity: A Yin and Yang Cytokine. *Front Immunol*. 2018;9:2506.

77. Feng C, Kou L, Yin P, Jing Y. Excessive activation of IL-33/ST2 in cancer-associated fibroblasts promotes invasion and metastasis in ovarian cancer. *Oncol Lett.* 2022;23(5):158.
78. Sun DY, Wu JQ, He ZH, He MF, Sun HB. Cancer-associated fibroblast regulate proliferation and migration of prostate cancer cells through TGF- $\beta$  signaling pathway. *Life Sci.* 2019;235:116791.
79. Shengqiang Yu, Yingjuan Jiang, Fengchun Wan, Jitao Wu, Zhenli Gao, Dongfu Liu. Immortalized Cancer-associated Fibroblasts Promote Prostate Cancer Carcinogenesis, Proliferation and Invasion. *Anticancer Res.* 2017;37(8).
80. Linxweiler J, Hajili T, Körbel C, Berchem C, Zeuschner P, Müller A, et al. Cancer-associated fibroblasts stimulate primary tumor growth and metastatic spread in an orthotopic prostate cancer xenograft model. *Sci Rep.* 2020;10(1):12575.
81. Jemaa A Ben, Bouraoui Y, Rais N Ben, Nouira Y, Oueslati R. Cytokine profiling identifies an interaction of IL-6 and IL-1 $\alpha$  to drive PSMA-PSA prostate clones. *Immunobiology.* 2016;221(12):1424–31.
82. Yang F, Guo Z, He C, Qing L, Wang H, Wu J, et al. Cancer-associated fibroblasts promote cell proliferation and invasion via paracrine Wnt/IL1 $\beta$  signaling pathway in human bladder cancer. *Neoplasma.* 2021;68(01):79–86.
83. Li Y, Li X, Deng M, Ye C, Peng Y, Lu Y. Cancer-Associated Fibroblasts Hinder Lung Squamous Cell Carcinoma Oxidative Stress-Induced Apoptosis via METTL3 Mediated m6A Methylation of COL10A1. *Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2022;2022:13.
84. Mañes S, Llorente M, Lacalle RA, Gómez-Moutón C, Kremer L, Mira E, et al. The Matrix Metalloproteinase-9 Regulates the Insulin-like Growth Factor-triggered Autocrine Response in DU-145 Carcinoma Cells. *Journal of Biological Chemistry.* 1999;274(11):6935–45.
85. Kumar Nalla A, Gorantla B, Gondi CS, Lakka SS, Rao JS. Targeting MMP-9, uPAR and Cathepsin B Inhibits Invasion and Migration and Activates Apoptosis in Prostate Cancer Cells. *Cancer Gene Ther.* 2010;17(9):599–613.

86. Shan G, Zhou X, Gu J, Zhou D, Cheng W, Wu H, et al. Downregulated exosomal microRNA-148b-3p in cancer associated fibroblasts enhance chemosensitivity of bladder cancer cells by downregulating the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and upregulating PTEN. *Cell Oncol (Dordr)*. 2021;44(1):45–59.
87. Guo Y, Pan W, Liu S, Shen Z, Xu Y, Hu L. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). *Exp Ther Med*. 2020;19(3):1997–2007.
88. Sugiura R, Satoh R, Takasaki T. ERK: A Double-Edged Sword in Cancer. ERK-Dependent Apoptosis as a Potential Therapeutic Strategy for Cancer. *Cells*. 2021;10(10):2509.
89. Liu F, Yang X, Geng M, Huang M. Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2018;8(4):552–62.
90. Tsai PJ, Lai YH, Manne RK, Tsai YS, Sarbassov D, Lin HK. Akt: a key transducer in cancer. *J Biomed Sci*. 2022;29(1).
91. Cao Z, Liao Q, Su M, Huang K, Jin J, Cao D. AKT and ERK dual inhibitors: The way forward? *Cancer Lett*. 2019;459:30–40.
92. Artemenko M, Zhong SSW, To SKY, Wong AST. Mini-review p70 S6 kinase as a therapeutic target in cancers: More than just an mTOR effector. *Cancer Lett*. 2022;535:215593.
93. Kharaziha P, Rodriguez P, Li Q, Rundqvist H, Bjö AC, Augsten M, et al. Targeting of distinct signaling cascades and cancer-associated fibroblasts define the efficacy of Sorafenib against prostate cancer cells. *Cell Death Dis*. 2012;3(1):e262.
94. Peng H, Xue R, Ju Z, Qiu J, Wang J, Yan W, et al. Cancer-associated fibroblasts enhance the chemoresistance of CD73+ hepatocellular carcinoma cancer cells via HGF-Met-ERK1/2 pathway. *Ann Transl Med*. 2020;8(14):856–856.
95. Peng M, Deng J, Zhou S, Xiao D, Long J, Zhang N, et al. Dual inhibition of pirarubicin-induced Akt and ERK activations by phenformin sensitively suppresses bladder cancer growth. *Front Pharmacol*. 2019;10:1159.

96. Kim SJ, Kim J, Jung H, Lee TJ, Lee K, Chang I. Phosphorylated p70S6K in noninvasive low-grade urothelial carcinoma of the bladder: correlation with tumor recurrence. *Asian J Androl.* 2014;16(4):611.
97. Wang Y, Zhou D, Chen S. SGK3 Is an Androgen-Inducible Kinase Promoting Prostate Cancer Cell Proliferation Through Activation of p70 S6 Kinase and Up-Regulation of Cyclin D1. *Molecular Endocrinology.* 2014;28(6):935–48.
98. Kumari S, Sharma V, Tiwari R, Maurya JP, Subudhi BB, Senapati D. Therapeutic potential of p53 reactivation in prostate cancer: Strategies and opportunities. *Eur J Pharmacol.* 2022;919:174807.
99. Wu G, Wang F, Li K, Li S, Zhao C, Fan C, et al. Significance of TP53 mutation in bladder cancer disease progression and drug selection. *PeerJ.* 2019;7:e8261.
100. Gottlieb TM, Leal JFM, Seger R, Taya Y, Oren M. Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene.* 2002;21(8):1299–303.
101. Vasan N, Baselga J, Hyman DM. A view on drug resistance in cancer. *Nature.* 2019;575(7782):299–309.
102. Ni Y, Zhou X, Yang J, Shi H, Li H, Zhao X, et al. The Role of Tumor-Stroma Interactions in Drug Resistance Within Tumor Microenvironment. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9.
103. Che Y, Wang J, Li Y, Lu Z, Huang J, Sun S, et al. Cisplatin-activated PAI-1 secretion in the cancer-associated fibroblasts with paracrine effects promoting esophageal squamous cell carcinoma progression and causing chemoresistance. *Cell Death Dis.* 2018;9.
104. Cheteh EH, Augsten M, Rundqvist H, Bianchi J, Sarne V, Egevad L, et al. Human cancer-associated fibroblasts enhance glutathione levels and antagonize drug-induced prostate cancer cell death. *Cell Death Dis.* 2017;8(6):e2848–e2848.
105. Long X, Xiong W, Zeng X, Qi L, Cai Y, Mo M, et al. Cancer-associated fibroblasts promote cisplatin resistance in bladder cancer cells by increasing IGF-1/ER $\beta$ /Bcl-2 signalling. *Cell Death Dis.* 2019;10(5):375.
106. Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(2):116–29.

107. Corn PG, Wang F, McKeehan WL, Navone N. Targeting Fibroblast Growth Factor Pathways in Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2013;19(21):5856–66.
108. Choi SC, Kim SJ, Choi JH, Park CY, Shim WJ, Lim DS. Fibroblast Growth Factor-2 and -4 Promote the Proliferation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells by the Activation of the PI3K-Akt and ERK1/2 Signaling Pathways. *Stem Cells Dev*. 2008;17(4):725–36.
109. Pecqueux C, Arslan A, Heller M, Falkenstein M, Kaczorowski A, Tolstov Y, et al. FGF-2 is a driving force for chromosomal instability and a stromal factor associated with adverse clinico-pathological features in prostate cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2018;36(8):365.e15-365.e26.
110. McNiel EA, Tschlis PN. Analyses of publicly available genomics resources define FGF-2-expressing bladder carcinomas as EMT-prone, proliferative tumors with low mutation rates and high expression of CTLA-4, PD-1 and PD-L1. *Signal Transduct Target Ther*. 2017;2(1):16045.
111. Knelson EH, Gaviglio AL, Nee JC, Starr MD, Nixon AB, Marcus SG, et al. Stromal heparan sulfate differentiates neuroblasts to suppress neuroblastoma growth. *J Clin Invest*. 2014;124.
112. de Aguiar RB, Parise CB, Souza CRT, Braggion C, Quintilio W, Moro AM, et al. Blocking FGF2 with a new specific monoclonal antibody impairs angiogenesis and experimental metastatic melanoma, suggesting a potential role in adjuvant settings. *Cancer Lett*. 2016;371(2):151–60.
113. Zhang M, Duffen JL, Nocka KH, Kasaian MT. IL-13 Controls IL-33 Activity through Modulation of ST2. *The Journal of Immunology*. 2021;207(12):3070–80.
114. He N, Kong Y, Lei X, Liu Y, Wang J, Xu C, et al. MSCs inhibit tumor progression and enhance radiosensitivity of breast cancer cells by down-regulating Stat3 signaling pathway. *Cell Death Dis*. 2018;9(10):1026.
115. Zhang G, Miao F, Xu J, Wang R. Mesenchymal stem cells from bone marrow regulate invasion and drug resistance of multiple myeloma cells by secreting chemokine CXCL13. *Bosn J Basic Med Sci*. 2019;20(2):209–17.

116. Skolekova S, Matuskova M, Bohac M, Toro L, Durinikova E, Tyciakova S, et al. Cisplatin-induced mesenchymal stromal cells-mediated mechanism contributing to decreased antitumor effect in breast cancer cells. *Cell Communication and Signaling*. 2016;14(1):4.
117. Maj M, Bajek A, Nalejska E, Porowinska D, Kloskowski T, Gackowska L, et al. Influence of Mesenchymal Stem Cells Conditioned Media on Proliferation of Urinary Tract Cancer Cell Lines and Their Sensitivity to Ciprofloxacin. *J Cell Biochem*. 2017;118(6):1361–8.

## Załącznik 1

**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 766/2019**

Bydgoszcz, 29.10.2019 r.

Działając na podstawie art.29 Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz.U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz.U.Nr 47 poz.480) oraz Zarządzeniem Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 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 ICH – GCP

**Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy**

(skład podano w załączeniu), na posiedzeniu w dniu **29.10.2019 r.** przeanalizowała wniosek, który złożyła kierownik badania:

**dr hab. Anna Bajek, prof. UMK**  
**Zakład Inżynierii Tkankowej**  
**Collegium Medicum w Bydgoszczy**

z zespołem w składzie

- mgr Karolina Balik, Karolina Kowalska,

w sprawie badania:

**„Wrażliwość komórek nowotworowych na substancje o działaniu przeciwnowotworowym w obecności rozpuszczalnych mediatorów syntetyzowanych przez komórki macierzyste - badanie in vitro.”**

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 posiedzenia (29.10.2019 r.) do końca 2020 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





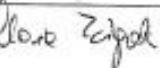
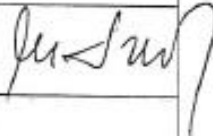
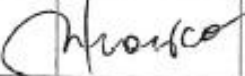
Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymuje:  
dr hab. Anna Bajek, prof. UMK  
Zakład Inżynierii Tkankowej  
Collegium Medicum w Bydgoszczy



**Lista obecności**  
**na posiedzeniu Komisji Bioetycznej**

w dniu 29.10.2019 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja/ Specjalizacja	Podpis
1.	Prof. dr hab. med. Karol Śliwka	Przewodniczący <i>medycyna sądowa</i>	
2.	Mgr prawa Joanna Poletek-Żygas	Z – ca przewodniczącego <i>prawniczka</i>	
3.	Prof. dr hab. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska	<i>pediatra, alergologia i gastroenterologia dziecięca</i>	
4.	Prof. dr hab. med. Anna Balcar-Boroń	<i>pediatria, nefrologia</i>	
5.	Prof. dr hab. med. Marek Grabiec	<i>położnictwo, ginekologia onkologiczna</i>	
6.	Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk	<i>chirurgia ogólna, transplantologia kliniczna</i>	
7.	Dr hab. n. med. Katarzyna Pawlak-Osińska, prof. UMK	<i>organizacja ochrony zdrowia, otolaryngologia</i>	
8.	Dr hab. n. med. Maria Kłopotka	<i>choroby wewnętrzne, gastroenterologia</i>	
9.	Ks. dr hab. Wojciech Szukalski, prof. UAM	<i>duchowny</i>	
10.	Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska	<i>pediatria, choroby płuc</i>	
11.	Mgr prawa Patrycja Brzezicka	<i>prawniczka</i>	
12.	Mgr farm. Aleksandra Adamczyk	<i>farmaceutka</i>	
13.	Mgr Lidia Iwińska-Tarczykowska	<i>pielęgniarska</i>	

## Załącznik 2

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 402/2021

Bydgoszcz, 15.06.2021 r.

Działając na podstawie art.29 ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz.U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 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 marca 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 ICH – GCP

### Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

(skład podano w załączeniu), na posiedzeniu w dniu 15.06.2021 r. przeanalizowała wniosek, który złożyła kierownik badania:

**dr hab. Anna Bajek, prof. UMK**

**Katedra Urologii i Andrologii, Zakład Inżynierii Tkankowej**

**Collegium Medicum w Bydgoszczy, UMK w Toruniu**

z zespołem w składzie

**mgr Karolina Balik**

w sprawie badania:

**„Mikrośrodowisko nowotworowe jako cel terapii personalizowanej. Analiza wpływu mediatorów syntetyzowanych przez fibroblasty związane z rakiem (CAFs) na komórki nowotworowe układu moczowo-płciowego.”**

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 (15.06.2021 r.) do końca 2024 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:

dr hab. Anna Bajek, prof. UMK

Katedra Urologii i Andrologii, Zakład Inżynierii Tkankowej

Collegium Medicum w Bydgoszczy, UMK w Toruniu

**Lista obecności**  
**na posiedzeniu Komisji Bioetycznej**  
**w dniu 15.06.2021 r.**

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja/ Specjalizacja	Podpis
1.	Prof. dr hab. n. med. Karol Śliwka	medycyna sądowa przewodniczący	
2.	Mgr prawa Joanna Połetek-Żygas	prawniczka zastępca przewodniczącego	
3.	Prof. dr hab. n. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska	pediatria, alergologia i gastroenterologia dziecięca	
4.	Prof. dr hab. n. med. Marek Grabiec	położnictwo, ginekologia onkologiczna	
5.	Prof. dr hab. n. med. Maria Kłopocka	choroby wewnętrzne, gastroenterologia	
6.	Prof. dr hab. n. 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 Adamczyk	farmaceutka	
13.	Mgr Lidia Iwińska-Tarczykowska	pielęgniarka	