

INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA WE WROCŁAWIU

POLSKA AKADEMIA NAUK

ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr inż. Joanna Jarosz

CHARAKTERYSTYKA SYNGENICZNYCH MODELI
PRZERZUTUJĄCEGO MYSIEGO RAKA PROSTATY
TRAMP-C1 I TRAMP-C2 ZE SZCZEGÓLNYM
UWZGLĘDNIENIEM ROLI UKŁADU
ODPORNOCIOWEGO I IL-33

PROMOTOR:

Prof. dr hab. Joanna Wietrzyk

Praca została zrealizowana

w Laboratorium Doświadczalnej
Terapii Przeciwnowotworowej

Wrocław, 2022

Chciała bym złożyć serdeczne podziękowania,

Profesor Joannie Wietrzyk za wsparcie okazane podczas prowadzonych przeze mnie badań, przekazaną wiedzę, możliwość rozwoju, okazaną cierpliwość i zaufanie oraz zaangażowanie w przygotowanie niniejszej rozprawy doktorskiej.

Dr Dianie Papiernik za wspólny czas podczas realizowania projektu, godziny dyskusji oraz pomoc w przygotowaniu ilustracji.

Wszystkim koleżankom i kolegom z Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej za pomoc, współpracę i możliwość pracy we wspierającym się zespole.

Moim najbliższym: rodzicom, mężowi oraz rodzeństwu za wiarę i wsparcie w okresie realizacji pracy.



Badania zostały zrealizowane w ramach projektu pt. *„Farmakoterapia śródbłonna naczyniowego i aktywacji płytek krwi zależna od prostacykliny, tlenku azotu i tlenku węgla – nowa strategia w zapobieganiu przerzutowości nowotworowej”* finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, Program Strategiczny **STRATEGMED**.

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE.....	8
SUMMARY.....	9
WYKAZ SKRÓTÓW.....	10
1. Wstęp.....	14
1.1. Charakterystyka nowotworów prostaty.....	18
1.1.1. Budowa mysiej i ludzkiej prostaty.....	18
1.1.2. Czynniki sprzyjające powstawaniu raka prostaty.....	18
1.1.3. Ocena stadium zaawansowania raka prostaty.....	20
1.1.4. Stan zapalny w progresji raka gruczołu krokowego.....	21
1.1.5. Mysie modele raka gruczołu krokowego in vivo.....	25
1.1.6. Model myszy TRAMP.....	27
1.1.7. Model linii komórkowych TRAMP-C1, TRAMP-C2, TRAMP-C3.....	27
1.2. Rola szlaku sygnałowego IL-33/ST2 w progresji nowotworowej.....	29
1.2.1. Budowa i mechanizm działania IL-33.....	29
1.2.2. Regulacja aktywności IL-33.....	32
1.2.3. Pronowotworowe działanie IL-33 na proliferację komórek i zdolność do przerzutowania.....	33
1.2.4. Przeciwnowotworowe działanie IL-33: proliferacja komórek i zdolność do przerzutowania.....	35
1.2.5. Wpływ IL-33 na mikrośrodowisko guza.....	36
1.2.6. Wpływ IL-33 na komórki układu immunologicznego.....	38
2. Założenia i cel pracy.....	44
3. Materiały i metody.....	45
3.1. Bufory wykorzystane do badań.....	45
3.2. Linie komórkowe i media hodowlane.....	45
3.3. Zwierzęta laboratoryjne.....	46

SPIS TREŚCI

3.4.	Metody In vivo	46
3.4.1.	Wszczepienie komórek nowotworowych w modelu ortotopowym.....	46
3.4.2.	Model dożylny	48
3.4.3.	Analiza wzrostu guza i przerzutowania	48
3.4.4.	Analiza perfuzji guza metodą obrazowania ultrasonograficznego	49
3.5.	Metody ex vivo	50
3.5.1.	Analiza parametrów morfologicznych krwi	50
3.5.2.	Analiza markerów limfocytów, makrofagów i monocytów za pomocą cytometrii przepływowej.	51
3.5.3.	Przygotowanie lizatów z guzów	53
3.5.4.	Oznaczenia profilu aminokwasowego w suchej kropli osocza	54
3.5.5.	Macierze cytokinowe.....	56
3.5.6.	Testy ELISA	58
3.5.7.	Macierze PCR.....	59
3.6.	Metody in vitro.....	63
3.6.1.	Test zahamowania proliferacji komórek nowotworowych.....	63
3.6.2.	Analiza poziomu ekspresji białek metodą western blot.....	64
3.6.3.	Przygotowanie lizatów komórkowych.....	64
3.6.4.	Western blot.....	65
3.6.5.	Przygotowanie białka IL-33.....	67
3.6.6.	Przygotowanie komórek do testów adhezji i migracji.....	67
3.6.7.	Test migracji	68
3.6.8.	Test adhezji do kolagenu i fibrynogenu.....	68
4.	Wyniki	70
4.1.	Badania in vivo	70
4.1.1.	Wzrost i potencjał przerzutowy komórek mysich linii gruczołu krokowego TRAMP-C1 i TRAMP-C2 in vivo.....	70
4.1.1.1	Model ortotopowy.....	70

SPIS TREŚCI

4.1.1.2	Model dożylny	71
4.1.2.	Analiza wybranych parametrów morfologicznych.....	72
4.1.3.	Ocena unaczynienia guza nowotworowego.....	75
4.1.4.	Analiza subpopulacji limfocytów we krwi myszy obarczonych mysimi rakami gruczołu krokowego	75
4.1.5.	Analiza subpopulacji limfocytów w śledzionie myszy obarczonych mysimi rakami gruczołu krokowego	78
4.1.6.	Analiza odsetka monocytów Ly6C ^{low} i LY6C ^{high} we krwi myszy obarczonych mysimi rakami gruczołu krokowego.....	80
4.1.7.	Analiza odsetka monocytów Ly6C ^{low} i LY6C ^{high} w śledzionie myszy obarczonych mysimi rakami gruczołu krokowego.....	81
4.1.8.	Analiza profilu cytokinowego u myszy obarczonych mysimi nowotworami gruczołu krokowego	82
4.1.8.1	Profil cytokinowy w osoczu	82
4.1.8.2	Profil cytokinowy w guzie nowotworowym.....	85
4.1.9.	Analiza ekspresji genów związanych z procesem inwazji i przerzutowania w tkance nowotworowej	87
4.1.10.	Analiza profilu aminokwasowego u myszy obarczonych mysim nowotworem gruczołu krokowego.	88
4.1.11.	Pomiar stężenia IL-33 w osoczu oraz tkance nowotworowej myszy obarczonych mysim rakiem gruczołu krokowego.....	89
4.1.12.	Pomiar stężenia wybranych chemokin w tkance nowotworowej myszy obarczonych mysim rakiem gruczołu krokowego.....	90
4.1.13.	Pomiar stężenia wybranych metaloproteinaz w tkance nowotworowej myszy obarczonych mysim rakiem gruczołu krokowego.....	91
4.1.14.	Ocena stopnia uszkodzenia śródbłonna naczyń krwionośnych w ortotopowym modelu mysich raków gruczołu krokowego.	92
4.2.	Badania in vitro	93
4.2.1.	Wrażliwość linii TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 na cytostatyki	93

SPIS TREŚCI

4.2.2. Ekspresja wybranych białek w komórkach mysiego raka gruczołu krokowego TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2.....	94
4.2.3. Wpływ IL-33 na migrację komórek linii mysiego raka gruczołu krokowego.	95
4.2.4. Wpływ IL-33 na adhezję komórek linii mysiego raka gruczołu krokowego.	96
5. Dyskusja.....	98
6. Wnioski.....	112
SPIS RYCIN I TABEL.....	133
SUPLEMENT.....	136

STRESZCZENIE

Modele zwierzęce są istotnymi narzędziami badawczymi wykorzystywanymi zarówno w badaniach podstawowych jak i badaniach przedklinicznych nowych leków. W związku z coraz większym rozwojem immunoterapii, szczególnie pożądane są modele dobrze odzwierciedlające obraz immunologiczny choroby nowotworowej. Dlatego celem niniejszej pracy była charakterystyka mysich syngenicznych modeli raka prostaty TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2, ze szczególnym uwzględnieniem układu odpornościowego.

W przeprowadzonych badaniach wykorzystywano ortotopowe podanie komórek nowotworowych. Model TRAMP-C2 charakteryzował się szybszym wzrostem guzów nowotworowych, lepszym przepływem krwi w guzie oraz większą liczbą przerzutów do węzłów chłonnych w stosunku do modelu TRAMP-C1. Wyższy potencjał przerzutowy linii TRAMP-C2 obserwowano również po dożylnym podaniu komórek do żyły ogonowej. Różny potencjał przerzutowy linii TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 sprawia, że modele te mogą być szczególnie przydatne w badaniach nad przerzutowaniem raka prostaty.

W trakcie rozwoju choroby nowotworowej u myszy zaszczepionych ortotopowo komórkami TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 zmiany w układzie odpornościowym, obserwowano w poziomach różnych czynników zapalnych oraz odsetku poszczególnych subpopulacji monocytów i limfocytów. Analiza poszczególnych subpopulacji limfocytów we krwi oraz śledzienie sugeruje, że wraz z rozwojem nowotworu przeciwnowotworowa działalność układu odpornościowego przeprogramowywana jest na działalność pronowotworową. Istotnie większe zmiany obserwowane są w modelu bardziej agresywnym – TRAMP-C2 co ukazuje szczególne znaczenie układu immunologicznego w przerzutowaniu raka prostaty.

Istotne różnice pomiędzy nowotworami TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 obserwowano również w poziomie IL-33, która odgrywa niezwykle istotne znaczenie w homeostazie immunologicznej. W badanych modelach, wyższe stężenia IL-33 w surowicy korelowały z wyższą agresywnością nowotworu. Dalsze badania *in vitro* pokazały, że efekty wywołane przez IL-33 mogą być zależne od jej stężenia.

SUMMARY

Mouse models of cancer are very important tools to investigate basic and preclinical research of new therapies. In relation to development of immunotherapy, models that mimic well the cancer immunology observed in the clinic are most wanted. The main aim of this study was to characterize TRAMP-C1 and TRAMP-C2 syngeneic metastatic murine prostate cancer models with particular emphasis on the role of the immune system.

In the *in vivo* studies, orthotopic inoculation of cancer cells was used. The orthotopic TRAMP-C2 model is characterized by a rapid growth of tumors, better blood flow in the tumor and increased metastases to the lymph nodes. Higher metastatic potential of TRAMP-C2 cell line is also observed after intravenous inoculation of cancer cells into the tail vein. The different metastatic potential of the TRAMP-C1 and TRAMP-C2 cell lines makes these models particularly useful in studies on prostate cancer metastasis.

During cancer progression in orthotopic models of TRAMP-C1 and TRAMP-C2, changes in the immune landscape were observed in the levels of inflammatory factors and the percentage of individual subpopulations of monocytes and lymphocytes. The analysis of subpopulations of lymphocytes in the blood and spleen suggests that the anti-cancer activity of the immune system is reprogrammed to pro-neoplastic activity with the development of cancer. Significantly larger changes were noted in the more aggressive model - TRAMP-C2, these results show that changes in the immune system may be of particular importance in prostate cancer metastasis.

Significant differences between TRAMP-C1 and TRAMP-C2 orthotopic models were observed in the level of IL-33, which plays an important role in immune homeostasis. In the tested models, higher serum concentrations of IL-33 correlated with higher tumor aggressiveness. Further *in vitro* studies showed that the effect induced by IL-33 may be concentration dependent.

WYKAZ SKRÓTÓW

α -SMA	<i>ang. α-smooth muscle actin</i> , α -aktyna mięśni gładkich
ADT	<i>ang. androgen deprivation therapy</i> , terapia deprivacji androgenów
AP-1	<i>ang. activator protein 1</i> , białko aktywujące-1
ATCC	<i>ang. American Type Culture Collection</i> , Amerykańska kolekcja hodowli komórkowych
ATP	<i>ang. adenosine triphosphate</i> , adenozyntrifosforan
BSA	<i>ang. bovine serum albumin</i> , albumina surowicy wołowej
CAFs	<i>ang. cancer associated fibroblasts</i> , fibroblasty związane z nowotworami
CBM	<i>ang. chromatin binding motif</i> , motyw wiązania chromatyny
CCL	<i>ang. chemokine (C-C motif) ligand 2</i> , chemokina z motywem C-C
<i>Cdh1</i>	<i>ang. cadherin 1</i> , kadheryna 1
CDK	<i>ang. cyclin-dependent kinase</i> , kinaza zależna od cyklin
<i>Cdkn2a</i>	<i>ang. cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i> , zależny od cykliny inhibitor kinazy 2A,
CX3CL1	<i>ang. chemokine (C-X3-C-motif) ligand 1</i> , fraktalkina
CXCL	<i>ang. chemokine (C-X-C motif) ligand</i> , chemokina z motywem C-X-C
CXCR4	<i>ang. C-X-C chemokine receptor 4</i> , receptor chemokinowy
ECM	<i>ang. extracellular matrix</i> – macierz zewnątrzkomórkowa
EGF	<i>ang. epidermal growth factor</i> , naskórkowy czynnik wzrostu
EMT	<i>ang. epithelial to mesenchymal transition</i> , przejście nabłonkowo-mezenchymalne
ER	<i>ang. estrogen receptor</i> – receptor estrogenowy

WYKAZ SKRÓTÓW

ET-1	<i>ang. endothelin 1</i> , endotelina 1
FBS	<i>ang. fetal bovine serum</i> , bydlęca surowica płodowa
FOXP3 ⁺	<i>ang. forkhead box P</i> , czynnik transkrypcyjny z rodziny forkhead
GATA3	<i>ang. GATA binding protein 3</i> , czynnik transkrypcyjny GATA3
HDI	<i>ang. human Development Index</i> , poziom rozwoju społecznego
HMGI (Y)	<i>ang. high-mobility group protein I (Y)</i> , białko o wysokiej mobilności grupy I (Y)
ICAM-1	<i>ang. intercellular adhesion molecule 1</i> , międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna
IFN- γ	<i>ang. interferon gamma</i> , interferon gamma
IGFBP-3	<i>ang. insulin-like growth factor-binding protein 3</i> , białko wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu
IGF-I	<i>ang. insulin-like growth factor</i> , insulinopodobny czynnik wzrostu 1
IL-33	<i>ang. interleukin-33</i> , interleukina-33
IL-33 _{FL}	<i>ang. full-length interleukin-33</i> , IL-33 o pełnej długości
ILC2	<i>ang. innate lymphoid type-2 cells</i> , wrodzone komórki limfoidalne typu 2
iNKT	<i>ang. invariant natural killer T-cell</i> , niezmiennie komórki NKT
iNOS	<i>ang. nitric oxide synthase</i> , syntaza tlenku azotu
MDSC	<i>ang. myeloid-derived suppressor cells</i> , komórki supresyjne pochodzące z linii mieloidalnej
MHC	<i>ang. major histocompatibility complex</i> , główny układ zgodności tkankowej
MMPs	<i>ang. matrix metalloproteinase</i> , metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej
mTORC1	<i>ang. mammalian target of rapamycin kinase complex 1</i> , kompleks 1 kinazy

WYKAZ SKRÓTÓW

	mTOR
NF- κ B	<i>ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> , czynnik jądrowy κ B
NK	<i>ang. natural killer</i> , komórki NK
NKT	<i>ang. natural killer T-cells</i> , komórki NKT
NLRP3	<i>ang. NLR family, pyrin domain containing 3</i> , receptory NOD-podobne
NLS	<i>ang. nuclear localization sequence</i> , sekwencja lokalizacji jądrowej
NSCLC	<i>ang. non-small-cell lung cancer</i> , niedrobnokomórkowy rak płuca
nSMase2	<i>ang. neutral sphingomyelinase 2</i> , neutralna sfingomielinaza 2
PARP	<i>ang. poly (ADP-ribose) polymerase</i> , polimeraza poli ADP-rybozy
PB	<i>ang. probasin</i> , probazyna
PD-1	<i>ang. programmed death receptor</i> , receptor programowanej śmierci 1
PDGF-C	<i>ang. platelet-derived growth factor C</i> , płytkopochodny czynnik wzrostu C
PDGFR	<i>ang. platelet-derived growth factor receptor</i> , receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu
PIN	<i>ang. prostatic intraepithelial neoplasia</i> , śród nabłonkowa neoplazja stercza
PPAR γ	<i>ang. peroxisome proliferator-activated receptorγ</i> , proliferatory peroksysomów gamma
PSA	<i>ang. prostate-specific antigen</i> , swoisty antygen gruczołu krokowego
ROS	<i>ang. reactive oxygen species</i> , reaktywne formy tlenu
S100A8	<i>ang. calcium-binding protein A8</i> , białko wiążące wapń A8
SPARC	<i>ang. secreted protein acidic and rich in cysteine</i> , kwaśne białko bogate w cysteine
sST2	<i>ang. soluble ST2</i> , rozpuszczalna forma ST2

WYKAZ SKRÓTÓW

ST-2	<i>ang. supression of tumorigenicity</i> , białko tłumienia rakotwórczości
SV40	<i>ang. simian virus 40</i> , małpi wirus 40
TAMs	<i>ang. tumor associated macrophages</i> , makrofagi związane z nowotworem
TANs	<i>ang. tumor associated neutrophils</i> , neutrofile związane z nowotworem
TGF- β	<i>ang. tumor growth factor β</i> , transformujący czynnik wzrostu beta
TIC	<i>ang. tumor-initiating cells</i> , komórki inicjujące nowotwór
Tim 3	<i>ang. T cell immunoglobulin and mucin domain 3</i> , transbłonowa immunoglobulina komórek T i domena mucyny 3
Timp	<i>ang. tissue inhibitor of metalloproteinases</i> , tkankowy inhibitor metaloproteinaz
TME	<i>ang. tumor microenvironment</i> , mikrośrodowisko guza
TNF- α	<i>ang. tumor necrosis factor α</i> , czynnik martwicy nowotworów α
TRAMP	<i>ang. transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate</i> transgeniczny gruczolakorak prostaty myszy
VEGF	<i>ang. vascular endothelial growth factor</i> , czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego
VEGFR	<i>ang. vascular endothelial growth factor receptor</i> , receptor dla czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego
WHO	<i>ang. World Health Organization</i> , Światowa Organizacja Zdrowia

1. Wstęp

Nowotworami określamy choroby, które charakteryzują się niekontrolowanym, nadmiernym wzrostem grupy komórek nazywanych komórkami nowotworowymi. Podczas gdy komórki prawidłowe są pod ścisłą kontrolą gospodarza poprzez sygnały determinujące wzrost, różnicowanie oraz śmierć, komórki nowotworowe rozwinęły pewien stopień autonomii od tych sygnałów. Dominującą teorią jest, że komórki prawidłowe przekształcane są w komórki nowotworowe na drodze zmian na poziomie molekularnym, komórkowym i biochemicznych, a dla każdej komórki istnieje skończona liczba możliwości doprowadzających do tych przekształceń. Zmiany i mutacje w genomie komórki doprowadzają do zakłóceń w równowadze komórkowej pomiędzy proliferacją, a spoczynkiem w wyniku czego niekontrolowane dzielące się komórki tworzą nowotwór [1].

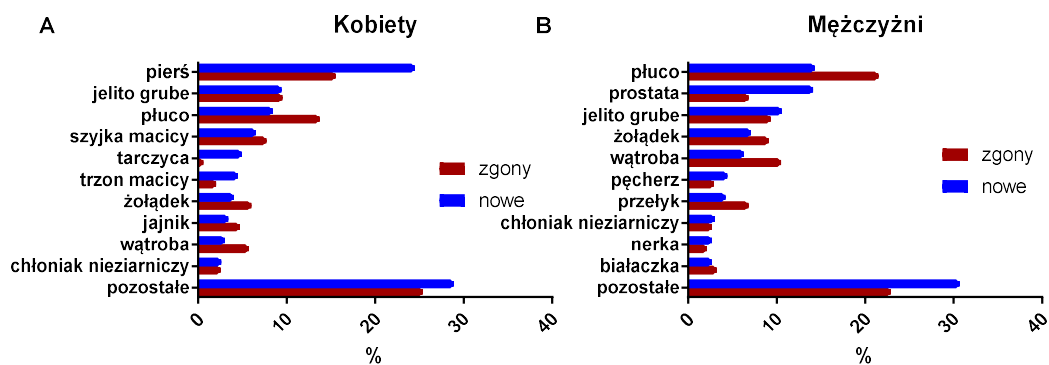
Wśród nowotworów wyróżnić możemy nowotwory łagodne, które ograniczają się jedynie do pierwotnego miejsca występowania, oraz złośliwe. Nowotwory złośliwe charakteryzują się zdolnością do inwazji otaczających tkanek oraz za pomocą naczyń krwionośnych i limfatycznych do tkanek odległych. Wśród nowotworów złośliwych największą grupę stanowią guzy łagodne takie jak raki i mięsaki, istnieją jednak nowotwory nie tworzące zwartych struktur do których zaliczamy białaczki [2].

Nowotwory są aktualnie jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie. Zgodnie z danymi Światowej Organizacji Zdrowia (*ang. World Health Organization, WHO*) w roku 2020 nowotwory były przyczyną blisko 10 milionów zgonów. Na całym świecie około 1 na 6 zgonów jest spowodowany nowotworami złośliwymi [3]. Wzrastające liczby zachorowalności oraz zgonów z powodu chorób nowotworowych są związane głównie ze starzeniem się społeczeństwa oraz zmianami w rozpowszechnieniu i rozmieszczeniu głównych czynników ryzyka raka [4]. Do tego stanu rzeczy znacząco przyczynił się rozwój społeczno-gospodarczy. Zgodnie z aktualnymi danymi za 80-90% przypadków nowotworów złośliwych odpowiadają zewnętrzne czynniki środowiskowe. Wzrost średniej długości życia, zła dieta, siedzący styl życia, stres, wszelkiego rodzaju używki oraz zanieczyszczenie środowiska spowodowały, że w wielu krajach to nowotwory są główną przyczyną śmierci [5] [6].

WSTĘP

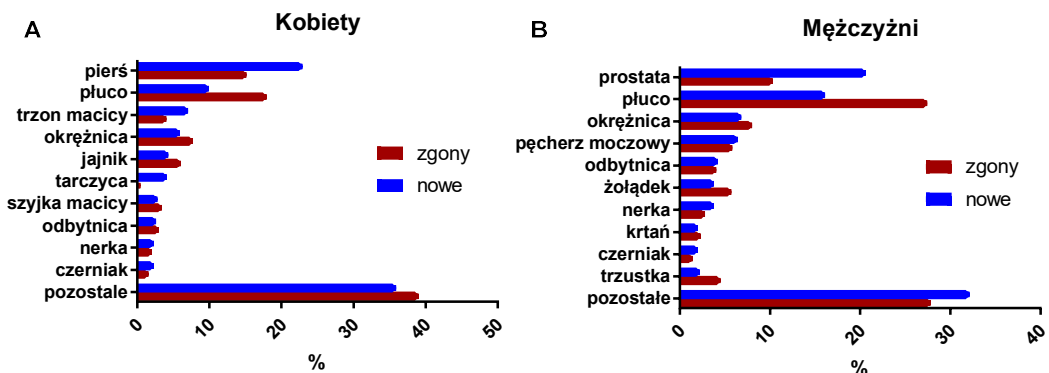
Do najczęstszych nowotworów na świecie wśród kobiet zaliczamy raka piersi, który jest co 4 diagnozowanym nowotworem odpowiedzialnym za 15,5% zgonów wywołanych chorobą nowotworową u kobiet. Kolejne najczęściej diagnozowane nowotwory u kobiet wywodzą się z takich narządów jak: wątroba, jajnik, żołądek, trzon macicy, tarczycza, szyjka macicy, płuco oraz jelito grube (Rycina 1.1 A). W roku 2020 na świecie zdiagnozowano aż 9,2 miliona nowych przypadków nowotworów oraz odnotowano 4,4 miliona zgonów w grupie kobiet. Wyższe statystyki zachorowań obserwowane są jednak wśród mężczyzn, u których w roku 2018 zdiagnozowano aż 10,1 miliona nowych przypadków i odnotowano 5,5 miliona zgonów spowodowanych chorobą nowotworową. W grupie mężczyzn najczęściej diagnozowanymi nowotworami są: rak płuca, prostaty, jelita grubego, żołądka oraz wątroby (Rycina 1.1 B). Rak płuc jest też najczęstszą przyczyną zgonów w grupie mężczyzn i odpowiada za ponad 20% zgonów. Analizując statystyki dla poszczególnych regionów obserwujemy znaczne różnice pomiędzy krajami o różnym poziomie rozwoju społecznego (*ang. human development index, HDI*). Rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem kobiet zarówno w krajach rozwiniętych jak i rozwijających się. Znaczne różnice obserwowane są jednak w liczbie zachorowań, podczas gdy w regionach o wysokim i bardzo wysokim HDI w 2020 roku odnotowano 55,9 nowych zachorowań na 100000 mieszkańców, to w regionach o średnim i niskim HDI zdiagnozowano zaledwie 29,7 nowych przypadków. Mimo tak znacznych różnic w liczbie nowo diagnozowanych przypadków nowotworu piersi liczba zgonów jest zbliżona. W krajach o wysokim i bardzo wysokim HDI kolejnym najczęściej występującym nowotworem jest rak jelita grubego, w krajach uboższych natomiast drugie miejsce zajmuje rak szyjki macicy. Podobne tendencje obserwowane są w grupie mężczyzn, u których najczęściej występującymi nowotworami są rak prostaty i płuca. W regionach o średnim i niskim HDI odnotowano 11,3 nowych przypadków raka prostaty na 100000 mieszkańców, podczas gdy w regionach o wysokim i bardzo wysokim HDI odnotowano aż 37,5 zachorowań/100000 mieszkańców. Podobnie jak w przypadku raka piersi, także w przypadku raka prostaty mimo znacznych różnic w liczbie nowych przypadków, liczba zgonów spowodowana tym nowotworem w bogatych i biednych regionach świata jest zbliżona [4].

WSTĘP



Rycina 1.1 Rozkład nowych przypadków oraz zgonów dla najczęstszych nowotworów na świecie w roku 2020 wśród (A) kobiet i (B) mężczyzn. Opracowanie własne na podstawie: *Global cancer statistics 2020* [4].

W Polsce w roku 2019 odnotowano ponad 82 tysiące nowych przypadków nowotworów złośliwych zarówno wśród kobiet jak i mężczyzn, jednak w grupie mężczyzn śmiertelność była znacznie wyższa – 54370 przypadków, podczas gdy śmiertelność u kobiet wyniosła – 45954 przypadków. Podobnie jak na świecie, także w Polsce wśród kobiet najwyższy współczynnik zachorowań odnotowano dla nowotworu piersi. Przyczyną największej ilości zgonów zarówno w grupie kobiet jak i mężczyzn był nowotwór płuc, który był przyczyną śmierci blisko 28% mężczyzn oraz blisko 18% kobiet chorych na nowotwory. Wśród mężczyzn najczęściej diagnozowane były nowotwory prostaty, płuca, okrężnicy, pęcherza moczowego, odbytnicy i żołądka (Rycina 1.2 B) [7].



Rycina 1.2 Rozkład nowych przypadków oraz zgonów dla najczęstszych nowotworów w Polsce w roku 2019 wśród (A) kobiet i (B) mężczyzn. Opracowanie własne na podstawie: *Nowotwory złośliwe w Polsce w 2019 roku* [7].

WSTĘP

Nowotwory są złożonymi strukturami, na które składają się komórki nowotworowe oraz mikrośrodowisko guza (*ang. tumor microenvironment, TME*) utworzone z sieci różnych komórek i substancji pozakomórkowych. Wśród komórek budujących mikrośrodowisko guza znajdują się komórki śródbłonka, fibroblasty oraz liczne komórki układu odpornościowego: subpopulacje limfocytów T i B, komórki NK (*ang. natural killer*), neutrofile, komórki dendrytyczne, niedojrzałe komórki pochodzenia mieloidalnego (*ang. myeloid derived suppressor cells, MDSC*), a także makrofagi typu M1 i M2. Bezpośrednia i pośrednia komunikacja pomiędzy komórkami nowotworowymi, a komórkami mikrośrodowiska jest nieodzownym elementem procesu nowotworzenia [8]. Istotną rolę w tej komunikacji pełnią cytokiny wytwarzane zarówno przez komórki nowotworowe jak komórki mikrośrodowiska guza. Cytokiny regulują kluczowe procesy takie jak proliferacja, różnicowanie, adhezja, migracja oraz aktywacja komórek odpornościowych. W zależności od równowagi cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych, ich względnych stężeń, ekspresji odpowiednich dla nich receptorów oraz stanu aktywacji komórek mikrośrodowiska, cytokiny mogą modulować odpowiedź przeciwnowotworową [9].

W prezentowanej rozprawie doktorskiej dokonano charakterystyki syngenicznych modeli raka prostaty TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2. Oba modele zostały wyprowadzone z guzów transgenicznych myszy TRAMP (*ang. transgenic adenocarcinoma mouse prostate, TRAMP*) spontanicznie rozwijających nowotwór prostaty. Mimo wspólnego pochodzenia linie te różnią się tempem wzrostu oraz zdolnością do tworzenia przerzutów nowotworowych [10] [11]. Dzięki wykorzystaniu syngenicznego modelu ortotopowego możliwe było bliższe poznanie znaczenia roli układu immunologicznego w rozwoju i przerzutowaniu mysiego raka prostaty. Naszą szczególną uwagę zwróciła interleukina-33 (*ang. interleukin-33, IL-33*) – cytokina którą po raz pierwszy opisano w roku 1999 [12], a w 2005 została zidentyfikowana jako członek rodziny IL-1 [13]. Jako silny modulator mikrośrodowiska guza odgrywa ona istotną rolę w rozwoju nowotworu. Zgodnie z aktualną wiedzą, IL-33 może zarówno promować jak i hamować rozwój nowotworu. IL-33 promuje wzrost nowotworu oraz przerzutowanie poprzez przebudowę mikrośrodowiska guza, polaryzację makrofagów w kierunku makrofagów M2, aktywację komórek immunosupresyjnych oraz indukcję angiogenezy. Przeciwnowotworowy wpływ IL-33 obserwowany jest przede wszystkim w aktywacji komórek odpornościowych typu Th1 [14].

WSTĘP

1.1. Charakterystyka nowotworów prostaty

1.1.1. Budowa mysiej i ludzkiej prostaty

Prostata (gruczoł krokowy) jako dodatkowy gruczoł układu rozrodczego męskiego występuje jedynie u ssaków. Mysia i ludzka prostata wykazują znaczne podobieństwa pod kątem embriologicznym, komórkowym oraz molekularnym. Znaczne różnice w budowie tego gruczołu obserwowane są u tych dwóch gatunków w architekturze tkanek oraz morfologii [15]. Dodatkowo, podczas gdy rak prostaty jest jednym z najczęściej występujących nowotworów wśród mężczyzn, u myszy nowotwór ten rozwija się spontanicznie niezwykle rzadko [16].

Mysia prostata składa się z czterech płatów (przedniego, grzbietowego, brzuszego oraz bocznego). Nabłonek wyściełający wszystkie płaty składa się z komórek wydzielniczych, poniżej których znajdują się komórki podstawne oraz niewielkie ilości komórek neuroendokrynych. Płaty mysiej prostaty pokryte są błoną zawierającą tkankę tłuszczową, naczynia krwionośne oraz nerwy. Każdy z płatów charakteryzuje się inną histologią [17]. W przeciwieństwie do mysiej prostaty, ludzki gruczoł krokowy jest pojedynczym gruczołem w kształcie piramidy z różnymi strefami histologicznymi (strefa obwodowa, przejściowa i centralna). Analogicznie jak u myszy, nabłonek ludzkiej prostaty składa się z komórek wydzielniczych, podstawnych i neuroendokrynych. Zrąb ludzkiego gruczołu korkowego składa się głównie z komórek mięśni gładkich oraz fibroblastów, naczyń krwionośnych i nerwów [17].

Chociaż anatomicznie i histologicznie mysia prostata różni się od ludzkiej, istnieją obszerne dowody na to, że takie same zmiany genetyczne do jakich dochodzi w procesie nowotworzenia w ludzkim gruczole krokowym mogą prowadzić do progresji nowotworu w mysiej prostacie [18].

1.1.2. Czynniki sprzyjające powstawaniu raka prostaty

Jednym z głównych czynników ryzyka raka prostaty jest obciążenie genetyczne. Prawdopodobieństwo wystąpienia raka gruczołu krokowego wzrasta diametralnie, jeżeli w rodzinie występował ten typ nowotworu, podobnie jak w przypadku nowotworów piersi, jajnika, pęcherza moczowego i czerniaka [19]. W rodzinach około 20% pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem prostaty występował ten typ nowotworu.

WSTĘP

W wielu badaniach potwierdzono, iż istotne znaczenie w dziedziczeniu raka prostaty ma gen *HOXB13*, którego mutacja G84E jest często spotykana w rodzinach, w których występuje dziedziczny rak prostaty [20] [21]. Uważa się również, że istotne znaczenie w dziedzicznym raku prostaty odgrywa chromosom X, który zawiera receptor androgenowy [22].

Równie istotne znaczenie ma wiek, prawdopodobieństwo wystąpienia raka prostaty znacznie wzrasta po 50 roku życia. Ponad 80% nowych przypadków diagnozowanych jest u pacjentów powyżej 65 roku życia [23].

Częstość występowania raka prostaty jest różna w zależności od pochodzenia etnicznego. W Stanach Zjednoczonych najmniejszą zachorowalność oraz śmiertelność obserwuje się u Indian i osób pochodzących z Azji, wyższe odsetki obserwowane są natomiast w populacji rasy białej, a najwyższy współczynnik zachorowalności i śmiertelności odnotowuje się wśród mężczyzn pochodzenia afroamerykańskiego [24] [25]. Śmiertelność spowodowana rakiem prostaty jest aż o 67% wyższa u Afroamerykanów w stosunku do mężczyzn rasy białej [26]. Ta ogromna dysproporcja może być podyktowana zarówno warunkami społeczno-ekonomicznymi wynikającymi z gorszej opieki zdrowotnej, jak i czynnikami biologicznymi. U Afroamerykanów częściej występuje wariant chromosomu 8q24 związany ze zwiększonym ryzykiem raka prostaty [27]. W tej grupie etnicznej zaobserwowano również wysoki wskaźnik zmienności genów hamujący wzrost guza, takich jak *EphB2* [28] oraz regulujących apoptozę, takich jak *BCL2* [29].

Wpływ androgenów na powstawanie i progresję raka gruczołu krokowego potwierdzono zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo*. W modelach zwierzęcych wykazano, że androgeny sprzyjają zarówno powstawaniu guzów, jak i powstawaniu przerzutów. Po pozbawieniu androgenów obserwowano natomiast regresję guza [30] [31]. W klinice terapia deprivacji androgenów (*ang. androgen deprivation therapy*, ADT) jest standardowym leczeniem stosowanym z zaawansowanym raku prostaty [30] [31] [32].

Niezwykle istotne są również czynniki środowiskowe takie jak dieta, aktywność fizyczna, używki oraz przyjmowane leki. Badania przeprowadzone z udziałem imigrantów przenoszących się do krajów uprzemysłowionych obrazują jak duże

WSTĘP

znaczenie ma styl życia i żywienie w kontekście raka prostaty. Zapadalność na nowotwory prostaty u Afroamerykanów mieszkających w USA była aż 40 krotnie wyższa w stosunku do mężczyzn mieszkających w Afryce [33]. Analogiczne wyniki obserwowano dla Azjatów, gdzie odnotowano 16-krotny wzrost liczby przypadków wśród mężczyzn mieszkających w USA w stosunku do mężczyzn mieszkających w Azji [34].

Niektóre produkty spożywcze takie jak czerwone mięso [35], tłuszcz pochodzenia zwierzęcego [36], produkty mleczne [37] związane są ze zwiększonym ryzykiem zachorowalności na nowotwór prostaty. Natomiast spożywanie warzyw kapustnych takich jak brokuł, brukselka, kalafior czy kapusta zmniejsza prawdopodobieństwo wystąpienia raka prostaty [38]. Również pomidory, a głównie zawarty w nich likopen, związane są ze zmniejszonym ryzykiem zapadalności na nowotwór prostaty. Likopen, oprócz swojego działania antyoksydacyjnego, działa również na receptory androgenowe odwracając efekt wywołany przez dihydrotestosteron oraz hamuje stymulację insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (*ang. insulin-like growth factor 1*, IGF-1) [39].

1.1.3. Ocena stadium zaawansowania raka prostaty

Złośliwa transformacja gruczołu krokowego przebiega wieloetapowo, rozpoczynając się od śród nabłonkowej neoplazji gruczołu krokowego (*ang. prostatic intraepithelial neoplasia*, PIN), po której może rozwijać się nowotwór, nabywający w późniejszym czasie zdolności do tworzenia przerzutów miejscowych i odległych [40].

System określania stadium zaawansowania nowotworu TNM (*ang. tumor, node, metastases*) jest stosowany na całym świecie. Jedną z najnowszych aktualizacji systemu wprowadziła wiele zmian w tej klasyfikacji [41].

System oceny stadium zaawansowania raka prostaty oparty jest na 5 kluczowych informacjach:

- Cecha T (*ang. tumor*) określa rozrost guza pierwotnego oraz jego ewentualne nacieki na sąsiadujące tkanki i narządy. Istnieją dwa rodzaje klasyfikacji tej cechy: kliniczna (cT) oparta na badaniu fizycznym, biopsji i różnych rodzajach obrazowania, oraz patologiczna (pT) w ramach której badany jest guz po operacyjnym wycięciu.

WSTĘP

- Cecha N (*ang. node*) określa stopień rozprzestrzenienia się komórek nowotworowych w obrębie lokalnych węzłów chłonnych.

- Cecha M (*ang. metastases*) określa stopień rozprzestrzenienia się komórek nowotworowych do innych tkanek i narządów (przerzuty odległe).

- Poziom swoistego antygenu gruczołu krokowego (*ang. prostate-specific antygen, PSA*) w momencie diagnozy.

- Klasyfikacja Gleasona (wg. skali Gleasona) – określa stopień złośliwości nowotworu w badaniu histopatologicznym. Stopień złośliwości oceniany jest oddzielnie dla płata lewego i prawego i punktowany od 1 (rak wysoce zróżnicowany) do 5 (rak niezróżnicowany).

Podczas oceny do każdej cechy T, N oraz M przyporządkowywana jest liczba mówiąca o stadium zaawansowania nowotworu. Po połączeniu tych danych wraz z klasyfikacją Gleasona oraz poziomem PSA uzyskuje się dane do określenia stadium zaawansowania nowotworu prostaty. W poniższej tabeli (Tabela 1.1) przedstawiono stadia rozwoju nowotworu prostaty [42][41][43][44].

Tabela 1.1 Ocena stadium zaawansowania nowotworu prostaty wg. systemu TNM, klasyfikacji Gleasona oraz poziomu PSA.

Stadium nowotworu	Ocena wg. Systemu TNM, klasyfikacji Gleasona oraz poziomu PSA
I	cT1, N0, M0; klasyfikacja Gleasona grupa 1; PSA<10
	cT2a, N0, M0, klasyfikacja Gleasona grupa 1; PSA<10
	pT2, N0, M0, klasyfikacja Gleasona grupa 1; PSA<10
IIA	cT1, N0, M0, klasyfikacja Gleasona grupa 1; 10<PSA<20
	cT2a lub pT2, N0, M0, klasyfikacja Gleasona grupa 1; 10<PSA<20
	cT2b lub cT2c, N0, M0, klasyfikacja Gleasona grupa 1; PSA<20
IIB	T1 lub T2, N0, M0, klasyfikacja Gleasona grupa 2; PSA<20
IIC	T1 lub T2, N0, M0, klasyfikacja Gleasona grupa 3 lub 4; PSA<20
IIIA	T1 lub T2, N0, M0, klasyfikacja Gleasona grupa od 1 do 4; PSA>20
IIIB	T3 lub T4, N0, M0, klasyfikacja Gleasona grupa od 1 do 4; PSA – może przyjmować różne wartości
IIIC	Cecha T może przyjmować różne wartości, N0, M0, klasyfikacja Gleasona 5; PSA – może przyjmować różne wartości
IVA	Cecha T może przyjmować różne wartości, N1, M0, klasyfikacja Gleasona może przyjmować różne wartości; PSA – może przyjmować różne wartości
IVB	Cecha T może przyjmować różne wartości, N może przyjmować różne wartości, M1, klasyfikacja Gleasona może przyjmować różne wartości; PSA – może przyjmować różne wartości

1.1.4. Stan zapalny w progresji raka gruczołu krokowego

Stan zapalny występujący w odpowiedzi na uszkodzenie tkanek spowodowane przez infekcję lub uraz jest istotnym procesem immunologicznym towarzyszącym nam

WSTĘP

na co dzień. Procesy zapalne mają na celu usunięcie patogenu oraz uszkodzonej tkanki, a także zainicjowanie procesu naprawy. Stan zapalny będący naszym sprzymierzeńcem w regeneracji tkanek, utrzymaniu homeostazy tkankowej oraz walce z różnego rodzaju patogenami, może w przypadku przewlekłych stanów zapalnych przyczyniać się do uwalniania reaktywnych form tlenu i azotu z komórek, powodować niestabilność genomu, co prowadzi do zwiększonego ryzyka rozwoju nowotworów [45].

Stan zapalny może zarówno promować rozwój nowotworu, jak i hamować jego progresję. Często te same populacje komórek układu odpornościowego mogą pełnić zarówno funkcję pro- i przeciwnowotworową w zależności od docierających do nich sygnałów [46]. Jak pokazują ostatnie doniesienia, poszczególne subpopulacje limfocytów oraz wydzielane przez nie cytokiny istotnie wpływają na rozwój i przerzutowanie raka prostaty [47].

Limfocyty B naciekające tkankę nowotworową wpływają na progresję nowotworową poprzez immunoregulacyjne działanie przeciwciał oraz wpływ na inne komórki układu odpornościowego i komórki nowotworowe [48]. W tkance nowotworowej prostaty zaobserwowano istotny wzrost nacieku komórek B w stosunku do sąsiadującej tkanki i zdrowej tkanki gruczołu krokowego. W badaniu nie odnotowano jednak korelacji między ilością naciekających limfocytów B, a klinicznymi i patologicznymi parametrami badanej grupy pacjentów [49].

Nacieki limfocytów T CD8⁺ w większości guzów litych korelują z lepszym rokowaniem, co związane jest z ich właściwościami cytotoksycznymi. W tkance nowotworowej raka prostaty obserwowano spadek liczby cytotoksycznych limfocytów T CD8⁺ co związane było ze złym rokowaniem [50] [51]. W guzach pobranych od pacjentów z rakiem prostaty obserwowano niskie poziomy chemokin - CCL5, CXCL9, CXCL10 rekrutujących cytotoksyczne limfocyty T, komórki NK oraz limfocyty T pomocnicze Th1, oraz wysokie poziomy CCL2, CCL22, CXCL12 zaangażowanych w infiltrację komórek supresorowych pochodzenia szpikowego (*ang. myeloid-derived suppressor cells*, MDSC) i Treg [52]. Dodatkowo, u pacjentów z rakiem prostaty obserwowano wysoką ekspresję Tim-3 (*ang. T cell immunoglobulin and mucin domain 3*), PD-1 (*ang. programmed death-1*) oraz CD38 na powierzchni limfocytów CD8⁺, co związane było z ich nieprawidłowym działaniem i słabą odpowiedzią efektorową na antygen nowotworowy [53] [54]. Mimo to ostatnie badania

WSTĘP

pokazują, że infiltracja guza przez limfocyty CD8⁺ jest niezależnie związana z wydłużeniem czasu przeżycia pacjentów po radykalnej prostatektomii [55], i korzystną odpowiedzią na immunoterapię z wykorzystaniem modelu TRAMP-C2 [56]. Z drugiej strony wysoka gęstość limfocytów CD8⁺ w szczególności w obszarach nabłonka guza korelowała ze złym rokowaniem [57].

Limfocytom T CD4⁺ (limfocytom pomocniczym - Th) w początkowym stadium nowotworu przypisuje się funkcję przeciwnowotworową. Wraz z progresją, w wielu typach nowotworów obserwowana jest polaryzacja w kierunku fenotypu immunosupresyjnego, co sprzyja dalszemu rozwojowi nowotworu [58]. W rozwoju nowotworu niezwykle istotna jest równowaga pomiędzy limfocytami Th1 oraz Th2 i wytwarzanymi przez nie czynnikami. Komórki Th1 produkują cytokiny takie jak interferon gamma (*ang. interferon gamma*, IFN- γ), czynnik martwicy nowotworów α (*ang. tumor necrosis factor α* , TNF- α) i IL-2, promujące funkcje cytotoxiczne limfocytów T CD8⁺ i komórek NK. Komórki Th2 wytwarzają natomiast cytokiny IL-4, IL-5, IL-13 i IL-10, promujące rozwój nowotworu i hamujące odpowiedź przeciwnowotworową [46] [59]. W niewielkim badaniu klinicznym obserwowano istotnie wyższą sekrecję IL-10 i niższą IL-2 przez stymulowane limfocyty CD4⁺ pobrane od pacjentów z rakiem prostaty, w stosunku do kontrolnej grupy zdrowych mężczyzn [60]. W innym badaniu zaobserwowano, że wyższe poziomy IFN- γ i TNF- α powiązane były z mniejszym ryzykiem raka prostaty [61]. Badania te pokazują, że równowaga pomiędzy cytokinami wytwarzanymi przez limfocyty Th1 i Th2 odrywa istotną rolę w progresji raka prostaty. Cytokiny prozapalne IFN- γ i TNF- α mogą być wytwarzane także przez komórki NK, których aktywność w raku prostaty skorelowana jest z dobrym rokowaniem [62] [63]. Istotne znaczenie w rozwoju raka prostaty ma także populacja komórek NKT (*ang. natural killer T-cells*), których najliczniejsza subpopulacja iNKT (*ang. invariant natural killer T-cells*) była istotnie obniżona we krwi obwodowej u pacjentów z zaawansowanym rakiem prostaty [64]. Liczba wewnątrzguzowych iNKT była dodatkowo odwrotnie skorelowana z agresywnością nowotworu prostaty [65]. W badaniach *in vivo* brak komórek iNKT u transgenicznych myszy TRAMP spowodował szybszy i bardziej agresywny rozwój nowotworu prostaty [66].

WSTĘP

Kolejną subpopulacją limfocytów T CD4⁺ odgrywającą istotną rolę w progresji raka prostaty są komórki Treg, działające immunosupresyjnie poprzez wydzielanie cytokin takich jak: IL-10 i TGF- β (*ang. tumor growth factor β*). W nowotworze prostaty zaobserwowano korelację pomiędzy odsetkiem komórek Treg FOXP3⁺ a stadiem nowotworu [67]. Dodatkowo wysoki odsetek komórek Treg FOXP3⁺ (*ang. forkhead box P3*) w guzach prostaty związany był z krótszym całkowitym i wolnym od wznowy czasem przeżycia [67].

Niejasna jest rola kolejnej subpopulacji limfocytów CD4⁺ Th17⁺. W badaniu klinicznym zapalenie zależne od Th17 było odwrotnie skorelowane z wynikami Gleasona [68], jednak w mysim modelu raka prostaty obserwowano zmniejszenie liczby mikroprzerzutów po zablokowaniu szklaku IL-17 [69].

W rozwoju raka prostaty istotną rolę odgrywają nie tylko limfocyty i ich poszczególne subpopulacje ale również inne komórki układu odpornościowego takie jak: makrofagi, neutrofile, granulocyty i monocyty. Makrofagi związane z nowotworem (*ang. tumor associated macrophages, TAMs*) można podzielić na 2 typy: M1 promujące stan zapalny i odpowiedź przeciwnowotworową oraz M2 hamujące odpowiedź immunologiczną, promując wzrost guza, angiogenezę i przebudowę tkanek [70]. U pacjentów z rakiem prostaty większa gęstość TAMs była skorelowana z gorszym rokowaniem, wyższy odsetek TAMs zwłaszcza M2 obserwowano ponadto u pacjentów z przerzutującym rakiem prostaty [71]. W jednym z ostatnich badań klinicznych śmiertelność pacjentów z rakiem prostaty skorelowana była z naciekiem TAMs typu M2. Autorzy powiązali dodatkowo duży odsetek TAMs M2 oraz Treg w tkance agresywnego raka prostaty z wysokim poziomem syntazy tlenku azotu (*ang. nitric oxide synthase, iNOS*) zużywającego L-argininę [72], która to odgrywa istotną rolę w aktywacji limfocytów T [73]. Wyższe poziomy monocytołów we krwi obwodowej skorelowane są z większymi naciekami TAMs w guzie prostaty, [74], które z kolei powiązane są z większą liczbą przerzutów raka prostaty do węzłów chłonnych [75].

Neutrofile związane z nowotworem (*ang. tumor associated neutrophils, TANs*) podobnie jak TAMs, w zależności od prezentowanego fenotypu mogą wywoływać różne efekty na rozwój nowotworu. TANs można podzielić na 2 podgrupy TANs typu N1 wykazujące działanie przeciwnowotworowe poprzez wytwarzanie TNF- α , ICAM-1

WSTĘP

(ang. *intercellular adhesion molecule 1*), ROS (ang. *reactive oxygen species*), oraz TANs typu N2 promujące rozwój nowotworu poprzez ekspresję arginazy, metaloproteinazy 9 (ang. *matrix metalloproteinases 9*, MMP9), czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), CCL2, CCL5 i CXCL4. W raku prostaty podwyższony stosunek neutrofilii do limfocytów związany jest z lepszym rokowaniem [76].

Komórki układu odpornościowego, komórki nowotworowe i mikrośrodowiska guza wzajemnie ze sobą współpracują poprzez wydzielanie różnego rodzaju mediatorów takich jak cytokiny, chemokiny i czynniki wzrostu [77]. Wzajemne oddziaływanie komórek układu odpornościowego i komórek nowotworowych obserwowane jest również na poziomie metabolizmu składników odżywczych. Komórki nowotworowe charakteryzują się odmiennym metabolizmem, co spowodowane jest ich szybką i niekontrolowaną proliferacją. Przeprogramowanie metaboliczne jest jedną z typowych cech nowotworu. Szybki wzrost komórek nowotworowych powoduje wzmożone zużycie składników odżywczych i budulcowych takich jak: glukoza, aminokwasy, kwasy tłuszczowe, a także produkcję różnego rodzaju metabolitów, co może wpływać na działanie układu immunologicznego [78]. Metabolizm aminokwasów jest krytycznym punktem działania układu immunologicznego. Różne typy komórek układu immunologicznego wykazują odmienny metabolizm i pobór aminokwasów, który zmienia się pod wpływem dojrzewania i aktywacji komórek. Przykładowo aktywacja komórek T indukuje wzmożoną proliferację i zwiększa ekspresję transporterów aminokwasów niezbędnych do podziału i wzrostu komórek [79] [80]. Aminokwasy nie są jednak dla komórek odpornościowych jedynie materiałem budulcowym, pełnią również istotną rolę w aktywacji dojrzewania i ich prawidłowym funkcjonowaniu [81] [82].

1.1.5. *Mysie modele raka gruczołu krokowego in vivo*

W związku ze znacznymi różnicami pomiędzy budową mysiej i ludzkiej prostaty aktualnie nie istnieje mysi model idealnie odzwierciedlający rozwój nowotworu prostaty u mężczyzn. Wybór odpowiedniego modelu jest uzależniony od rodzaju badań oraz badanego stadium rozwoju nowotworu. Dostępne modele możemy podzielić na 4 grupy: przeszczep ludzkich linii komórkowych myszom o obniżonej

WSTĘP

odporności, użycie zwierząt transgenicznych, przeszczep tkanki pobranej od pacjenta, modele syngeniczne (Tabela 1.2).

Tabela 1.2. Modele *in vivo* raka prostaty z wykorzystaniem myszy. Opracowanie własne na podstawie [83] [84].

Rodzaj modelu	Zalety	Wady	Przykładowe modele
Ksenoprzeszczep linii komórkowej	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Różnorodność dostępnych linii komórkowych odzwierciedlających różne etapy rozwoju nowotworu. ▪ Możliwość zastosowania różnych miejsc podania komórek (podskórne, ortotopowe, dożylnie). ▪ Możliwość przeprowadzenia wstępnych badań <i>in vitro</i> na zastosowanych liniach. ▪ Stosunkowo krótki czas eksperymentu. ▪ Powtarzalność eksperymentów. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Brak możliwości zbadania wpływu układu odpornościowego. ▪ W związku z faktem, iż komórki guza pochodzą od innego gatunku interakcja guz-zrąb guza nie jest odzwierciedleniem interakcji zachodzących w organizmie chorego mężczyzny. 	PC-3 Du-145 LNCaP C4-2B VcaP MDAPCa 2a MDAPCa 2b CWR22 PC-82 PC-295 PC-310
Ksenoprzeszczep pochodzący od pacjentów	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Spersonalizowane podejście, umożliwiające dobór odpowiedniej terapii. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Brak możliwości zbadania wpływu układu odpornościowego. ▪ W związku z faktem, iż komórki guza pochodzą od innego gatunku interakcja guz-zrąb guza nie jest odzwierciedleniem interakcji zachodzących w organizmie chorego mężczyzny. ▪ Niska powtarzalność 	
Modele myszy zmodyfikowanych genetycznie.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Możliwość badania układu odpornościowego. ▪ Po wprowadzeniu odpowiednich zmian genetycznych nowotwór rozwija się spontanicznie ▪ Umożliwia badanie interakcji guz-zrąb guza. ▪ Mnogość dostępnych modeli. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Problem z uzyskaniem przerzutów. ▪ Nierównomierny rozwój choroby. ▪ Długi czas eksperymentów. ▪ Wysokie koszty. 	TRAMP LADY PBECO:RI PB:fos PB:blc MMTV-wap C3(1)-SV40 MMTV-kgf C3(1)blc-2 <i>Pten</i> × <i>p53</i>
Model syngeniczny (wszczepienie mysich linii komórkowych)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Możliwość badania układu odpornościowego. ▪ Możliwość zastosowania różnych miejsc podania komórek (podskórne, ortotopowe, dożylnie). ▪ Odtwarzalność eksperymentów ▪ Umożliwia badania interakcji guz-zrąb guza. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Mała liczba dostępnych linii. ▪ Brak zaangażowania ludzkich komórek. ▪ Problem z uzyskaniem przerzutów. 	TRAMP-C1 TRAMP-C2 PTEN-CaP8 PNEC30 RM-1 RM-2

WSTĘP

Coraz większa wiedza na temat biologii nowotworów pozwala na zastosowanie nowych strategii diagnostycznych i terapeutycznych, jednocześnie ujawnia ogromną złożoność choroby. Złożoność interakcji pomiędzy guzem, mikrośrodowiskiem guza i innymi komórkami gospodarza jest ogromna. Dlatego niezwykle istotna jest szczegółowa charakterystyka modeli doświadczalnych, dzięki której możliwe jest wybranie optymalnego modelu do badanego konkretnego procesu czy testowana nowej terapii [85] [86] [87].

1.1.6. Model myszy TRAMP

Transgeniczny szczep myszy TRAMP opracowano w laboratorium dr Normana M. Greenberga w Baylor College of Medicine. Myszy TRAMP wykazują ekspresję dużego antygeny T małpiego wirusa 40 (*ang. simian virus 40, SV40*) pod kontrolą promotora szczurzej probazyny (*ang. probasin, PB*) [88]. Duży antygen T SV40 jako onkoproteina, inaktywuje: białko retinoblastoma (pRB) i p53, co skutkuje zaburzeniami w kontroli apoptozy i cyklu komórkowego. PB jest natomiast regulowanym przez androgeny, specyficznym dla nabłonka prostaty białkiem. W modelu myszy TRAMP obserwowano wysoką ekspresję transgeny w płacie grzbietowym i brzusznej prostaty [89]. Guzy rozwijające się u myszy TRAMP wykazują podwyższony poziom białka p53 oraz obniżony poziom receptora androgenowego [88]. Samce myszy TRAMP rozwijają PIN w wieku od 2 do 3 miesięcy; progresja do słabo zróżnicowanego raka neuroendokrynnego obserwowana jest u części myszy w wieku 4-7 miesięcy. Model ten charakteryzuje się przerzutami głównie do węzłów chłonnych i płuc, ogniska wtórne obserwowane są także w wątrobie nerkach i nadnerczach [90] [91].

1.1.7. Model linii komórkowych TRAMP-C1, TRAMP-C2, TRAMP-C3

Linie komórkowe TRAMP-C1, TRAMP-C2 oraz TRAMP-C3 pochodzą z guza nowotworowego 32 tygodniowego samca transgenicznego myszy TRAMP. Wszystkie trzy linie wykazują ekspresję cytokeratyny, E-kadheryny, oraz receptora androgenowego [92]. Wszystkie wykazują także ekspresję HMGI (Y) (*ang. high-mobility group protein I (Y)*), białka biorącego udział w rearanżacji chromosomów w liniach komórkowych raka prostaty, a jego najwyższą ekspresję obserwowano w komórkach linii TRAMP-C1 [93]. Linie TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 charakteryzują się ponadto wyższą ekspresją kwaśnego białka bogatego w cysteinę

WSTĘP

(*ang. secreted protein acidic and rich in cysteine*, SPARC), którego poziom był pozytywnie skorelowany z szybkością proliferacji oraz migracją przez składniki macierzy zewnątrzkomórkowej (*ang. extracellular matrix*, ECM) [94].

Zdolność do tworzenia guzów po wszczępieniu do syngenicznych myszy C57BL/6 posiadają jedynie linie TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2. Guzy pochodzące zarówno z linii TRAMP-C1 jak i TRAMP-C2 wykazują ekspresję receptora androgenowego, jednak tylko w części guzów odnotowano mRNA endogennej PB (TRAMP-C1 2/6; TRAMP-C2 2/6) [92]. Linie TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2, poddano szerszym badaniom, w których wykazano, że linie te rosną niezależnie od androgenów oraz w normalnych warunkach nie wykazują ekspresji głównego układu zgodności tkankowej (*ang. major histocompatibility complex*, MHC) klasy I. Ekspresję MHC klasy I obserwowano w obu liniach po ekspozycji na INF- γ . Obie linie TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 okazały się podatne na specyficzną lizę przez cytotoksyczne limfocyty T [95]. Dodatkowo, linia TRAMP-C2 wszczepiona podskórną lub ortotopowo syngenicznym myszom C57BL/6 może przerzutować do węzłów chłonnych, płuc, nerek oraz wątroby [96] [97]. W przypadku linii TRAMP-C1 po 3-krotnym pasażu *in vivo* uzyskano linię TRAMP-C1P3, która tworzyła przerzuty w węzłach chłonnych u 95% myszy po 30 dniach od wszczępienia [98].

Dzięki tym właściwościom, linie TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 szeroko wykorzystywane są zarówno do badania przerzutowania [99] [11] jak i immunologii oraz immunoterapii raka prostaty [100] [101] [102]. Mimo licznych badań wykorzystujących linie TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2, modele te nie są wystarczająco scharakteryzowane. W piśmiennictwie brakuje charakterystyki porównawczej tych dwóch modeli, która ze względu na ich różny potencjał przerzutowy mogłaby poszerzyć wiedzę na temat przerzutowania raka prostaty. Syngeniczne modele nowotworowe zdolne do tworzenia przerzutów są niezbędne do pogłębienia wiedzy na temat złożonych procesów i interakcji komórek nowotworowych z komórkami układu odpornościowego w procesie nowotworzenia i przerzutowania [103]. Charakterystyka modeli zwierzęcych umożliwia lepsze zrozumienie procesów zachodzących podczas rozwoju nowotworu i tworzeniu przerzutów, a także wytypowanie nowych markerów nowotworach oraz opracowanie nowych strategii profilaktyki i leczenia [104] [105] [106].

1.2. Rola szlaku sygnałowego IL-33/ST2 w progresji nowotworowej

Wpływ IL-33 na rozwój nowotworów jest intensywnie badany od wielu lat. Coraz większa liczba dostępnych danych daje jasno do zrozumienia, że nie ma prostej odpowiedzi na pytanie w jaki sposób ta cytokina wpływa na progresję nowotworową. Zarówno jej działanie pronowotworowe jak i przeciwnowotworowe jest udowodniane w wielu pracach.

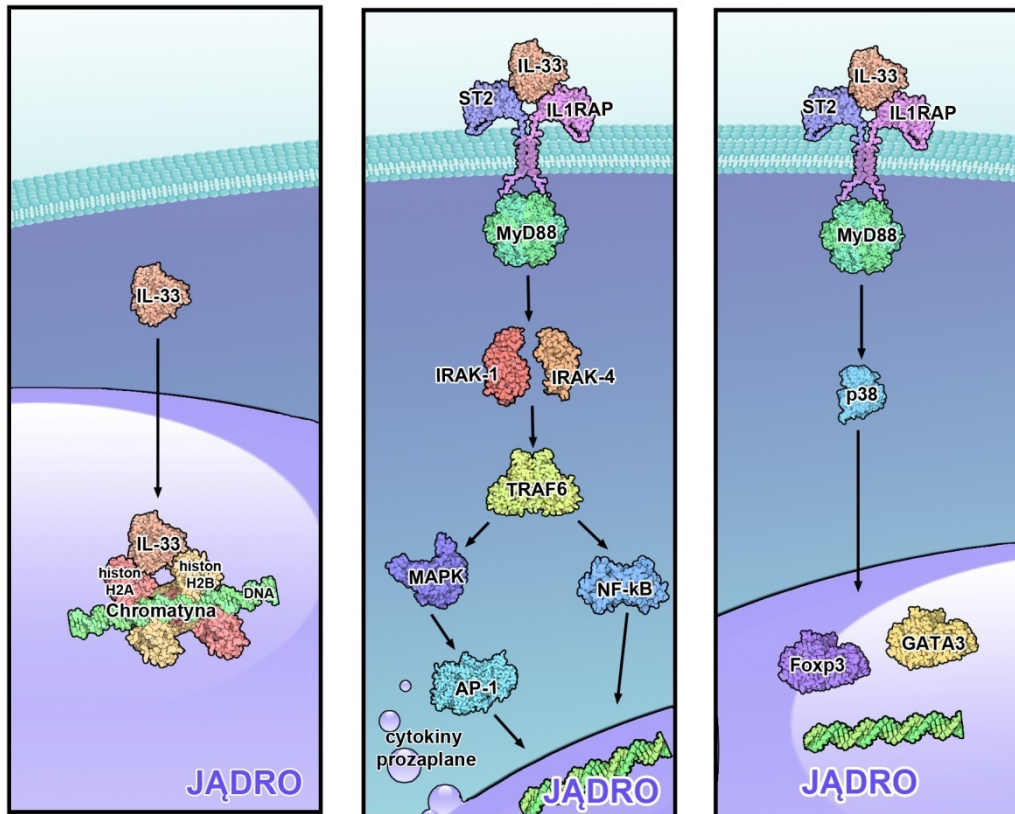
1.2.1. Budowa i mechanizm działania IL-33

IL-33 charakteryzuje się wysoką homologią C-końca do struktury charakterystycznej dla rodziny IL-1. W pierwszych badaniach dotyczących IL-33 zaobserwowano jej wpływ na indukcję odpowiedzi immunologicznej typu 2 za pośrednictwem białka tłumienia rakotwórczości 2 (*ang. suppression of tumorigenicity 2, ST-2*) [13]. Za pomocą rezonansu magnetycznego oraz krystalografii rentgenowskiej została określona struktura trójwymiarowa domeny cytokinowej IL-33 [107] [108]. Podczas badania struktury wiązania IL-33 z receptorem ST-2 przy użyciu krystalografii rentgenowskiej zaobserwowano interakcję IL-33 ze wszystkimi trzema domenami podobnymi do immunoglobuliny receptora ST-2. Dodatkowo zaobserwowano, iż kluczowe znaczenie w swoistym rozpoznawaniu IL-33 przez receptor ST-2 pełni ładunek elektrostatyczny [108]. Związanie IL-33 do receptora ST2 inicjuje utworzenie heterodimeru receptora z IL-1RAcP oraz rekrutację MYD88 do jego domeny wewnątrzkomórkowej. Akcje te promują aktywację kinaz IRAK-1, IRAK-4 oraz TRAF6, co prowadzi do aktywacji szlaku białka aktywującego-1 (*ang. activator protein 1, AP-1*) oraz czynnika jądrowego κ B (*ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B*). Następstwem aktywacji tych szlaków jest zwiększenie ekspresji cytokin prozapalnych (Rycina. 1.3).

Badania nad IL-33 wykazały, że działa ona również w szlakach niezależnych od receptora ST-2. W badaniach tych zaobserwowano, że IL-33 poza swoją funkcją cytokiny prozapalnej działa także jako wewnątrzkomórkowy czynnik jądrowy o właściwościach regulujących transkrypcję [109]. W N-końcowej domenie IL-33 możemy wyróżnić sekwencję lokalizacji jądrowej (*ang. nuclear localization sequence, NLS*) oraz motyw wiązania chromatyny (*ang. chromatin binding motif, CBM*) [110]. Motyw CBM umożliwia IL-33 przyłączenie się do kieszeni utworzonej przez histony

WSTĘP

H2A-H2B (Rycina 1.3) na powierzchni chromatyny i reguluje zagęszczenie chromatyny przez promowanie interakcji nukleosom-nukleosom [111].



Rycina 1.3 Mechanizm działania IL-33. IL-33 dzięki motywowi CBM może wiązać się do kieszeni utworzonej przez histony H2A-H2B odgrywając ważną rolę w regulowaniu struktury chromatyny. Wiązanie IL-33 do chromatyny jest dodatkowo mechanizmem regulacji aktywności IL-33. Przyłączenie się uwolnionej do przestrzeni pozakomórkowej IL-33 do receptora ST-2 powoduje kaskadę zdarzeń rozpoczynającą się od przyłączenia pomocniczego receptora IL-1RacP indukując rekrutację MyD88 i TRAF6, aktywując dalsze szlaki NF-κB oraz MAPK-AP-1 stymulując komórki do wydzielania cytokin prozapalnych. W komórkach Tregs przyłączenie IL-33 do receptora ST-2 promuje ekspresję Foxp3 oraz GATA3 poprzez mechanizm zależny od p38. Rysunek zaczerpnięty z publikacji własnej [14].

Jądrowa IL-33, poprzez wpływ na regulację NF-κB wykazuje zarówno właściwości pro- jak i przeciwzapalne. Prozapalny efekt jądrowej IL-33 wywołany jest poprzez zwiększenie podstawowej ekspresji NF-κB p65, spowodowanej bezpośrednią aktywacją transkrypcji NF-κB. Bezpośrednie oddziaływanie jądrowej IL-33 z p65 tłumi transkrypcję genów stymulowanych przez NF-κB prowadząc do odpowiedzi przeciwzapalnej; efekt ten obserwowany jest np. w przypadku zastosowania 0,1 mM maślanu i 0,3 mM propionianu [112].

WSTĘP

Jądrowa IL-33 zatrzymywana jest w jądrze komórkowym poprzez motyw NLS. W jądrze komórkowym niektórych komórek takich jak: komórki śródbłonna, nabłonka, glejowe, hematopoetyczne CD45⁺ (makrofagi, komórki tuczne), fibroblasty odnotowano gromadzenie się IL-33 [113] [114] [115] [116]. Znaczenie N-końcowej domeny IL-33 w regulacji aktywności IL-33 udowodniono w badaniu *in vivo*. Zniesienie sygnału lokalizacji jądrowej u myszy szczepu BALB/c wpłynęło na homeostazę immunologiczną, powodując konstytutywne wydzielanie IL-33. U myszy tych odnotowano śmiertelne wielonarządowe nacieki komórek odpornościowych zdominowane przez eozynofile [117].

Początkowo uważano, że wewnątrzkomórkowa IL-33 o pełnej długości (ang. *full-length interleukin-33*, IL-33_{FL}) pod wpływem endogennych i egzogennych sygnałów niebezpieczeństwa jest rozczepiana przez kaspazę 1 i uwalniana do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, a w procesie tym znaczącą rolę odgrywa inflamasom NLRP3 (ang. *NLR family, pyrin domain containing 3*), który inicjuje aktywację kaspazy-1, sprzyjając przekształcaniu i uwalnianiu IL-33 [118] [119]. W 2009 roku przedstawiono dane pokazujące, że w wyniku cięcia IL-33_{FL} przez kaspazę 1 powstaje nieaktywna forma cytokiny [120]. Mechanizmy sekrecji IL-33 nie są dokładnie poznane, jednak na przestrzeni wielu lat badań rozwinęła się wiedza na temat dwóch głównych dróg wydzielania IL-33. Istnieje wiele dowodów pokazujących, że IL-33 wydzielana jest do przestrzeni pozakomórkowej na skutek uszkodzenia komórek lub tkanek. Znaczny wzrost stężenia IL-33 obserwowano m.in. po mechanicznym zranieniu, cyklu zamrażania i rozmrażania [121] [122], wystawieniu komórek na działanie nadtlenu wodoru lub streptolizynę O [123]. W części badań jednak uwalnianie IL-33 spowodowane uszkodzeniem komórek lub tkanek było krótkotrwałe, po 4-6 h poziom IL-33 wracał do normy [124] [125]. Wzrost stężenia zewnątrzkomórkowego IL-33 obserwowano także w odpowiedzi na stres komórkowy, reaktywne formy tlenu, wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia oraz zewnątrzkomórkowego wydzielania adenosynotrifosforanu (ang. *adenosine triphosphate*, ATP) [126] [127] [128] [129]. IL-33 może być wydzielana także w sposób nieklasyczny za pomocą endosomu. W badaniach nad przewlekłą obturacyjną chorobą płuc zaobserwowano, że IL-33 jest wydzielana przez szlak endosomu wielopęcherzykowego regulowanego przez neutralną sfingomielinazę 2 (ang. *neutral sphingomyelinase 2*, nSMase2) jako ładunek związany z powierzchnią [130].

WSTĘP

1.2.2. Regulacja aktywności IL-33

IL-33, zarówno jako cytokina jak i czynnik transkrypcyjny, odgrywa istotną rolę w homeostazie immunologicznej, dlatego niezwykle istotna jest regulacja jej aktywności. Pośród mechanizmów regulacji aktywności IL-33 możemy wymienić: lokalizację jądrową i sekrecję do przestrzeni pozakomórkowej, cięcie proteolityczne, utlenianie reszt cysteinowych oraz wiązanie IL-33 do rozpuszczalnej formy receptora ST2 (*ang. soluble ST2, sST2*).

Jednym z mechanizmów regulacji aktywności IL-33 jest jej zatrzymanie w jądrze komórkowym, dokładny mechanizm zatrzymania i sekrecji IL-33 w jądrze został już opisany w rozdziale „1.2.1. Budowa i mechanizm działania IL-33”. Znaczenie tego mechanizmu zostało zobrazowane poprzez uszkodzenie regionu NLS IL-33 u myszy BALB/c, co powodowało nadmierną sekrecję IL-33 i letalny stan zapalny [117].

Kolejny mechanizm regulacji aktywności IL-33 opiera się na działaniu enzymów proteolitycznych, które mogą zarówno wzmacniać, jak i hamować aktywność IL-33. IL-33_{FL} jest biologicznie aktywna, co udowodniono gdy po dodaniu IL-33_{FL} obserwowano wydzielanie IL-6 zależne od szlaku IL-33/ST-2 w komórkach tucznych [131] [132]. Jednak dojrzałe formy IL-33 (powstałe w wyniku cięcia proteolitycznego) wykazują nawet 30-krotnie wyższą aktywność biologiczną w testach z wykorzystaniem komórek tucznych oraz wrodzonych komórek limfoidalnych typu 2 (*ang. innate lymphoid type-2 cells, ILC2*) [132] [133]. Wśród form dojrzałych można wyróżnić IL-33 o masach od 18 do 21 kDa, których obecność odnotowano m.in. w celiakii i chorobie Alzheimera [134][135]. Te same enzymy mogą odpowiadać za aktywację i dezaktywację IL-33 przez degradację; tak jest w przypadku proteiny 3 neutrofilii (PR3) [136]. W inaktywacji i degradacji IL-33 biorą udział także chymaza komórek tucznych, katepsyna G oraz kaspazy [133]. Aktywacja kaspaz -1, -3 i -7 zaangażowana jest w wyciszenie stanu zapalnego zależnego od szlaku IL-33/ST2 poprzez proteolityczne cięcie IL-33 [118] [121] [137]. Działanie IL-33 może być hamowane również poprzez zmiany konformacyjne polegające na utlenieniu czterech reszt cysteinowych Cys208, Cys227 Cys232 oraz Cys259 skutkujące utworzeniem dwóch mostków disiarczkowych. Wywołane zmiany konformacyjne uniemożliwiają przyłączenie się IL-33 do receptora ST-2, dodatkowo zmiany te mogą skutkować zerwaniem już istniejącego wiązania z receptorem [138]. Znaczenie tej drogi

WSTĘP

dezaktywacji IL-33 udowodniono modyfikując jej strukturę tak aby uniemożliwić tworzenie mostków, co skutkowało znacznym wydłużeniem czasu działania IL-33 [138] [139]. Dodatkowym czynnikiem hamującym działanie IL-33 są tak zwane receptory „wabikowe” sST-2 wyłapujące uwolnioną do przestrzeni pozakomórkowej IL-33. Receptor sST-2 pozbawiony jest domeny transbłonowej, a przyłączenie do niego cytokiny nie wywołuje efektu biologicznego [140] [141].

1.2.3. *Pronowotworowe działanie IL-33 na proliferację komórek i zdolność do przerzutowania*

W wielu publikacjach ukazany jest pronowotworowy charakter IL-33 w różnych typach nowotworów. Szlak sygnalizacyjny IL-33/ST-2 wpływa na ekspresję wielu cytokin promujących: proliferację komórek nowotworowych, przerzutowanie, angiogenezę oraz migrację komórek nowotworowych.

W wielu typach nowotworów wysokie stężenie IL-33 oraz receptora ST-2 skorelowane jest z większą inwazyjnością nowotworu i gorszym rokowaniem. W surowicy kobiet chorych na raka piersi odnotowano wyższe stężenie zarówno IL-33 jak i sST-2 w stosunku do grupy osób zdrowych [142]. Dodatkowo wysoka ekspresja IL-33 oraz sST-2 w surowicy u pacjentek z rakiem piersi związana była z wysokim stężeniem VEGF, MMP-11, płytko-pochodnego czynnika wzrostu-C (*ang. platelet-derived growth factor C, PDGF-C*), krótszym czasem przeżycia, a także opornością na tamoksyfen [143] [144]. Po radykalnej mastektomii u kobiet z rakiem piersi ER⁺ (*ang. estrogen receptor*) obserwowano natomiast spadek poziomów IL-33, sST-2 oraz VEGFR (*ang. vascular endothelial growth factor receptor*) [142]. W badaniach *in vivo* obserwowano podwyższony poziom IL-33 we wtórnych ogniskach nowotworowych w modelu transgenicznych myszy MMTV-PyMT oraz u myszy z wszczepionym nowotworem gruczołu mlekowego 4T1 [145] [146]. Wyższy poziom IL-33 w stosunku do zdrowej grupy kontrolnej odnotowano także u pacjentów z rakiem żołądka, niedrobnokomórkowym rakiem płuc (*ang. non-small-cell lung cancer, NSCLC*), nabłonkowym rakiem jajnika, rakiem wątrobowokomórkowym, a także rakiem prostaty [147] [148] [149] [150] [151] [152]. Dodatkowo, w przypadku raka prostaty obserwowano korelację pomiędzy stężeniem IL-33 a stadium zaawansowania nowotworu [153] [151].

WSTĘP

Wpływ szlaku IL-33/ST2 został zbadany w wielu nowotworach dzięki metodom inżynierii genetycznej. W badaniach nad mysim nowotworem gruczołu sutkowego zaobserwowano zahamowanie wzrostu guza nowotworowego 4T1 oraz zmniejszenie liczby przerzutów u transgenicznym myszy BALB/c z delecją receptora ST-2 (ST2^{-/-}) w stosunku do myszy szczepu dzikiego. Dodatkowo w surowicy myszy ST2^{-/-} zaobserwowano zwiększoną ekspresję IL-17, IFN- γ , TNF- α oraz zmniejszoną ekspresję IL-4 [154]. Zwiększenie tempa wzrostu guza oraz liczby przerzutów (do płuc i wątroby) w nowotworze 4T1 obserwowano natomiast u myszy szczepu dzikiego otrzymujących egzogenną IL-33 [155]. Analogiczne wyniki odnotowano w eksperymencie wykorzystującym linię 4T1 z nadekspresją IL-33 [156]. Pronowotworowy wpływ IL-33 na progresję nowotworową i przerzutowanie potwierdzają także badania, w których myszy BALB/c immunizowano za pomocą wirusa zapalenia wątroby typu B prezentującego dojrzałą formę IL-33. Immunizacja ta powodowała trwałą i swoistą odpowiedź immunologiczną, skutkującą zahamowaniem wzrostu guza nowotworowego 4T1 oraz zmniejszeniem liczby przerzutów do płuc [157].

Pronowotworowe działanie IL-33 obserwowano także w rozwoju raka jelita grubego. Knock-out zarówno IL-33 jak i ST-2 w mysim modelu raka jelita grubego APC^{Min/+} hamował rozwój nowotworu i indukował apoptozę. Wyidukowanie nadekspresji IL-33 w mysich komórkach nowotworowych jelita grubego CT-26 oraz MC-38 związane było z szybszym wzrostem guza oraz większą liczbą przerzutów do wątroby [158]. Analogiczne rezultaty odnotowano dla ludzkich komórek nowotworowych jelita grubego SW620 z nadekspresją IL-33. Czas przeżycia myszy zaszczepionych komórkami SW620 z nadekspresją IL-33 był znacząco krótszy niż myszy zaszczepionych komórkami dzikimi. Dodatkowo wyższa ekspresja IL-33 skorelowana była ze wzrostem tempa proliferacji komórek *in vivo* oraz większą liczbą przerzutów [159]. Odwrotny efekt osiągnięto indukując w komórkach SW620 nadekspresję sST-2. Komórki te charakteryzowały się wolniejszym tempem wzrostu oraz mniejszą inwazyjnością nowotworu. Natomiast knock-out sST-2 w ludzkich komórkach nowotworowych jelita grubego SW480, przyspieszał wzrost guza oraz promował przerzutowanie [160]. W badaniach nad rakiem jelita grubego zaobserwowano także, że IL-33 przyłączając się do receptora ST2 zwiększa ekspresję cyklooksygenazy-2 za pośrednictwem NF- κ B, wpływając na wzrost stężenia prostaglandyny E2 promującej proliferację komórek nowotworowych [161]. Szlak

WSTĘP

sygnałowy IL-33/ST-2 wpływa także na regulację ekspresji transportera glukozy-1 w komórkach NSCLC, zwiększając wychwyt glukozy oraz glikolizę. W NSCLC nadekspresja IL-33 promowała wzrost guza oraz tworzenie przerzutów, jednak hamowanie ekspresji transportera glukozy-1 znosiło ten efekt [162]. W innym badaniu pro-nowotworowe działanie IL-33 w NSCLC powiązane było z regulacją ekspresji genu CDIP1 (ang. *cell death inducing p53 target 1*) za pośrednictwem miR-128-3p oraz białek: bax, cyt-c, kaspazy 3 i PARP (ang. *poly (ADP-ribose) polymerase*) [163]. Traktowanie ludzkich komórek raka płuc A549 IL-33 zwiększało ich zdolność do migracji i inwazji w testach *in vitro*, czemu towarzyszyła zwiększona ekspresja MMP-2 i MMP-9 [164]. Pronowotworowe działanie IL-33 w NSCLC zostało także udowodnione przez blokowanie IL-33 poprzez przeciwciała neutralizujące, co skutkowało zahamowaniem rozwoju nowotworu w badaniach *in vivo* [165].

W ostatnich badaniach nad płaskonabłonkowym rakiem przełyku wykazano, że IL-33 promuje migrację i inwazję komórek raka przełyku KYSE-450, a nadekspresja IL-33 związana była z większą liczbą przerzutów w badaniach *in vivo*. Dodatkowo w badaniach tych udowodniono, że IL-33 może promować rozwój guza i przerzuty poprzez regulację ekspresji CCL2, regulację przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT ang. *epithelial-mesenchymal transition*) i rekrutację Treg [166]. W nowotworze trzustki IL-33 również promowała rozwój guza, tym razem poprzez rekrutację i aktywację komórek T_H2 oraz ILC2 [167].

1.2.4. Przeciwnowotworowe działanie IL-33: proliferacja komórek i zdolność do przerzutowania

Choć liczba danych dostarczających dowodów na pronowotworowe działanie IL-33 jest ogromna, istnieje także wiele dowodów mówiących o przeciwnowotworowym działaniu szlaku IL-33/ST-2. Niższe stężenia IL-33 korelowały z gorszym rokowaniem w nowotworze płuc, dróg żółciowych oraz prostaty [168] [169] [170] [171]. W badaniach *in vitro* nad rakiem trzustki IL-33 hamowała wzrost komórek linii MIA PaCa-2, obniżała ekspresję kinaz zależnych od cyklin 2 i 4 (ang. *cyclin-dependent kinase 2 and 4*, CDK2, CDK4) promując jednocześnie ekspresję cząsteczek apoptotycznych takich jak Bax i TRAIL [172]. Niskie poziomy receptora ST-2 były skorelowane ze złym rokowaniem i krótszym czasem przeżycia pacjentów z rakiem jelita grubego. Dodatkowo wyciszenie ekspresji ST-2 w mysich komórkach

WSTĘP

raka jelita grubego CT26 spowodowało szybszy wzrost guza [173]. Przeciwnowotworowe znaczenie IL-33 w rozwoju raka jelita grubego ukazano także w modelu MC-38, gdzie podawanie rekombinowanej IL-33 (rIL-33) hamowało rozwój nowotworu, a delecja ST-2 przyspieszała jego rozwój [174].

Mimo wielu dowodów na pronowotworowe działanie IL-33 w rozwoju raka sutka, w mysim modelu przerzutowania raka piersi (dożylnie podanie komórek 4T1-Luc) zaobserwowano zmniejszenie liczby przerzutów po podaniu rIL-33. Efekt hamujący rozwój przerzutów po zastosowaniu rIL-33 był obserwowany tylko u myszy szczepu dzikiego, w doświadczeniu z wykorzystaniem szczepu myszy ST2^{-/-} efekt ten nie był widoczny [175]. Podawanie rIL-33 hamowało także rozwój raka okrężnicy oraz tworzenie przerzutów w płucach i wątrobie [176].

W kilku badaniach nad czerniakiem przedstawiono przeciwnowotworowe działanie IL-33. Podanie rIL-33 hamowało zarówno rozwój nowotworu w modelu podskórnym [177] [178], jak i tworzenie przerzutów po dożylnym podaniu komórek B16 [179]. Wolniejszy wzrost guza nowotworowego obserwowano także dla linii B16 z nadekspresją IL-33 [180]. W modelu czerniaka B16 zaobserwowano także, że skojarzone leczenie IL-33 oraz przeciwciałami anty-PD-1 (*ang. programmed death receptor 1*) daje lepsze efekty niż monoterapia. Przy zastosowaniu terapii skojarzonej anty-PD-1 i IL-33 obserwowano dłuższy czas przeżycia i wolniejsze tempo rozwoju nowotworu [181].

Nadekspresja IL-33 związana była także z wolniejszym rozwojem raka płuc A9. Dodatkowo, myszy którym wszczepiono komórki A9 z nadekspresją IL-33 charakteryzowały się łagodniejszym przebiegiem choroby, bez owrzodzeń oraz mniejszą liczbą krążących komórek nowotworowych [170].

1.2.5. Wpływ IL-33 na mikrośrodowisko guza

W skład mikrośrodowiska guzaw zależności od typu nowotworu mogą wchodzić różnego rodzaju komórki takie jak: komórki śródbłonna, komórki odpornościowe, fibroblasty, adipocyty i komórki dendrytyczne [182] [183]. Komórki wchodzące w skład TME mogą zarówno hamować jak i promować rozwój nowotworu. Wpływ IL-33 na komórki TME był szeroko badany w wielu rodzajach nowotworów. Wysokie poziomy IL-33 u pacjentek z rakiem piersi korelowały z wysoką ekspresją VEGF,

WSTĘP

MMP-11 oraz płytkopochodnego czynnika wzrostu C związanymi z progresją nowotworu [184].

W najnowszych badaniach zaprezentowano, że fibroblasty związane z nowotworem (CAFs ang. *cancer-associated fibroblast*) w raku piersi wykazują podwyższoną ekspresję IL-33. Podwyższenie poziomu IL-33 związane było z indukowaniem odpowiedzi immunologicznej typu 2 w mikrośrodowisku guza, która związana była z rekrutacją eozynofili, neutrofilii i monocytów w przerzutach do płuc [145]. Istotny wpływ IL-33 na CAFs związany z promocją nowotworu i wzrostem ekspresji CXCL3 oraz CXCR4 obserwowano w badaniach nad nowotworem trzustki oraz głowy i szyi [185] [186].

Pronowotworowy efekt aktywacji szlaku IL-33/ST-2 może wynikać także z indukcji ekspresji MMPs. IL-33 regulowała ekspresję MMP-2 i -9 w rozwoju czerniaka, oraz MMP-2, -3 i -9 w raku żołądka [187] [188] [189]. Bezpośrednie działanie IL-33 na linię komórkową makrofagów RAW264.7 indukowało ekspresję MMP-9, która może pełnić rolę w inwazji guza i angiogenezie [190].

W modelach raka gruczołu mlekowego obserwowano proangiogenną działalność IL-33. U myszy BALB/c obarczonych nowotworem 4T1 otrzymujących egzogenną IL-33 odnotowano zwiększenie gęstości niedojrzałych naczyń krwionośnych, co obserwowano poprzez zwiększoną liczbę komórek CD31⁺ i α -aktynę mięśni gładkich (ang. *α -smooth muscle actin*, α -SMA⁺) [155]. Znaczenie szlaku IL-33/ST-2 w angiogenezie nowotworu 4T1 udowodniono także przy wykorzystaniu transgenicznych myszy BALB/c ST2^{-/-}, u których obserwowano nasilenie martwicy nowotworu, zahamowanie wzrostu guza oraz zmniejszenie ekspresji VEGF w stosunku do myszy szczepu dzikiego [191]. Istnieją także doniesienia mówiące o wpływie IL-33 na zwiększenie ekspresji czynników pro-angiogennych takich jak VEGF, IL-8 oraz białka wiążącego wapń A8 (ang. *calcium-binding protein A8*, S100A8) [158] [192] [193].

Receptor ST-2 ulega silnej ekspresji w komórkach śródbłonna, które mogą pośredniczyć w proangiogennym działaniu IL-33. Wiadome jest, że IL-33 zwiększa proliferację i różnicowanie ludzkich komórek śródbłonna; została ona określona

WSTĘP

mianem silnego aktywatora komórek śródbłonna, promującego zarówno angiogenezę jak i przepuszczalność naczyń [194].

1.2.6. Wpływ IL-33 na komórki układu immunologicznego

Szlak IL-33/ST-2 znacząco wpływa na homeostazę immunologiczną. Poprzez receptor ST-2 obecny na większości komórek układu odpornościowego, IL-33 promuje wzrost nowotworu wpływając na: makrofagi, neutrofile, ILC2, komórki tuczne (nazywane również mastocytami), Treg, MDSC. Z drugiej strony w wielu eksperymentach udowodniono przeciwnowotworowe działanie IL-33 poprzez aktywację: eozynofili, komórek NK, limfocyty CD4⁺ i CD8⁺.

MDSC

Mieloidalne komórki supresorowe, inne niż granulocyty i monocyty pełnią rolę w rozwoju różnego rodzaju stanów patologicznych, w tym progresji nowotworowej odgrywając znaczącą rolę w supresji immunologicznej [195]. Podanie egzogennej IL-33 myszom obciążonym nowotworem 4T1 wzmacniało immunosupresyjne działanie MDSC sprzyjające rozwojowi nowotworu. Przyspieszona progresja raka wywołana podaniem IL-33 była związana ze zwiększoną akumulacją MDSC CD11b⁺Gr-1⁺ wewnątrz guza [155] [196] [196]. Ponadto, IL-33 promuje immunosupresyjną działalność MDSC poprzez aktywację sygnalizacji MAPK/NF-κB oraz zwiększenie ekspresji aktywności arginazy-1. Zniesienie sygnalizacji IL-33/ST-2 w modelach transgenicznym skutkowało zmniejszeniem akumulacji, proliferacji oraz aktywności MDSC, co z kolei spowodowało zahamowanie rozwoju guza [197]. W mysim modelu czerniaka B16, podawanie IL-33 natomiast zmniejszało akumulację MDSC w guzie oraz śledzionie [178].

Mastocyty (komórki tuczne)

Wpływ IL-33 na progresję nowotworów za pośrednictwem mastocytów obserwowano w modelu raka skóry indukowanego promieniowaniem UV, gdzie zaobserwowano gromadzenie się mastocytów oraz fibroblastów ekspresjonujących IL-33 na pierwszych etapach rozwoju nowotworu [197]. Podwyższony poziom IL-33 obserwowano również w komórkach raka jelita cienkiego, co wzmacniało rekrutację mastocytów do TME, promując dalszy rozwój nowotworu [198]. Obserwacje te

WSTĘP

potwierdza badanie na mysim modelu raka jelita grubego $Apc^{Min/+}$, gdzie knock-out IL-33 zmniejszył nacieki komórek tucznych oraz Treg, które odgrywają znaczącą rolę w polipowatości w tym modelu nowotworowym [199]. Ponadto inkubacja komórek tucznych z IL-33 indukowała uwalnianie czynnika proangiogenego (VEGF-A), oraz prolimfangiogenego (VEGF-C) [200].

U myszy $ST2^{-/-}$ zaobserwowano zmniejszoną ekspresję czynników CSF2, CCL3 i IL-6 wytwarzanych przez komórki tuczne. Postulowany jest także wpływ IL-33 na mikrośrodowisko guza za pośrednictwem aktywacji komórek tucznych modulujących mikrośrodowisko guza poprzez kaskadę sygnałową obejmującą IL-11/IL-33/komórki tuczne/makrofagi/komórki nowotworowe [201].

Makrofagi

TAMs stanowią istotną część nacieku leukocytarnego. Przeważającym rodzajem TAMs w TME są komórki o fenotypie zbliżonym do makrofagów M2, charakteryzujące się właściwościami pronowotworowymi. Makrofagi M1 natomiast, poprzez sekrecję prozapalnych czynników, hamują wzrost i rozwój nowotworu [202]. IL-33 pośredniczy w komunikacji pomiędzy makrofagami, a komórkami nowotworowymi sprzyjając progresji nowotworowej i tworzeniu przerzutów [203]. Wpływ IL-33 na rekrutację i polaryzację TAMs w kierunku fenotypu M2 został udowodniony w kilku modelach nowotworowych [155] [160] [204]. W najnowszych badaniach nad makrofagami pochodzącymi ze szpiku myszy transgenicznym $ST2^{-/-}$ oraz wykazujących nadekspresję IL-33 wykazano, że szlak IL-33/ST2 odgrywa kluczową rolę w polaryzacji makrofagów do fenotypu M2 poprzez fosforylację oksydacyjną komórek [205].

W badaniu z wykorzystaniem mysiego modelu raka płaskonabłonkowego wykazano, że komórki inicjujące nowotwór (*ang. tumor-initiating cells*, TIC) promują uwalnianie IL-33 i ułatwiają różnicowanie makrofagów ekspresjonujących $Fc\epsilon R1\alpha^+$. Makrofagi te wydzielają następnie TGF- β , który indukuje w TIC właściwości inwazyjne, lekooporne i dalszą sekrecję IL-33 [206]. W innym badaniu pokazano, że aktywowane poprzez IL-33 makrofagi wydzielają duże ilości MMP-9, która pośredniczy w immunosupresyjnym działaniu makrofagów i ułatwia inwazję nowotworu [207].

Wrodzone komórki limfoidalne typu 2 (ILC2)

ILC biorą udział w odporności oraz rozwoju i przebudowie tkanek. Ze względu na wytwarzane przez nie cytokiny oraz regulujące je czynniki transkrypcyjne podzielono je na 3 grupy: ILC1, ILC2 i ILC3 [208]. IL-33 oddziaływująca na ILC2 napędza ich rekrutację i stymuluje do wytwarzania szeregu cytokin. Aktywowane przez receptor ST-2 komórki ILC2 mogą hamować aktywację komórek NK promując rozwój nowotworu [209]. Ostatnie badania pokazują, że IL-33 promuje wydzielanie IL-13 przez komórki ILC2, promując migrację i inwazję komórek raka jelita grubego. A dodatkowo pronowotworowe działanie ILC2 zależne od IL-33 wzmacniane jest przez receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów gamma, PPAR γ (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor*) [210]. Z drugiej strony aktywacja ILC2 przez IL-33 związana była z rekrutacją eozynofili oraz pobudzeniem komórek T CD8⁺ przyczyniając się do zahamowania rozwoju nowotworu i przerzutów [211] [212]. Ponadto lokalna sekrecja IL-33 indukując akumulację ILC2 wydzielających CXCR2 wywołuje apoptozę komórek nowotworowych [213].

Eozynofile

Eozynofile, których obecność można stwierdzić zarówno w klinicznych jak i eksperymentalnych nowotworach, pełnią różnorodną rolę w progresji nowotworowej [214]. Rekrutacja eozynofili do TME związana jest z oddziaływaniem różnych czynników tj. eotaksyn (CCL11, CCL24 i CCL26) oraz alarmin, do których zaliczamy HMGB1 oraz IL-33 [214] [215] [216]. Wydaje się, że IL-33 wpływa na rekrutację eozynofili w sposób pośredni poprzez aktywowane komórki ILC2, mastocyty, czy chemokiny wytwarzane przez komórki nowotworowe [217] [218] [219] [212] [220]. Podanie myszom rekombinowanej IL-33 skutkowało infiltracją eozynofili i podwyższonym poziomem cytokin typu 2: IL-5, IL-9 i IL-13 [221].

Przeciwnowotworowe znacznie IL-33 za pośrednictwem eozynofili zostało ukazane w raku jelita grubego, gdzie podanie IL-33 zahamowało wzrost guza. Efektu leczniczego IL-33 nie obserwowano u myszy z niedoborem eozynofili - Δ dblGATA-1. Zahamowanie wzrostu nowotworu przez IL-33 u myszy Δ dblGATA-1 obserwowano dopiero po transferze aktywowanych *ex vivo* eozynofili [218]. Istotny wpływ osi IL-33-eozynofile w hamowaniu rozwoju nowotworu pokazano także w modelu czerniaka B16.

WSTĘP

W badaniu tym podanie IL-33 hamowało zarówno rozwój nowotworu w modelu podskórnym jak i rozwój przerzutów po dożylnym podaniu komórek B16, efekt ten był jednak znoszony poprzez podanie przeciwciał anty-Siglec-F selektywnie zmniejszających populację eozynofili poprzez indukcję apoptozy [178]. Eozynofile mogą hamować rozwój nowotworu pośrednio i bezpośrednio. Eozynofile stymulowane przez IL-33 wydzielają chemokiny (CCL5, CXCL9, CXCL10), które przyciągają limfocyty T CD8⁺ do TME [178]. Eozynofile aktywowane przez IL-33 mogą również hamować rozwój nowotworu w sposób bezpośredni. IL-33 zwiększa w eozynofilach ekspresję markerów aktywacji CD69, cząsteczek adhezyjnych: CD11b/CD18 i ICAM-1 oraz markerów degranulacji: CD63 i CD107a, co indukuje cytotoksyczny wpływ eozynofili na komórki nowotworowe [217] [218]. Aktywowane przez IL-33 eozynofile za pomocą cząsteczek adhezyjnych łączą się z komórkami nowotworowymi, co wywołuje kaskadę sygnalizacyjną powodując degranulację [217].

Limfocyty T CD4⁺

Receptor ST-2 ulega konstytutywnej ekspresji na powierzchni limfocytów CD4⁺. Poprzez receptor ST-2 IL-33 może aktywować limfocyty T CD4⁺ indukując ich polaryzację, produkcję cytokin oraz rekrutację do TME. W zależności od środowiska i obecnych w nim cytokin, IL-33 może promować odpowiedź Th1 lub Th2, szczególnie istotna jest równowaga poziomów IL-4 i IL-12 [222]. Obecność IL-12 sprzyja promowaniu odpowiedzi Th1 przez IL-33 [223]. Endogenna IL-33 promowała nacieki limfocytów T IFN- γ ⁺ CD4⁺ w mysich modelach nowotworu raka okrężnicy i raka wątrobowokomórkowego, hamując rozwój nowotworu [222] [176] [224]. Ponadto, IL-33 promuje różnicowanie komórek Th wytwarzających IL-9, wywołując odpowiedź przeciwnowotworową w czerniaku [225].

Limfocyty T regulatorowe

Receptor ST-2 ulega konstytutywnej ekspresji na powierzchni komórek Treg. Szlak sygnałowy IL-33/ST2 związany jest także z rekrutacją do środowiska guza Treg i aktywuje ich funkcję immunosupresyjną w wielu modelach nowotworowych [146] [226] [227] [228] [229]. W indukowanym zapaleniu stawów zaobserwowano, że komórki Treg u myszy otrzymujących IL-33 wykazywały zwiększoną zdolność hamowania wytwarzania IFN- γ przez komórki efektorowe T [230]. W modelu APC^{Min/+}

WSTĘP

knock-out IL-33 zmniejszał nacieki komórek Treg, natomiast nadekspresja interleukiny promowała rekrutację Treg ST-2⁺[199]. W innym modelu raka jelita grubego CT26, podanie egzogennej IL-33 promowało progresję nowotworową poprzez wzmożoną infiltrację TME przez komórki Treg ST-2⁺, podczas gdy neutralizacja IL-33 hamowała progresję guza oraz zmniejszała odsetek komórek Treg ST-2⁺. Podobne efekty uzyskano w modelu płaskonabłonkowego raka przełyku, gdzie pokazano, że IL-33 promuje wzrost nowotworu oraz nacieki komórek Treg poprzez szlak IL-33/NFκB/CCL2 [166]. Analogiczne obserwacje przedstawiono w badaniu nad rakiem piersi, gdzie w płucach myszy z przerzutami nowotworu 4T1 odnotowano znaczny napływ komórek Treg ST-2⁺, które wytwarzają znacznie więcej czynnika wzrostu amfireguliny odpowiedzialnego za indukcję proliferacji, inwazję, migrację i oporność na chemioterapeutyki, niż komórki Treg ST-2⁻[146].

Efektom delecji ST-2 w komórkach Treg było zwiększenie nacieków limfocytów T CD8⁺ oraz spowolnienie rozwoju guza [227]. Właściwości immunosupresyjne Treg zostały także osłabione w komórkach Treg IL-33^{-/-} ułatwiając regresję guza [228]. Treg ST-2⁺ z guza zdolne były do hamowania proliferacji komórek T CD4⁺ CD25⁻ i produkcji IFN-γ [231]. Znaczenie sygnalizacji IL-33/ST2 w kształtowaniu fenotypu Treg obecnych w TME, przedstawiono także w jednym z badań nad rakiem jelita grubego. W badaniach tych zaobserwowano preferencyjne gromadzenie się Treg ST-2⁺ w TME, co prowadzi do zahamowania nadzoru immunologicznego, a tym samym promowania dalszej onkogenezy [206]. Dodatkowo zaobserwowano, że IL-33 stymuluje komórki dendrytyczne CD11c⁺ do wydzielania IL-2, która selektywnie wzmacnia ekspansję Treg ST2⁺ [232].

Limfocyty T CD8⁺

IL-33 może wywoływać przeciwnowotworowe efekty poprzez aktywację, rekrutację oraz zwiększoną proliferację limfocytów T CD8⁺. W jednym z badań nadekspresja IL-33 w modelu raka piersi i czerniaka związana była z wolniejszym wzrostem guza oraz mniejszą liczbą przerzutów. Efekt ten skorelowany był ze zwiększoną sekrecją INF-γ przez limfocyty T CD8⁺ i komórki NK, oraz naciekiem limfocytów T CD8⁺ w miejscu guza [180]. Istotną rolę w aktywacji i promowaniu proliferacji limfocytów T CD8⁺ przez IL-33 pełni kompleks 1 kinazy mTOR (*ang. mammalian target of rapamycin kinase complex 1, mTORC1*). W obecności

WSTĘP

rapamycyny (inhibitora mTORC1) obserwowano tłumienie efektu aktywacji limfocytów T CD8⁺ wywołane przez zewnątrzkomórkową IL-33. W badaniu tym, zaobserwowano również zwiększony wychwyty glukozy oraz produkcję mleczanu przez limfocyty T CD8⁺ w odpowiedzi na działanie IL-33 [233].

W jednym z ostatnich badań szczególną rolę w aktywności przeciwnowotworowej wywołanej przez IL-33 przypisano limfocytom T CD8⁺ ekspresjonującym na swojej powierzchni CD103. W badaniu tym zaobserwowano, że IL-33 zwiększa akumulację i funkcje efektorowe limfocytów T CD8⁺CD103⁺ w guzie, dodatkowo ekspresja CD103 na limfocytach T CD8⁺ była niezbędna do przeciwnowotworowego działania IL-33 [234].

Komórki NK

Komórki NK pełnią niezwykle istotną rolę w przeciwnowotworowej odpowiedzi organizmu [235]. Poprzez aktywację komórek NK, IL-33 może promować efekt przeciwnowotworowy. Wzrost sekrecji INF- γ w odpowiedzi na działanie IL-33 na komórki NK obserwowano w wielu nowotworach m.in. raku piersi, czerniaku czy raku płuc [179] [180]. W badaniach nad nowotworem piersi pokazano, że eliminacja komórek NK całkowicie znosiła efekt przeciwnowotworowy wywołany przez podanie rIL-33. W badaniu tym pokazano także, że aktywacja komórek NK przez IL-33 jest zależna od TNF- α [175]. Z drugiej strony, u myszy ST2^{-/-} obarczonych nowotworem 4T1 obserwowano większą ilość aktywowanych komórek NK i obserwowano ich silniejsze działanie cytotoksyczne w stosunku do myszy szczepu dzikiego [154]. Przy wykorzystaniu tego samego modelu raka sutka zaobserwowano, że podanie endogennej IL-33 promowało rozwój nowotworu, czemu towarzyszyło m.in. zmniejszenie populacji komórek NK [155].

2. Założenia i cel pracy

Mysie modele nowotworowe są szeroko stosowane zarówno do badań podstawowych, jak i przedklinicznych testów nowych leków. Złożoność mikrośrodowiska guza oraz jego interakcje z innymi komórkami gospodarza powodują, że aby wybrać odpowiedni model nowotworowy do badań, konieczna jest jego szczegółowa charakterystyka. Wykorzystanie modeli syngenicznych umożliwia jednocześnie badanie progresji guza nowotworowego jak i rozwijającej się równolegle odpowiedzi immunologicznej, dzięki temu modele te umożliwiają zarówno prowadzenie badań podstawowych nad biologią rozwoju tego nowotworu *in vivo*, jak również nad skutecznością potencjalnych terapii przeciwnowotworowych, w tym immunoterapii. Szczegółowa charakterystyka porównawcza modeli o różnym stopniu agresywności może rozszerzyć wiedzę na temat procesu przerzutowania, ze szczególnym uwzględnieniem roli układu odpornościowego oraz umożliwić wytypowanie nowych markerów prognostycznych oraz celów terapeutycznych.

Dlatego celem niniejszej pracy była charakterystyka porównawcza dwóch syngenicznych mysich modeli raka gruczołu krokowego o różnym potencjale przerzutowym TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2. W związku z tym, zbadano rozwój odpowiedzi immunologicznej w trakcie rozwoju nowotworów o różnym stopniu agresywności oraz podjęto próbę wytypowania cząsteczki będącej potencjalnym celem terapeutycznym i czynnikiem wpływającym na przerzutowanie.

3. Materiały i metody

3.1. Bufory wykorzystane do badań

Tabela 3.1 Składy użytych w badaniach buforów

Nazwa buforu	Skład buforu
Bufor PBS	10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ , 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4
Bufor TSM	20 mM Tris-HCl, pH 7.4 150 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , 2 mM MgCl ₂
Bufor do elektroforezy	25 mM Tris-HCl, 19 mM glicyna, 0,1% SDS
Bufor do transferu	10 mM Tris-HCl, 150 mM glicyna, 20% metanol, pH 8,3
Bufor obciążający 6x	0,09% błękit bromofenolowy, 0,09% cyjanian ksylenu 60% glicerol; 60 mM EDTA

3.2. Linie komórkowe i media hodowlane

W przeprowadzonych badaniach wykorzystano linie mysiego raka gruczołu krokowego TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 zakupione w Amerykańskiej kolekcji hodowli komórkowych (*ang. American type culture collection, ATCC*). Obie linie wywodzą się z heterogenicznego guza pierwotnego prostaty transgenicznej myszy TRAMP. Myszy TRAMP powstały w laboratorium dr Normana M. Greenberga w Baylor College of Medicine w wyniku transfekcji z użyciem dużego antygen T z SV40 pod kontrolą szczurzego promotora probazyny. U myszy TRAMP spontanicznie rozwija się nowotwór gruczołu krokowego o zróżnicowanym stopniu złośliwości [90].

Hodowlę komórek prowadzono w odpowiednim dla nich medium hodowlanym o składzie: Dulbecco (Corning Inc., Nowy Jork, USA), bydlęca surowica płodowa (FBS) 5 % (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), L-glutamina 4 mM (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), Nu-Serum Culture Supplement 5 % (Corning Inc., Nowy Jork, USA), insulina z trzustki wołowej 5 µg/ml (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), trans-dehydroandrosteron 100 µl (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), antybiotyki: 100 µg/ml streptomycyna (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), 100 µg/ml penicylina (Polfa Tarchomin, Warszawa, Polska) na plastikowych szalkach (Sarstedt, Nümbrecht, Germany), w inkubatorze utrzymującym stałe warunki 37°C, 5% CO₂, 95%

MATERIAŁY I METODY

wilgotności. Pasaże wykonywano co 3-4 dni poprzez usunięcie medium hodowlanego i traktowanie komórek 0,25% roztworem trypsyno-wersenem o pH=8 (PChO IITD, Wrocław, Polska). Komórki inkubowano po usunięciu trypsyno-wersenem w temperaturze 37°C do momentu ich odklejenia się od szalki. Komórki następnie sflukiwano medium przy użyciu pipety automatycznej i przenoszono do jałowych probówek. Część komórek wybarwiano roztworem Trypan Blue (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) i liczone w komorze Bürkera w celu określenia ich gęstości oraz żywotności. Następnie komórki wysiewano na szalki i zawieszano w odpowiednim medium.

3.3. Zwierzęta laboratoryjne

Do badań *in vivo* wykorzystano 4-6 tygodniowe myszy C57BL/6 pochodzące ze Zwierzętarni Centrum Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (Białystok, Polska) oraz Laboratorium Jackson (USA). W czasie kwarantanny oraz eksperymentu myszy utrzymywano w standardzie SPF z dostępem do paszy i wody *ad libitum*, w warunkach zgodnych z Rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 14 grudnia 2017 r. w sprawie minimalnych wymagań, jakie powinien spełniać ośrodek oraz minimalnych wymagań w zakresie opieki nad zwierzętami utrzymywanymi w ośrodku. Wszystkie badania na zwierzętach wykonano za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach we Wrocławiu (zgody numer: 46/2013, 04/2018), zgodnie z Dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady nr 2010/63/EU na temat ochrony zwierząt laboratoryjnych wykorzystywanych do celów naukowych.

3.4. Metody *In vivo*

3.4.1. Wszczepienie komórek nowotworowych w modelu ortotopowym

Komórki linii TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 pasażowano zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.2. W dniu wszczepienia komórki zdjęto przy użyciu dedykowanego medium, określono ich żywotność dzięki barwieniu roztworem Trypan Blue i przeliczono ich gęstość w mililitrze zawiesiny. Następnie komórki odwirowywano przez 5 minut przy 1300 rpm w temperaturze 4°C (wirówka 5702 R,

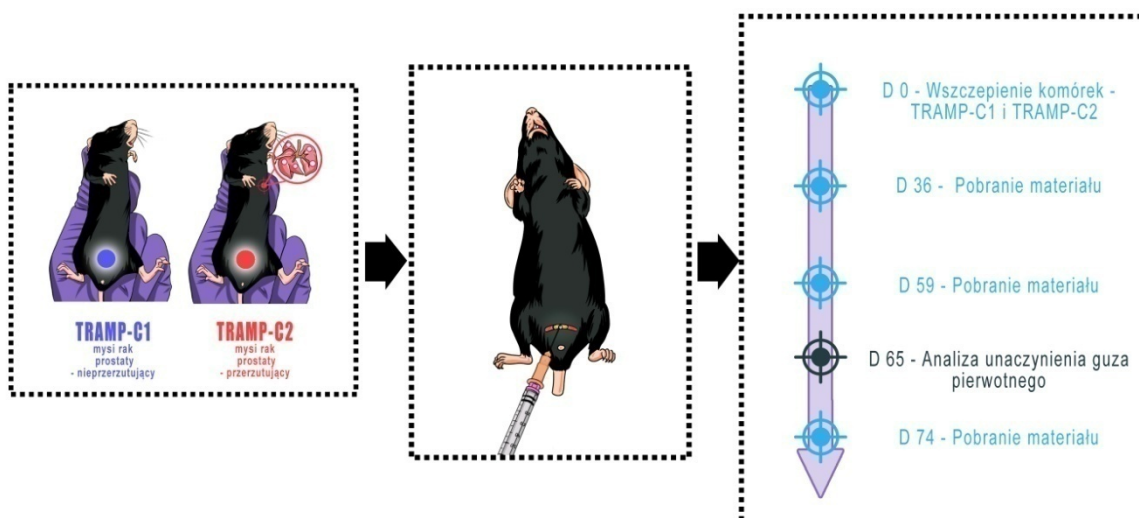
MATERIAŁY I METODY

Eppendorf, Hamburg, Niemcy) i zawieszono w odpowiedniej ilości mieszaniny płynu Hanksa (PChO IITD, Wrocław, Polska) i matrigelu (Corning Inc., Nowy Jork, USA) (1:1) tak aby uzyskać gęstość 60×10^6 kom/ml. Tak przygotowane komórki przeniesiono na lód.

Tabela 3.2 Opis grup w eksperymencie in vivo.

Nazwa grupy	Opis
Grupa kontrolna	Myszy zdrowe nie poddane operacji
Grupa SHAM	Myszy zdrowe poddane pozorowanej operacji (ang. SHAM operation)
TRAMP-C1	Myszy zaszczepione komórkami TRAMP-C1 3×10^6 komórek/mysz
TRAMP-C2	Myszy zaszczepione komórkami TRAMP-C2 3×10^6 komórek/mysz

Sierść myszy szczepu C57BL/6 (Uniwersytet Medyczny w Białymstoku) w miejscu planowanego nacięcia została usunięta przy pomocy golarki weterynaryjnej Gt420 Isis (Aesculap, Tuttlingen, Niemcy), myszy podzielono na grupy (Tabela 3.2). Przed operacją zwierzęta zostały znieczulone poprzez podskórne podanie buprenorfiny 0,2 mg/kg m-c (pół godziny przed operacją) oraz uśpione w komorze do inhalacji 5% izofuranem (Baxter, Deerfield, USA). Myszy w pełnym znieczuleniu układano na stole operacyjnym z maseczką ze stałym dopływem izofuranu (2-3% w celu podtrzymania anestezji). Miejsce nacięcia odkażano roztworem jodyny (Avena, Osielsko, Polska), a następnie nacinano nożyczkami skórę oraz powłoki brzuszne w dolnej okolicy brzucha. Do jednego z płatów gruczołu krokowego wstrzykiwano przy pomocy strzykawki 1 ml oraz igły 0,3 x 1,3 mm komórki nowotworowe (grupa TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2) lub mieszaninę płynu Hanksa i matrigelu w stosunku 1:1 (grupa SHAM) w objętości 50 μ l. Powłoki brzuszne oraz skórę zszywano szwem jednopiętrowym przy użyciu nici chirurgicznych (Dexon 4-0), dodatkowo w miejscu szycia zastosowano opatrunek: spray Akutol (Salus International, Nowy Sącz, Polska). Ranę po zabiegu przemywano dwa razy dziennie roztworem jodyny. Jako ochronę przeciwbólową po operacji przez 3 dni myszy otrzymywały podskórnie 0,05 mg/kg m-c buprenorfiny co 12 godzin.



Rycina 3.1 Schemat eksperymentu z ortotopowym wszczepieniem komórek mysiego raka gruczołu krokowego.

Doświadczenie prowadzono dwukrotnie. W ramach pierwszego doświadczenia materiał od myszy pobierano w dwóch punktach czasowych: w 33 oraz 54 dniu eksperymentu. W związku z brakiem przerzutów w 54 dniu eksperymentu, w drugim doświadczeniu postanowiono wydłużyć czas obserwacji, a materiał pobierano trzykrotnie w 36, 54 oraz 72 dniu eksperymentu, dodatkowo w 65 dniu przeprowadzono analizę unaczynienia guza (Rycina 3.1). Grupa kontrolna składała się z 5 osobników natomiast grupy badane z 7-10 osobników. Wszystkie opisane poniżej wyniki, o ile nie zaznaczono inaczej, pochodzą z drugiego eksperymentu.

3.4.2. Model dożylny

Komórki TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 przygotowano zgodnie z opisem w sekcji 3.4.1. Po odwirowaniu komórki zawieszono w płynie Hanksa w stężeniu 5×10^6 komórek/ml. Komórki podano myszom szczepu C57BL/6 (Jackson Lab., USA) do żyły ogonowej bocznej w objętości 100 μ l/mysz. Myszy kontrolne otrzymały dożylnie płyn Hanksa. Badane grupy składały się z 6-7 osobników. W trakcie eksperymentu kontrolowano stan zdrowia myszy. Sekcję przeprowadzono w 70 dniu eksperymentu.

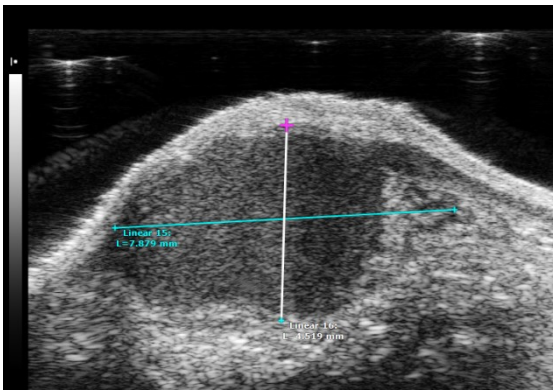
3.4.3. Analiza wzrostu guza i przerzutowania

Pomiarów wielkości prostat i guzów dokonywano przy użyciu obrazowania ultrasonograficznego Vevo2100 (Visual Sonics, Ontario, Kanada) w 24, 50, 62 oraz 72 dniu eksperymentu. Zwierzę unieruchamiano w dłoni, następnie na wcześniej ogoloną

MATERIAŁY I METODY

skórę nakładano żel do USG (EF Medica SRL, Appiano, Włochy). Obrazowanie prowadzono przy użyciu głowicy ultrasonograficznej emitującej częstotliwość fal ultradźwiękowych 13-24 MHz (MS250, VisualSonics, Ontario, Kanada). Następnie za pomocą oprogramowania Vevo Lab wykonywano pomiar długości i szerokości guza (Rycina 3.2). Objętość guza wyliczano na podstawie następującego wzoru:

$$TV [mm^3] = \frac{a^2 \times b}{2}$$



Rycina 3.2 Zdjęcie obrazowania ultrasonograficznego. Na rysunku zaznaczono sposób pomiaru długości i szerokości guza.

W trakcie sekcji od zwierząt pobrano nerki, płuca, węzły chłonne pachwinowe, które utrwalano w 6% roztworze formaliny (Avator, Gliwice, Polska) w buforowanym roztworze soli fizjologicznej (PChO IITD, Wrocław, Polska). Następnie prowadzono analizy histopatologiczne we współpracy z Katedrą Patologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Tkanki utrwalone roztworem formaliny zatapiano w bloczki parafinowe i krojono na skrawki grubości 3µm. Przygotowane skrawki barwiono metodą hematoksylina Delafield'a- eozyna. Ocenę preparatów prowadzono przy użyciu mikroskopu świetlnego Olympus model BX53 (Olympus, Japonia). Zdjęcia wykonywano kamerą Olympus model ColorView IIIu (Olympus, Japonia) przy udziale programu cell^A software (Olympus Soft Imaging Solution GmbH, Niemcy).

3.4.4. Analiza perfuzji guza metodą obrazowania ultrasonograficznego

W 65 dniu eksperymentu (Rycina 3.1) prowadzono analizę perfuzji guza myszy obarczonych nowotworem TRAMP-C1 (3 myszy) oraz TRAMP-C2 (4 myszy) przy użyciu systemu do obrazowania ultrasonograficznego Vevo2100. W tym celu użyto

MATERIAŁY I METODY

Micro Marker™ Contrast Agent (VisualSonics, Ontario, Kanada), umożliwiającego ocenę perfuzji krwi w badanej tkance w czasie rzeczywistym. Fiolkę z kontrastem, zgodnie z wytycznymi producenta rozpuszczono w 1 ml jałowej soli fizjologicznej, wymieszano i pozostawiono na 10 minut.

Przed analizą za pomocą maszyny weterynaryjnej w miejscu guza usuwano sierść, a oczy zwierząt zabezpieczano żelem nawilżającym przed wyschnięciem. Następnie zwierzętom podawano podskórnie roztwór Dexdomitoru (Orion Pharma, Warszawa, Polska) w stężeniu 150 µg/kg m.c. oraz usypiano w komorze do inhalacji 5% V/V izofuranem. Myszy układano na stole zabiegowym z maseczką ze stałym dopływem izofuranu 2% V/V tak aby możliwe było obrazowanie centralnego przekroju poprzecznego guza. Na skórę nakładano ogrzany do 36°C żel do USG i przykładano umieszczoną na statywie głowicę emitującą fale ultradźwiękowe o częstotliwości wynoszącej 13-24 MHz (MS250, VisualSonics, Ontario, Kanada). Głowicę ustawiono tak, aby możliwe było obrazowanie centralnego przekroju poprzecznego guza. Następnie do żyły ogonowej bocznej podawano 50 µl wcześniej przygotowanego kontrastu. Zapis obrazu prowadzono od chwili rozpoczęcia iniekcji do momentu wysycenia guza kontrastem. Po zakończeniu obrazowania zwierzęta wybudzano poprzez podanie roztworu Atipamu (Eurovet Animal Health B.V., Handelsweg, Holandia) w stężeniu 100 µg/kg m.c. Analizę otrzymanych danych prowadzono przy użyciu oprogramowania VevoLab i VevoCQ (VisualSonics, Ontario, Kanada).

3.5. *Metody ex vivo*

3.5.1. *Analiza parametrów morfologicznych krwi*

W trakcie sekcji w 36, 59 oraz 74 dniu eksperymentu od zwierząt pobierano krew do próbek zawierających 80 µl heparyny małocząsteczkowej (LMWH) o stężeniu 5000 I.U./ml (Polfa Tarchomin, Warszawa, Polska). Analizę parametrów morfologicznych prowadzono na pełnej krwi przy użyciu analizatora hematologicznego Mythic 18 (PZ Cormay S.A., Łomianki, Polska).

3.5.2. Analiza markerów limfocytów, makrofagów i monocytów za pomocą cytometrii przepływowej.

Po przeprowadzeniu analiz morfologicznych, pełną krew odwirowywano przez 15 minut, 2000 x g w temperaturze pokojowej. Uzyskane w ten sposób osocze przeniesiono do czystych probówek typu ependorff i zamrożono w -80°C do dalszych badań. Pozostały osad komórek zawieszono w płynie Hanksa (PChO IITD, Wrocław, Polska) z dodatkiem heparyny (50 µl heparyny w 100 ml płynu Hanksa), tak aby końcowo uzyskać objętość 2 ml. Następnie tak przygotowaną zawiesinę nawarstwiano delikatnie na gradient gęstości Ficoll-Paque Premium 1.084 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA, Saint Louis, USA) w stosunku 1:1 i odwirowywano przez 50 minut, 80 x g w temperaturze pokojowej. Po tym czasie zebrano do osobnych probówek frakcję zawierającą mononukleary oraz granulocyty i erytrocyty. Następnie do probówek dodano po 700 µl PBS-u (10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, 137mM NaCl, 2,7mM KCl, pH 7,4) (PChO IITD, Wrocław, Polska) i odwirowywano przez 15 minut, 1500 x g w temperaturze 4°C. Supernatant odrzucano, a osad zawieszano w 1 ml mieszaniny 90% FBS oraz 10% DMSO (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), przenoszono do zamrażarki (-80°C), następnie po 4 godzinach do zbiornika z ciekłym azotem.

W dniu sekcji jałowo pobrane śledziony przenoszono do probówek z medium RPMI 1640 (PChO IITD, Wrocław, Polska) zawierającym 2% FBS oraz antybiotyki: 100 µg/ml streptomycyny, 100 U/ml penicyliny. Tak przygotowane śledziony przecierano przez jałowe, nylonowe filtry (o średnicy oczek 0,5 µm), a powstałą zawiesinę odwirowywano dwukrotnie przez 7 minut przy 192 x g w temperaturze 4°C, przemywając komórki 5 ml wyżej opisanego medium. Po ostatnim odwirowywaniu osad zawieszano w medium RPMI 1640 zawierającym 50% FBS, 10% DMSO, 1% 2-merkaptoetanol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) oraz antybiotyki: 100 µg/ml streptomycyny, 100 U/ml penicyliny i zamrażano w temperaturze -80°C.

W dniu analizy cytometrycznej badane próbki rozmrażano, przenoszono do probówek z 5 ml PBS-u z 10% FBS i odwirowywano przez 7 min przy 324 x g w temperaturze 4°C. Osad komórkowy zawieszano w PBS-ie z 2% FBS, następnie komórki liczone w komorze Bürkera. Odpowiednią liczbę komórek przenoszono do czystych probówek i barwiono. Do badań wykorzystano materiał pochodzący od minimum 4 myszy/grupę.

MATERIAŁY I METODY

3.5.2.1. Barwienie zewnątrzkomórkowe

Komórki inkubowano w ciemności, w temperaturze 4°C przez 15 minut z przeciwciałem blokującym BD Fc Block (BD Biosciences, San Jose, USA) w celu zablokowania receptorów dla fragmentów Fc przeciwciał. Po inkubacji do probówek dodawano po 2 ml PBS-u i wirowano przez 7 min przy 324 x g w temperaturze 4°C. Osad komórkowy zawieszano w odpowiedniej objętości PBS-u z 2% FBS, tak aby końcowo po dodaniu przeciwciał objętość wynosiła 100 µl. Do probówek dodawano odpowiednie ilości przeciwciał (Tabela 3.3) i inkubowano w ciemności przez 30 minut w temperaturze 4°C. Po inkubacji do probówek dodawano 1 ml PBS-u z 2% FBS wirowano przez 7 min przy 324 x g w temperaturze 4°C. Osad zawieszono w 300 µl PBS-u i odczytywano przy użyciu cytometru przepływowego LSR Fortessa (BD Biosciences, San Jose, USA). Analizę danych prowadzono za pomocą oprogramowania FACS Diva software.

Tabela 3.3 Przeciwciała użyte do barwienia markerów zewnątrzkomórkowych na powierzchni monocytów oraz limfocytów

Barwienie limfocytów	Barwienie monocytów
1 µl CD4-APC (BD Biosciences, San Jose, USA)	1 µl CD11b-PerCP (BD Biosciences, San Jose, USA)
1 µl CD45-PerCP (BD Biosciences, San Jose, USA)	1 µl Ly6G-FITC (BD Biosciences, San Jose, USA)
1 µl CD335-PE (BD Biosciences, San Jose, USA)	1 µl Ly6C-PE (BD Biosciences, San Jose, USA)
1 µl CD19-BV421 (BD Biosciences, San Jose, USA)	1 µl Tie-2- (BioLegend, San Diego, USA)
1 µl CD8a APC-H7 (BD Biosciences, San Jose, USA)	
1 µl CD3e -FITC (BD Biosciences, San Jose, USA)	

3.5.2.2. Barwienie wewnątrzkomórkowe

Komórki inkubowano w ciemności, w temperaturze 4°C przez 15 minut z przeciwciałem blokującym BD Fc Block (BD Biosciences, San Jose, USA) w celu zablokowania receptorów dla fragmentów Fc przeciwciał. Po inkubacji do probówek dodawano po 2 ml PBS-u i wirowano przez 7 min przy 324 x g w temperaturze 4°C. Osad komórkowy zawieszano w 2 ml PBS-u z 1 µl barwnika LIVE/DEAH, służącym do rozróżniania komórek martwych od żywych. Po 30 minutowej inkubacji

MATERIAŁY I METODY

w ciemności, w temperaturze pokojowej do probówek dodano PBS z 2% FBS i wirowano przez 7 min przy 324 x g w temperaturze 4°C. Osad komórkowy zawieszano w odpowiedniej objętości PBS-u z 2% FBS, tak aby końcowo po dodaniu przeciwciał objętość wynosiła 100 µl. Do probówek dodawano odpowiednie ilości przeciwciał (Tabela 3.4) i inkubowano w ciemności przez 30 minut w temperaturze 4°C. Po inkubacji do probówek dodawano 1 ml PBS-u i wirowano przez 7 min przy 324 x g w temperaturze 4°C. Następne komórki utrwalano i permeabilizowano przez użyciu zestawu eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) zgodnie z instrukcją producenta. Po odwirowaniu osad zawieszano w buforze po permeabilizacji z 2 µl przeciwciał anti-FoxP3 i inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Do probówek dodano 500 µl buforu po permeabilizacji, odwirowywano przez 5 minut przy 324 x g w temperaturze 4°C. Osad zawieszano w 300 µl PBS-u i odczytywano przy użyciu cytometru przepływowego LSR Fortessa (BD Biosciences, San Jose, USA). Analizę danych prowadzono za pomocą oprogramowania FACS Diva software.

Tabela 3.4 Zestawienie przeciwciał do barwienia wewnątrzkomórkowego limfocytów Treg

Barwienie limfocytów
1 µl CD4 (BD Biosciences, San Jose, USA)
1 µl CD25 (BD Biosciences, San Jose, USA)
1 µl ST2 (BD Biosciences, San Jose, USA)

3.5.3. Przygotowanie lizatów z guzów

Pobrane w trakcie sekcji guzy zamrażano w ciekłym azocie, a następnie przechowywano w -80°C. W dniu przygotowywania lizatów, zamrożoną tkankę ważono i przenoszono do probówek homogenizacyjnych z ceramiczną kulką (MP Biomedicals LLC., Santa Ana, USA). Do tak przygotowanych próbek dodawano na 300 mg guza, 500 µl mieszaniny buforu RIPA z inhibitorami proteaz i fosfataz 2 i 3 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA, Saint Louis, USA) – po 10µl każdego inhibitora na 1 ml RIPA. Homogenizację prowadzono trzykrotnie nad suchym lodem w homogenizatorze Fast Prep®-24 MP Bio (MP Biomedicals LLC., Santa Ana, USA) przy następujących ustawieniach: program CY 24x2, 5,5 m/s, t=40s. Po homogenizacji próbki inkubowano przez 20 minut na lodzie, po czym wirowano przez 15 minut przy

MATERIAŁY I METODY

11000 x g w temperaturze 4°C. Supernatant przenoszono do czystych probówek typu eppendorf i ponownie wirowano. Otrzymany w wyniku wirowania supernatant przenoszono do czystych probówek typu eppendorf i przechowywano w temperaturze -80°C.

Oznaczenia stężenia białka w lizatach prowadzono przy użyciu zestawu Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, USA), wykorzystując zmodyfikowaną wersję metody Lowry'ego. Metoda ta opiera się na tworzeniu kompleksów miedziowo-białkowych w środowisku alkaicznym i redukcji jonów miedzi. Stężenie białka w próbkach określano w odniesieniu do krzywej wzorcowej w zakresie stężeń 1,5-0,094 mg/ml. Krzywą wzorcową przygotowywano poprzez szereg rozcieńczeń albuminy surowicy wołowej (BSA) (Bio-Rad, Hercules, USA) w buforze RIPA. Badane próbki rozcieńczano 30-krotnie buforem RIPA.

Na płytkę 96-dołkową nakładano po 5 µl/dołek badanych próbek, krzywej wzorcowej oraz buforu RIPA w dwóch powtórzeniach. Następnie do każdego dołka dodawano po 25 µl wcześniej przygotowanej mieszaniny roztworu winianu miedzi oraz laurylosiarczanu sodu (w stosunku 50:1) oraz po 200 µl roztworu Folina. Płytkę natychmiast mieszano i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut w ciemności. Odczyt absorbancji prowadzono przy użyciu czytnika płytek Synergy 2 (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, USA) przy długości fali 650 nm. Wyliczenia stężenia białka prowadzono przy pomocy programu Microsoft Excel 2017.

3.5.4. Oznaczenia profilu aminokwasowego w suchej kropli osocza

Osocze uzyskane poprzez odwirowanie krwi pobranej od zwierząt doświadczalnych nakrapiano na bibułkę Whatman 903 w 3 miejscach po 5 µl. Do badania użyto materiał pochodzący od minimum 4 myszy/grupę. Tak zabezpieczone próbki przesyłano do laboratorium Masdiag Sp. z o.o. gdzie dokonywano dalszych analiz.

Z bibułki wycinano krążek, na którym znajdowało się osocze i umieszczano w dołku płytki do którego następnie dodawano 10 µl roztworu ISTD (wewnętrzny standard), a następnie 80 µl roztworu H₂O-MeOH 20-80 + 0.1N HCl i mieszano przez 15 minut w temperaturze pokojowej przy 650 RPM. W ten sposób przygotowane próbki przenoszono po 25 µl na świeża płytkę i pozostawiono do całkowitego odparowania.

MATERIAŁY I METODY

Następnie na płytkę dodawano po 25 μ l n-butanolowego roztworu 3N HCl i inkubowano w 60°C przez 25 minut i ponownie odparowano do sucha. Pozostały osad rozpuszczono w 200 μ l mieszaniny H₂O/MeOH/FA (95/5/0,1) i mieszano przez 15 minut w temperaturze pokojowej przy 650 RPM. Tak przygotowane próbki analizowano przy zastosowaniu chromatografii, której warunki podano poniżej.

Kolumna:	Kinetex Polar C18 2,1 x 100 mm x 1,7 μ m
Przepływ:	0,35 ml/min
Temperatura kolumny:	25°C
Nastrzyk:	5 μ l

Eluent A:	H ₂ O + 0,1% FA
Eluent B:	MeOH:ACN (1:1)+ 0,1% FA

Gradient:	0 min	3%B
	1 min	30%B
	4 min	40%B
	5 min	60%B
	5,5 min	95%B
	6,5 min	95%B
	6,6 min	20%B
	10 min	20%B

Czasy retencji oznaczanych związków

Ala	3.38 min
Arg	1.65 min
Asn	2.46 min
Asp	6.64 min
Gln	2.98 min
Glu	6.96 min

MATERIAŁY I METODY

Gly	2.2 min
His	1.01 min
Ile	5.41 min
Leu	5.52 min
Lys	1.1 min
Met	4.65 min
Phe	6.03 min
Pro	3.69 min
Ser	2.56 min
Thr	3.31 min
Trp	6.69 min
Tyr	4.62 min
Val	4.47 min

3.5.5. Macierze cytokinowe

Cytokiny, chemokiny oraz czynniki wzrostu odgrywają kluczową rolę w wielu procesach biologicznych tj. proliferacji, różnicowaniu, migracji, odporności i zapaleniu. Dodatkowo, działanie jednej cytokiny może wpływać promująco lub hamująco na działanie innych cytokin. Dzięki wykorzystaniu Mouse XL Cytokine Array Kit (R&D Systems, Minneapolis, USA) równolegle określono względne stężenia 111 cytokin (Tabela 3.5) w osoczu oraz lizatach z guzów. Do badania wykorzystano materiał połączony od wszystkich osobników w danej grupie.

Tabela 3.5 Zestawienie cytokin badanych za pomocą macierzy cytokinowych.

Chemokiny, interleukiny			
Skrót	Nazwa ang.	Skrót	Nazwa ang.
CCL2/JE/MCP-1,	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>	CCL19/ MIP-3 alfa,	<i>Macrophage Inflammatory Protein-3 Alfa</i>
CCL3/CCL4 MIP-1 alfa/beta,	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1 Alfa/Beta</i>	CCL20/MIP-3 beta,	<i>Macrophage Inflammatory Protein-3 Beta</i>
CCL5/RANTES,	<i>Regulated On Activation, Normal T-Cell Expressed And Secreted</i>	CCL21/6Ckin e,	<i>Chemokine (C-C Motif) Ligand 21</i>
CCL6/C10	<i>Chemokine (C-C Motif) Ligand 6</i>	CCL22/MDC,	<i>Chemokine C-C Motif Chemokine 22</i>
CCL11/Eotaxin	<i>Eotaxin-1</i>	G-CSF,	<i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i>
CCL12/MCP-5,	<i>Murine Monocyte Chemoattractant Protein</i>	GM-CSF,	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
CCL17/TARC,	<i>Thymus And Activation-Regulated Chemokine</i>	M-CSF	<i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
CX3CL1	<i>Fractalkine,</i>	IL-6	<i>Interleukin 6</i>

MATERIAŁY I METODY

CXCL1/KC,	<i>Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 1</i>	IL-7	<i>Interleukin 7</i>
CXCL2/MIP-2,	<i>Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 2</i>	IL-10	<i>Interleukin 10</i>
CXCL9/MIG,	<i>Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 9/Monokine Induced By Gamma Interferon</i>	IL-11	<i>Interleukin 11</i>
CXCL10/IP-10	<i>C-X-C Motif Chemokine 10/Interferon Gamma-Induced Protein</i>	IL-12p40	<i>Interleukin 12 Subunit P70</i>
CXCL11/I-TAC	<i>C-X-C Motif Chemokine 11/Interferon-Inducible T-Cell Alpha Chemoattractant</i>	IL-13	<i>Interleukin 13</i>
CXCL13/BLC/BCA-1	<i>Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 13 (CXCL13)/B Lymphocyte Chemoattractant/B Cell-Attracting Chemokine 1</i>	IL-15	<i>Interleukin 15</i>
CXCL16	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 16</i>	IL-17 IL-22	<i>Interleukin 17</i> <i>Interleukin 22</i>
IL-1 alfa/IL1F1,	<i>Interleukin 1 Alpha</i>	IL-23	<i>Interleukin 23</i>
IL-1 beta/IL-1F2	<i>Interleukin 1 Beta</i>	IL-27	<i>Interleukin 27</i>
IL-1 ra/IL-1F3	<i>Interleukin 1 Receptor Antagonist</i>	IL-28	<i>Interleukin 28</i>
IL-2	<i>Interleukin 2</i>	IL-33	<i>Interleukin 33</i>
IL-3	<i>Interleukin 3</i>	LIF	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
IL-4	<i>Interleukin 4</i>	LIX	<i>LPS-Induced CXC Chemokine</i>
IL-5	<i>Interleukin 5</i>		
Czynniki wzrostowe			
ANGPT1	<i>Angiopoietin 1</i>	EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
AREG	<i>Amphiregulin</i>	FGF acid	<i>Fibroblast Growth Factor-Acidic</i>
ANGPT2	<i>Angiopoietin 2</i>	FGF-21	<i>Fibroblast Growth Factor 21</i>
ANGPTL3	<i>Angiopoietin-Like 3</i>	PD-ECGF	<i>Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor</i>
COL18A1	<i>Endostatin</i>	PDGF-BB	<i>Platelet-Derived Growth Factor-Bb</i>
CD105	<i>Endoglin</i>	VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
Czynniki zapalne i aktywatory komórek			
BAFF/BLyS/ TNFSF13B	<i>TNF Superfamily Member 13b</i>	DPPIV/CD26	<i>Dipeptidyl Peptidase 4</i>
C1q R1/CD93	<i>Complement Component 1, Q Subcomponent, Alpha Polypeptide</i>	GDF-15	<i>Growth Differentiation Factor 15</i>
CD14	<i>CD14 Antigen</i>	IFN-gamma, Osteoprotegerin/TNFRSF11B	<i>Interferon Gamma</i> <i>TNF Receptor Superfamily Member 11b</i>
CD160	<i>CD160 Antigen</i>	THO	<i>Thrombopoietin</i>
CD40/TNFR SF5	<i>CD160 Antigen</i>	TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor Alfa</i>
CRP	<i>C-Reactive Protein</i>		
Cząsteczki adhezyjne i macierzy zewnątrzkomórkowej			
CD62E	<i>E-Selectin</i>	MMP-3	<i>Matrix Metalloproteinase 3</i>
CD62P	<i>P-Selectin</i>	MMP-9	<i>Matrix Metalloproteinase 9</i>
ICAM-1/CD54	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>	VCAM-1/CD106	<i>Vascular Cell Adhesion Protein 1</i>
OSF-2	<i>Periostin</i>	PAI-1	<i>Serpin E1</i>
MMP-2	<i>Matrix Metalloproteinase 2</i>	PEDF	<i>Serpin F1</i>
Pozostałe cytokiny			
Acrp30	<i>Adiponektin</i>	IGFBP-3	<i>Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-2</i>
AHSG	<i>Fetuin A</i>	IGFBP-5	<i>Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-5</i>

MATERIAŁY I METODY

IGFBP-1	<i>Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-1</i>	IGFBP-6	<i>Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-6</i>
IGFBP-2	<i>Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-2</i>	RBP4	<i>Retinol Binding Protein 4</i>
RARRES2	<i>Chemerin</i>	MPO	<i>Myeloperoxidase</i>
CHI3L1	<i>Chitinase-3-Like Protein 1</i>	OPN	<i>Osteopontin</i>
F3	<i>Coagulation Factor Iii/Tissue Factor</i>	SAP	<i>Pentraxin 2</i>
CFD	<i>Complement Factor D</i>	TSG-14,	<i>Pentraxin 3</i>
CST3	<i>Cystatin C</i>	Pref-1/DLK-1/FA1,	<i>Preadipocyte Factor 1</i>
Dkk-1	<i>Dickkopf-Related Protein 1</i>	Proliferina,	<i>Proliferin</i>
FLT3LG	<i>Flt-3 Ligand</i>	PCSK9	<i>Proprotein Convertase 9</i>
Gas6	<i>Growth Arrest-Specific 6</i>	RAGE	<i>Receptor For Advanced Glycation End Products</i>
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>	<u>RETN</u> ,	<i>Resistin</i>
LDL R,	<i>Low-Density Lipoprotein Receptor</i>	TIM-1/KIM-1/HAVCR,	<i>Hepatitis A Virus Cellular Receptor 1</i>
LEP	<i>Leptin</i>	WISP 1/CCN4	<i>Wnt1-Inducible Signaling Pathway Protein-1</i>
NGAL	<i>Lipokalin-2</i>	C5a	<i>Complement Component 5a</i>
Reg3G	<i>Regenerating islet-derived 3 gamma</i>		

Macierze wykonano zgodnie z procedurą dołączoną przez producenta do zestawu. Odczyt membran prowadzono w aparacie Carestream Image Station 4000MM PRO (Carestream, Healthcare, USA) z zastosowaniem następujących ustawień aparatu: t=10min, f-stop=3,54, FOV=100,0 mm. Analizę densytometryczną przeprowadzono za pomocą programu Carestream MI Software 5.0.6.20 (Carestream, Rochester, USA). Dalszą analizę danych wykonywano przy użyciu programu Microsoft Excel 2017. Wyniki przedstawiono jako względną intensywność chemiluminescencji w stosunku do średniej intensywności dla referencji.

3.5.6. Testy ELISA

Za pomocą testów ELISA oznaczano ekspresję poszczególnych białek w osoczu oraz lizatach z guzów (Tabela 3.6). Do badań użyto materiału pochodzącego od minimum 5 myszy/grupę. Wszystkie testy wykonano przy użyciu komercyjnych zestawów zgodnie z procedurami producentów dostarczonymi wraz z zestawami. Stężenia poszczególnych białek w badanych próbkach analizowano w oparciu o krzywą wzorcową, którą wykonywano przy użyciu dołączonego do zestawu standardu białkowego. Po wykonaniu szeregu rozcieńczeń standardu, krzywą wzorcową wraz z odpowiednio rozcieńczonymi próbkami nanoszono na opłaszczoną przeciwciałami płytkę. Po przeprowadzeniu pełnej procedury opisanej w instrukcji odczytu dokonywano przy użyciu uniwersalnego czytnika płytek Synergy 2 przy zalecanej

MATERIAŁY I METODY

długości fali. Do analizy wyników użyto programów: CurveExpert 1.4 oraz Microsoft Excel 2017.

Tabela 3.6 Zestawienie białek badanych za pomocą testu ELISA na materiale pobranym od zwierząt.

Białko	Badany materiał
IL-33	Guz, osocze
ET-1	Guz, osocze
MMP-3	Guz
MMP-9	Guz
CCL2	Guz
CCL6	Guz

3.5.7. Macierze PCR

3.5.7.1. Izolacja RNA i synteza cDNA

W trakcie sekcji reprezentatywny fragment guza pobierano do próbek homogenizacyjnych z ceramiczną kulką zawierających 1 ml odczynnika TRI Reagent (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA, Saint Louis, USA). Próbkę homogenizowano trzykrotnie w oparach suchego lodu w homogenizatorze Fast Prep®-24 MP Bio (MP Biomedicals LLC, Santa Ana, USA) przy następujących ustawieniach: program CY 24x2, 5,5 m/s, t=40s. Próbkę przechowywano w temperaturze -80°C do dalszych analiz.

Po rozmrożeniu próbki inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej, po tym czasie dodawano 200 µl chloroformu (Avantor, Gliwice, Polska) i energicznie wytrząsano przez 15 sekund. Próbkę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 3 minuty, a następnie wirowano przez 15 minut przy 12000 x g w temperaturze 4°C. Fazę wodną przenoszono do czystych próbek, do których dodawano 500 µl izopropanolu (Avantor, Gliwice, Polska), wymieszano i inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Po inkubacji próbki wirowano przez 10 minut przy 12000 x g w temperaturze 4°C, supernatant zlano a wytrącone RNA płukano 75% etanolem (99,8% etanol rozcieńczano wodą DEPC) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). Po dokładnym wymieszaniu próbki wirowano przez 5 minut przy 7500 x g w 4°C. Po wirowaniu dokładnie usunięto supernatant a osad RNA pozostawiono do wyschnięcia przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Po wyschnięciu osad rozpuszczano w 30 – 50 µl wody wolnej od nukleaz (Bio-Rad, Hercules, USA) i przenoszono na lód. Stężenie RNA w próbkach mierzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

MATERIAŁY I METODY

W celu oczyszczenia próbek z genomowego DNA, do czystych probówek dodawano 0,5 µg RNA, 2 µl buforu GE wchodzącego w skład zestawu RT2 First Strand Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy), uzyskaną mieszaninę dopełniano do 10 µl wodą wolną od nukleaz i inkubowano przez 5 minut w temperaturze 42°C w termocyklerze Veritii 9902 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Po oczyszczeniu, do próbki dodawano mieszaninę do odwrotnej transkrypcji składającą się z buforu BC, Control P2, RE3 Reverse Transcriptase Mix oraz Nuclease-free water (wszystkie roztwory wchodziły w skład iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, USA). Reakcję prowadzono przez 15 minut w 42°C i 5 minut w 95°C, następnie schładzano do 4°C. Próbkę cDNA przechowywano w temperaturze -20°C do dalszych analiz.

3.5.7.2. Real-time PCR

Do badania poziomu ekspresji genów w tkance nowotworowej, związanych z przerzutowaniem wybrano macierz genową RT² Profiler™ PCR Array Mouse Tumor Metastasis (Qiagen, Hilden, Niemcy). Do badania wykorzystano materiał pochodzący od 3-4myszy/grupę. Macierz zawiera zestaw starterów dla 84 genów badanych oraz 6 genów kontrolnych (Tabela 3.7).

Tabela 3.7 Zestawienie genów badanych za pomocą macierzy PCR.

Gen	Rozwinięcie nazwy genu ang.
<i>Apc</i>	<i>Adenomatosis polyposis coli</i>
<i>Brms1</i>	<i>Breast cancer metastasis-suppressor 1</i>
<i>Ccl7</i>	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 7</i>
<i>Cd44</i>	<i>CD44 antigen</i>
<i>Cd82</i>	<i>CD82 antigen</i>
<i>Cdh1</i>	<i>Cadherin 1</i>
<i>Cdh11</i>	<i>Cadherin 11</i>
<i>Cdh6</i>	<i>Cadherin 6</i>
<i>Cdh8</i>	<i>Cadherin 8</i>
<i>Cdkn2a</i>	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
<i>Chd4</i>	<i>Chromodomain helicase DNA binding protein 4</i>
<i>Col4a2</i>	<i>Collagen, type IV, alpha 2</i>
<i>Csf1</i>	<i>Colony stimulating factor 1 (macrophage)</i>
<i>Ctbp1</i>	<i>C-terminal binding protein 1</i>
<i>Ctnna1</i>	<i>Catenin (cadherin associated protein), alpha 1</i>
<i>Ctsk</i>	<i>Cathepsin K</i>
<i>Ctsl</i>	<i>Cathepsin L</i>
<i>Cxcl12</i>	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 12</i>
<i>Cxcr2</i>	<i>Chemokine (C-X-C motif) receptor 2</i>

MATERIAŁY I METODY

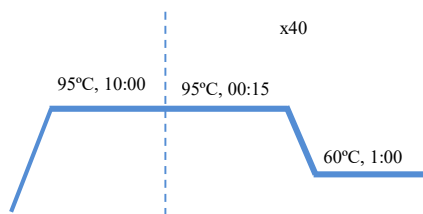
Cxcr4	<i>Chemokine (C-X-C motif) receptor 4</i>
Denr	<i>Density-regulated protein</i>
Elane	<i>Elastase, neutrophil expressed</i>
Ephb2	<i>Eph receptor B2</i>
Etv4	<i>Ets variant gene 4 (E1A enhancer binding protein, E1AF)</i>
Ewsr1	<i>Ewing sarcoma breakpoint region 1</i>
Fat1	<i>FAT tumor suppressor homolog 1 (Drosophila)</i>
Fgfr4	<i>Fibroblast growth factor receptor 4</i>
Flt4	<i>FMS-like tyrosine kinase 4</i>
Fn1	<i>Fibronectin 1</i>
Fxyd5	<i>FXYP domain-containing ion transport regulator 5</i>
Gpnmb	<i>Glycoprotein (transmembrane) nmb</i>
Hgf	<i>Hepatocyte growth factor</i>
Hpse	<i>Heparanase</i>
Hras1	<i>Harvey rat sarcoma virus oncogene 1</i>
Htatip2	<i>HIV-1 tat interactive protein 2, homolog (human)</i>
Igf1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
Il18	<i>Interleukin 18</i>
Il1b	<i>Interleukin 1 beta</i>
Itga7	<i>Integrin alpha 7</i>
Itgb3	<i>Integrin beta 3</i>
Kiss1	<i>KISS-1 metastasis-suppressor</i>
Kiss1r	<i>KISS1 receptor</i>
Kras	<i>V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
Lpar6	<i>Lysophosphatidic acid receptor 6</i>
Mcam	<i>Melanoma cell adhesion molecule</i>
Mdm2	<i>Transformed mouse 3T3 cell double minute 2</i>
Met	<i>Met proto-oncogene</i>
Mmp10	<i>Matrix metalloproteinase 10</i>
Mmp11	<i>Matrix metalloproteinase 11</i>
Mmp13	<i>Matrix metalloproteinase 13</i>
Mmp2	<i>Matrix metalloproteinase 2</i>
Mmp3	<i>Matrix metalloproteinase 3</i>
Mmp7	<i>Matrix metalloproteinase 7</i>
Mmp9	<i>Matrix metalloproteinase 9</i>
Mta1	<i>Metastasis associated 1</i>
Mtss1	<i>Metastasis suppressor 1</i>
Myc	<i>Myelocytomatosis oncogene</i> Position UniGene GenBank Symbol Description
Mycl1	<i>V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog 1, lung carcinoma derived (avian)</i>
Nf2	<i>Neurofibromatosis 2</i>
Nme1	<i>Non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed In</i>
Nme2	<i>Non-metastatic cells 2, protein (NM23B) expressed In</i>
Nme4	<i>Non-metastatic cells 4, protein expressed in</i>

MATERIAŁY I METODY

Nr4a3	<i>Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3</i>
Plaur	<i>Plasminogen activator, urokinase receptor</i>
Pnn	<i>Pinin</i>
Pten	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
Rb1	<i>Retinoblastoma 1</i>
Rorb	<i>RAR-related orphan receptor beta</i>
Rpsa	<i>Ribosomal protein SA</i>
Set	<i>SET nuclear oncogene</i>
Smad2	<i>MAD homolog 2 (Drosophila)</i>
Smad4	<i>MAD homolog 4 (Drosophila)</i>
Src	<i>Rous sarcoma oncogene</i>
Sstr2	<i>Somatostatin receptor 2</i>
Sykb	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
Tcf20	<i>Transcription factor 20</i>
Tgfb1	<i>Transforming growth factor, beta 1</i>
Timp2	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase 2</i>
Timp3	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase 3</i>
Timp4	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase 4</i>
Tnfsf10	<i>Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10</i>
Trp53	<i>Transformation related protein 53</i>
Tshr	<i>Thyroid stimulating hormone receptor</i>
Vegfa	<i>Vascular endothelial growth factor A</i>
Actb	<i>Actin, beta</i>
B2m	<i>Beta-2 microglobulin</i>
Gapdh	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
Gusb	<i>Glucuronidase, beta</i>
Hsp90ab1	<i>Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1</i>
MGDC	<i>Mouse Genomic DNA Contamination</i>

Przygotowane wcześniej próbki cDNA rozmrażano na lodzie. W celu przygotowania mieszaniny reakcyjnej pobierano 102 µl cDNA, 1350 µl 2x RT² SYBR Green Mastermix (Qiagen, Hilden, Niemcy) oraz 1248 µl RNase-free water. Tak przygotowaną próbkę delikatnie mieszano i nakładano po 25 µl na dołek płytki ze starterami, następnie płytkę wirowano przez 1 minutę przy 100 x g w temperaturze pokojowej. Reakcję prowadzono stosując program przedstawiony na poniższym diagramie (Rycina 3.3)

MATERIAŁY I METODY



Rycina 3.3 Schemat zastosowanego programu podczas reakcji PCR.

Analizę wyników prowadzono w programie QuantStudio RT Time PCR stosując metodę $\Delta\Delta C_t$. Jako gen kontrolny wybrano *Hsp90ab1*.

Uzyskane wartości analizowano za pomocą oprogramowania udostępnionego przez producenta (Qiagen), dedykowanego do użytego zestawu macierzy genowych.

3.6. Metody *in vitro*

3.6.1. Test zahamowania proliferacji komórek nowotworowych

W teście zahamowania proliferacji sprawdzano wrażliwość komórek linii mysiego raka gruczołu krokowego TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 na działanie następujących cytostatyków: paklitaksel, kamptotecyna, docetaksel, cisplatyna, dokсорubicyna, oksaliplatyna, 5-fluorouracyl.

Komórki linii TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 nanoszono na płytkę 96-dołkową (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) w stężeniu 2×10^3 komórek na dołek w objętości 100 μ l, z pominięciem trzech ostatnich dołków stanowiących kontrolę tła, do których dodawano po 100 μ l medium hodowlanego. Płytkę przeniesiono do inkubatora utrzymującego stałe warunki 37°C, 5% CO₂, 95% wilgotności. Po 24 godzinnej inkubacji na płytkę nanoszono roztwory badanych cytostatyków oraz DMSO przygotowane w medium hodowlanym, nazywanym w skrócie „OR” (o następującym składzie: RPMI 1640 z HEPES + Opti-MEM (PChO IITD, Wrocław, Polska) (1:1 v/v), 5% FBS HyClone, 2 mM L-glutaminy, antybiotyki: 100 μ g/ml streptomycyna, 100 μ g/ml penicylina) w objętości 100 μ l/ dołek. Do ostatniego rzędu stanowiącego kontrolę komórek dodawano medium testowe. Po nałożeniu związków płytkę ponownie umieszczono w inkubatorze na 72 godziny, po tym czasie wykonywano test SRB w celu wyznaczenia IC₅₀, oznaczającego stężenie związku hamującego proliferację komórek w 50%.

MATERIAŁY I METODY

W teście SRB wykorzystywany jest barwnik sulforodamina B (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), który w odpowiednim pH wiąże się do białek komórkowych. Po 72 godzinnej inkubacji komórek z badanymi związkami do każdego dołka dodawano po 50 µl zimnego 50% kwasu trójchlorooctowego (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) i umieszczono w lodówce na 1 godzinę w celu strącenia białek. Następnie dołki płukano 5-krotnie wodą destylowaną i dodawano po 50 µl 0,1% roztworu sulforodaminy B rozpuszczonej w 1% kwasie octowym (Avantor, Gliwice, Polska). Płytkę inkubowano w ciemności, w temperaturze pokojowej przez 30 minut, po czym płukano 5-krotnie przy użyciu 1% kwasu octowego. Kolejnym krokiem było osuszenie płytki i dodanie po 150 µl 10 mM roztworu TRIS (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) w celu rozpuszczenia związanego barwnika. Po 30 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej odczytywano absorbancję roztworów w dołkach przy długości fali 540 nm za pomocą czytnika płytek Synergy 2 (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, USA).

Procent zahamowania proliferacji komórek nowotworowych obliczano za pomocą poniższego wzoru:

$$\% \text{ zahamowania proliferacji} = \left[100 \times \left(1 - \frac{Ab - Am}{Ak - Am} \right) \right]$$

Gdzie:

Ab – wartość absorbancji zmierzonej dla komórek traktowanych substancjami badanymi

Ak – wartość absorbancji zmierzonej dla komórek nietraktowanych (kontrola komórek)

Am – wartość absorbancji zmierzonej dla medium hodowlanego (kontrola tła)

W pojedynczym teście rozcieńczenie każdego związku nakładano w trzech powtórzeniach, dodatkowo testy powtarzano trzy lub czterokrotnie.

3.6.2. Analiza poziomu ekspresji białek metodą western blot.

Analizę poziomu ekspresji wybranych białek metodą western blot wykonywano w lizatách pochodzących z hodowli komórkowych linii TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2.

3.6.3. Przygotowanie lizatów komórkowych

Komórki linii TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 hodowano na szalkach Petriego zgodnie z opisem przedstawionym w rozdziale 3.2. Medium z nad hodowli usuwano,

MATERIAŁY I METODY

a komórki dwukrotnie przemywano buforem PBS. Szalkę przenoszono na lód, po czym dodawano 200 µl buforu RIPA z inhibitorami fosfataz i proteaz. Lizaty komórkowe zbierano przy użyciu skrobaczek do hodowli komórkowych i przenoszono do czystych probówek typu eppendorf i inkubowano na lodzie przez 20 minut. Po inkubacji lizaty odwirowywano w 4°C przez 10 minut przy 11000 rpm, a następnie przenoszono supernatant do nowych probówek typu eppendorf i zamrażano w -80 °C do dalszych analiz. Do oznaczenia stężenia białka w lizatach komórkowych użyto zestawu odczynników Bio-Rad Protein analogicznie jak opisano w rozdziale 3.5.3.

3.6.4. *Western blot*

Rozdzielenie białek z lizatów komórkowych prowadzono na samodzielnie przygotowanych 10% żelach poliakrylamidowych. Żel rozdzielający przygotowywano poprzez połączenie (podane objętości dotyczą przepisu na 1 żel):

- 3,75 ml buforu TRIS-HCl o pH=8,8 (45,5 g TRIS, 1 g SDS) (PChO IITD, Wrocław, Polska),
- 2,5 ml 30% roztworu mieszaniny akrylamid/bis-akrylamid (37,5:1) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA),
- 1,25 ml wody MilliQ (PChO IITD, Wrocław, Polska),
- 37,5 µl 10% APS (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA),
- 7,5 µl odczynnika TEMED (BioShop, Burlington, Kanada).

Tak przygotowaną mieszaninę наносzono pomiędzy szkiełka umieszczone w kasecie do wylewania żeli, następnie pomiędzy szkiełka napipetowywano niewielką ilość wody MilliQ. Wodę usuwano po spolimeryzowaniu żelu, a w jej miejsce nakładano żel rozdzielający, w którego skład wchodziły następujące odczynniki (podane objętości dotyczą przepisu na 1 żel):

- 0,625 ml buforu TRIS-HCl o pH=6,8 (15,1 g TRIS, 1 g SDS) (PChO IITD, Wrocław, Polska),
- 0,1625 ml 30% roztworu mieszaniny akrylamid/bis-akrylamid (37,5:1),
- 0,45 ml wody MilliQ,
- 12,5 µl 10% APS,
- 2,5 µl odczynnika TEMED.

MATERIAŁY I METODY

Po dodaniu żelu zagęszczającego, pomiędzy szkiełkami umieszczano grzebień w celu utworzenia studzienek do nakładania próbek. Po spolimeryzowaniu żelu zagęszczającego grzebień usuwano, a żel przenoszono do aparatu do elektroforezy pionowej Mini Protean Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules, USA) wypełnionym buforem do elektroforezy (25 mM Tris-HCl, 19 mM glicyna, 0,1% SDS) (PChO IITD, Wrocław, Polska). Elektroforezę prowadzono przy stałym napięciu: 100 V oraz natężeniu 0,23 A.

Po zakończonej elektroforezie żel ostrożnie wyjmowano ze szkiełek i płukano przez 15 minut w buforze do transferu (10 mM Tris-HCl, 150 mM glicyna, 20% metanol, pH 8,3) (PChO IITD, Wrocław, Polska). Membranę PVDF o wielkości porów 0,45 μm (Merck, Darmstadt, Niemcy) przycinano na odpowiedni rozmiar i aktywowano poprzez zanurzenie w metanolu (Avantor, Gliwice, Polska) i płukano w buforze do transferu przez 15 minut. W aparacie do transferu (Bio-Rad, Hercules, USA), układano kolejno od anody: bibułki do transferu, membranę, żel, bibułki do transferu po czym nakładano katodę i zamykano aparat. Wszystkie składowe były mocno zwilżone zimnym buforem do transferu. Transfer prowadzono przez 60 min przy stałym natężeniu prądu 0,15 A oraz napięciu 25 V. Po zakończonym transferze membranę płukano przez 10 minut w wodzie MilliQ i blokowano przez 1h w 5% roztworze blokera (odtłuczone mleko w proszku w 0,1% PBS-T (PBS + Tween 20 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA))). Po blokowaniu membranę płukano 3-krotnie po 15 minut w roztworze PBS-T, a następnie na membranę nakładano roztwór I-rzędowego króliczego przeciwciała w roztworze PBS-T z 1% blokerem. Zastosowane przeciwciała oraz ich rozcieńczenia zebrano w tabeli 3.8

Tabela 3.8 Zestawienie przeciwciał wykorzystanych w analizie western blot.

Przeciwciało	Rozcieńczenie	Producent
E-kadheryna	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
N-kadheryna	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
β-katenina	1:2000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
FLT-1/VEGFR	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
PDGFR-α	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
PDGFR-β	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA

MATERIAŁY I METODY

Po całonocnej inkubacji membranę płukano 3-krotnie po 10 minut w roztworze PBS-T, a następnie nakładano na nią roztwór antykróliczego przeciwciała II-rzędowego IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) rozcieńczone 1:10000 w PBS-Tween20 z 1% blokerem, z którym inkubowano membranę przez 1 h, po czym ponownie płukano 3-krotnie po 10 minut w roztworze PBS-T. Po płukaniu na membranę наносono mieszaninę do detekcji, w skład której wchodziły:

- 2,25 ml wody MilliQ,
- 250 μ l 1M roztworu TRIS-HCl o pH=8,8 (PChO IITD, Wrocław, Polska),
- 12,5 μ l luminolu,
- 5 μ l kwasu p-kumarynowego (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA),
- 2,5 μ l 30% roztworu H₂O₂ (Avantor, Gliwice, Polska)

Do odczytu chemiluminescencji użyto CareStream Image Station 4000MM PRO (Carestream, Healthcare, USA) przy następujących ustawieniach aparatu: t=8 min., f stop=3,54, FOV=100,0 mm. Do analizy densytometrycznej użyto programu ImageJ, wyniki przedstawiono jako względną intensywność chemiluminescencji dla danego białka w odniesieniu do intensywności chemiluminescencji wyznaczonej dla β -aktyny. Badanie powtórzono na trzech różnych lisatach komórkowych linii TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 pochodzących z różnych pasaży.

3.6.5. Przygotowanie białka IL-33

Rekombinowane mysie białko IL-33 (BioLegend, San Diego, USA) rozcieńczano dwukrotnie w jałowym PBS-ie z 1% BSA otrzymując stężenie 100 μ g/ml. Białko rozampułkowsywało do jałowych probówek typu eppendorf i zamrażano w -80 °C do dalszych analiz. Rozmrożonych ampulek nie wykorzystywano ponownie.

3.6.6. Przygotowanie komórek do testów adhezji i migracji

Komórki TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 wysiewano w ilości $0,15 \times 10^6$ na szalkę \varnothing 100mm w 6 ml dedykowanego medium i przeniesiono do inkubatora utrzymującego stałe warunki 37°C, 5% CO₂, 95% wilgotności. Po 48 godzinach medium wymieniano na medium z obniżoną zawartością surowicy (FBS 2,5%, Nu-Serum Culture Supplement 2,5%) oraz dodawano rekombinowane białko IL-33 w stężeniach: 1 ng/ml oraz 0,1 ng/ml. Po 24 godzinach komórki ściągano przy użyciu Akutazy (Polgen, Warszawa, Polska), liczone i wykorzystywano do dalszych analiz.

MATERIAŁY I METODY

3.6.7. *Test migracji*

Kolagen typu IV (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) i fibronektynę (SigmaAldrich, Saint Louis) rozpuszczano odpowiednio w 2% roztworze kwasu octowego i wodzie, tak aby uzyskać stężenie 10 µg/ml. Tak przygotowanymi roztworami opłaszczano inserty z porami 8,0 µm (Corning Inc., Nowy Jork, USA) poprzez nakładanie na 24-dołkową płytkę po 500 µl roztworu fibronektyny lub kolagenu i wkładano inserty, do których dodawano po 150 µl roztworu w/w białek. Tak przygotowane inserty inkubowano przez noc w temperaturze 4°C. Następnego dnia inserty płukano dwukrotnie buforem PBS i blokowano niespecyficzne miejsca wiązania poprzez godziną inkubację z 1% roztworem BSA w PBS w 37 °C. Po inkubacji inserty ponownie dwukrotnie płukano PBS, następnie nanoszono po 25x10³ komórek w medium DMEM na insert. Inserty umieszczano na dołki 24-dołkowej płytki, w których znajdowało się po 750 µl medium hodowlanego. Tak przygotowaną płytkę inkubowano przez 3,5 godziny w inkubatorze do hodowli komórkowych. Po inkubacji zlewano medium z insertów i usuwano komórki, które nie przemigrowały za pomocą nawilżonego patyczka higienicznego. Do wybarwiania komórek użyto zestawu RAL DIFF-QUIK™ (RAL Diagnostics, Martillac, France), procedurę barwienia przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta.

Test migracji przez inserty powtarzano 5 krotnie dla obu badanych linii, dodatkowo w każdym pojedynczym teście komórki nakładano na inserty w trzech powtórzeniach.

3.6.8. *Test adhezji do kolagenu i fibrynogenu*

Kolagen typu IV i fibronektynę rozpuszczano odpowiednio w 2% roztworze kwasu octowego i wodzie tak aby uzyskać stężenie 10 µg/ml. Tak przygotowanymi roztworami opłaszczano płytkę 96-dołkową, nakładając po 100 µl fibronektyny lub kolagenu. Płytkę inkubowano przez noc w temperaturze 4°C. Następnego dnia dołki płukano dwukrotnie buforem TSM (20 mM Tris-HCl, pH 7.4 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂) (PChO IITD, Wrocław, Polska) i blokowano niespecyficzne miejsca wiązania poprzez dodanie 100 µl roztworu TSM z 1% BSA. Po 30 minutowej inkubacji w temperaturze 37°C, płytkę ponownie płukano dwukrotnie buforem TSM. Odpowiednią ilość komórek TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 odpipetowywano do

MATERIAŁY I METODY

czystych probówek i wirowano przez 5 minut przy 1300 rpm w 4°C. Osad komórkowy zawieszano w buforze TSM z 0,5% BSA, tak przygotowane komórki nakładano na opłaszczoną płytkę w stężeniu 5×10^5 komórek/dołek w 100 μ l. Po 60 minutowej inkubacji w temperaturze 37°C, płytkę trzykrotnie płukano buforem TSM w celu usunięcia komórek, które nie uległy adhezji. Przylegające komórki wybarwiano poprzez dodanie 50 μ l/dołek 0,2% fioletu krystalicznego (Polpharma, *Polfa* Łódź) w 20% roztworze metanolu. Płytkę inkubowano w ciemności przez 30 minut w temperaturze 37°C, a następnie przemywano roztworem PBS. Związany barwnik rozpuszczano poprzez dodanie 100 μ l metanolu/dołek. Odczytu dokonywano za pomocą uniwersalnego czytnika płytek Synergy 2 (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, USA) przy długości fali 570 nm.

Test adhezji powtarzano 4-5-krotnie, dodatkowo w każdym pojedynczym teście komórki nakładane były w trzech-powtórzeniach.

4. Wyniki

4.1. *Badania in vivo*

4.1.1. *Wzrost i potencjał przerzutowy komórek mysich linii gruczołu krokowego TRAMP-C1 i TRAMP-C2 in vivo*

4.1.1.1 *Model ortotopowy*

U myszy zaszczipionych ortotopowo komórkami mysiego raka gruczołu krokowego TRAMP-C1 lub TRAMP-C2 w trakcie trwania całego eksperymentu kontrolowano masę ciała oraz ich ogólny stan. Grupami kontrolnymi w eksperymencie były myszy zdrowe (opisane na Rycinie 4.1 A jako kontrola) oraz myszy poddane operacji pozorowanej (SHAM). Wzrost masy ciała zwierząt w trakcie eksperymentu obserwowany był we wszystkich badanych grupach, jednak u myszy obarczonych nowotworem wzrost ten był wolniejszy (Rycina 4.1 A). Myszy obarczone nowotworem TRAMP-C2 charakteryzowały się wolniejszym przyrostem masy ciała niż myszy obarczone nowotworem TRAMP-C1.

W trakcie eksperymentu kontrolowano także objętość prostaty w grupach SHAM, TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2. Pomiaru te prowadzono w czterech punktach czasowych w 24, 50, 62 oraz 72 dniu eksperymentu. W dniu pierwszych pomiarów (24 dzień eksperymentu) zaobserwowano większą objętość prostat u myszy zaszczipionych zarówno nowotworem TRAMP-C1 jak i TRAMP-C2 w stosunku do myszy SHAM. Nie odnotowano jednak znaczących różnic pomiędzy nowotworami. W trakcie następných pomiarów zaobserwowano znacznie szybszy wzrost guzów gruczołu krokowego u myszy zaszczipionych nowotworem TRAMP-C2, w 72 dniu średnia objętość guzów w grupie TRAMP-C2 była dwukrotnie wyższa w stosunku do grupy TRAMP-C1 (Rycina 4.1 B). W czasie sekcji prowadzonych w 36, 59 oraz 74 dniu eksperymentu nie zaobserwowano przerzutów makroskopowych w żadnej z grup. Zebrany materiał przekazano do badań histopatologicznych w celu oceny zmian mikroskopowych. Analizie histopatologicznej poddano tkanki płuc, nerek oraz węzłów chłonnych. Mikroskopowe ogniska przerzutowe odnotowano jedynie w węzłach chłonnych w 74 dniu eksperymentu (Rycina 4.1 C). U myszy obarczonych nowotworem TRAMP-C1

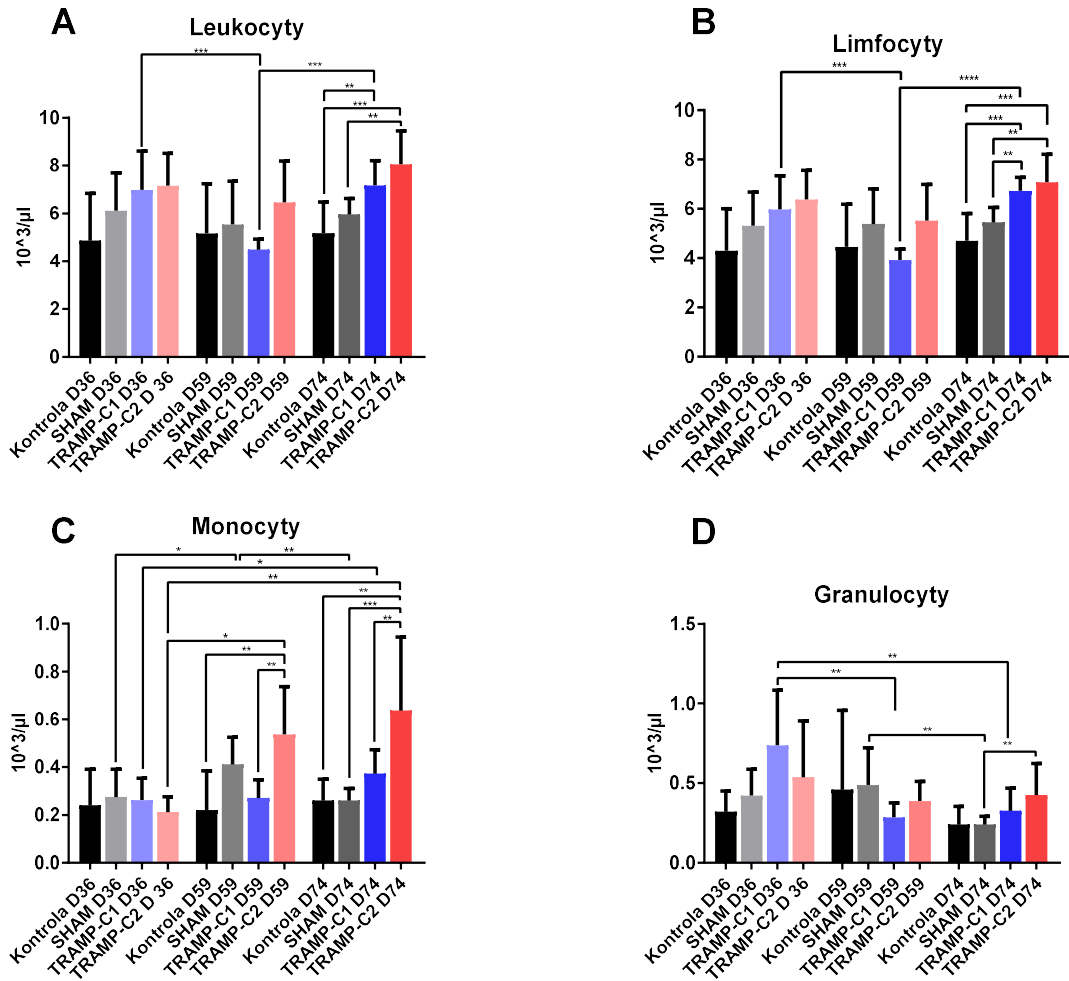
WYNIKI

leukocytów i limfocytów pomiędzy grupami. W 74 dniu eksperymentu obserwowano ponowny wzrost liczby leukocytów i limfocytów w grupie TRAMP-C1, w grupie tej odnotowano także istotnie większą liczbę leukocytów w stosunku do myszy zdrowych, oraz limfocytów w stosunku do myszy zdrowych oraz grupy SHAM. Znacząco większą liczbę leukocytów i limfocytów obserwowano także u myszy obarczonych nowotworem TRAMP-C2 zarówno w stosunku do grupy myszy zdrowych jak i SHAM, a także w mniejszym stopniu w stosunku do grupy TRAMP-C1 (Rycina 4.3 A i B).

W 36 dniu eksperymentu liczba monocytów we wszystkich grupach była zbliżona. W 59 dniu odnotowano natomiast istotny wzrost liczby monocytów w grupach SHAM oraz TRAMP-C2 w stosunku do 36 dnia eksperymentu. Liczba monocytów u myszy obarczonych nowotworem TRAMP-C2 w 59 dniu była istotnie wyższa w stosunku do grupy zdrowej oraz TRAMP-C1. Wraz z rozwojem nowotworu TRAMP-C2 obserwowano dalszy wzrost liczby monocytów. W 74 dniu eksperymentu liczba monocytów w tej grupie była istotnie wyższa w stosunku do pozostałych grup badanych. Wzrost liczby monocytów obserwowano także w trakcie rozwoju nowotworu TRAMP-C1 jednak w mniejszym stopniu (Rycina 4.3 C).

W trakcie rozwoju nowotworu TRAMP-C1 znacząco zmieniała się liczba granulocytów. W 36 dniu eksperymentu u myszy obarczonych nowotworem TRAMP-C1 obserwowano najwyższą liczbę granulocytów na dalszych etapach rozwoju choroby obserwowano jednak znaczący spadek liczby granulocytów w tej grupie. Zmiany w liczbie granulocytów obserwowano także w grupie poddanej operacji SHAM, gdzie odnotowano spadek w 74 dniu eksperymentu. U myszy obarczonych nowotworem TRAMP-C2 w 74 dniu eksperymentu zaobserwowano wzrost liczby granulocytów, istotny statystycznie w porównaniu do grupy SHAM (Rycina 4.3 D).

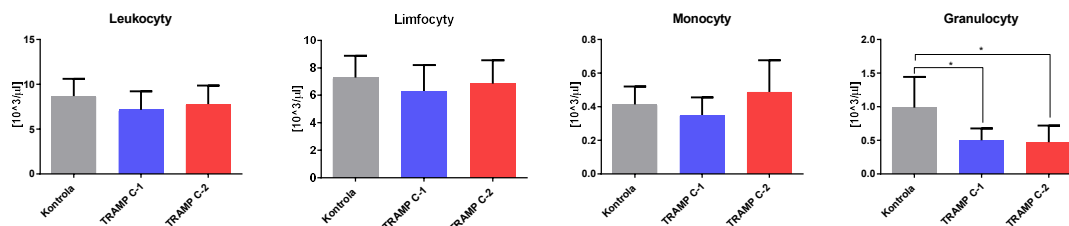
WYNIKI



Rycina 4.3 Analiza wybranych parametrów krwi u myszy zaszczepionych ortotopowo komórkami mysiego raka gruczołu krokowego TRAMP-C1 lub TRAMP-C2; grupami kontrolnymi w eksperymencie były myszy poddane operacji pozorowanej (SHAM) oraz myszy zdrowe (Kontrola). Na wykresach przedstawiono dane w postaci średnich arytmetycznych \pm odchylenie standardowe dla (A) leukocytów, (B) limfocytów, (C) monocytów, (D) granulocytów w 36, 59 oraz 74 dniu eksperymentu. Analizę przeprowadzono przy użyciu testu One-way ANOVA (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$)

Analiza parametrów morfologicznych krwi u myszy po dożylnym podaniu komórek mysich nowotworów gruczołu krokowego wykazała istotny spadek liczby granulocytów w grupach TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 w stosunku do grupy kontrolnej. Nie odnotowano istotnych różnic w liczbie leukocytów, limfocytów, monocytów oraz w pozostałych badanych parametrach morfologicznych (Rycina 4.4).

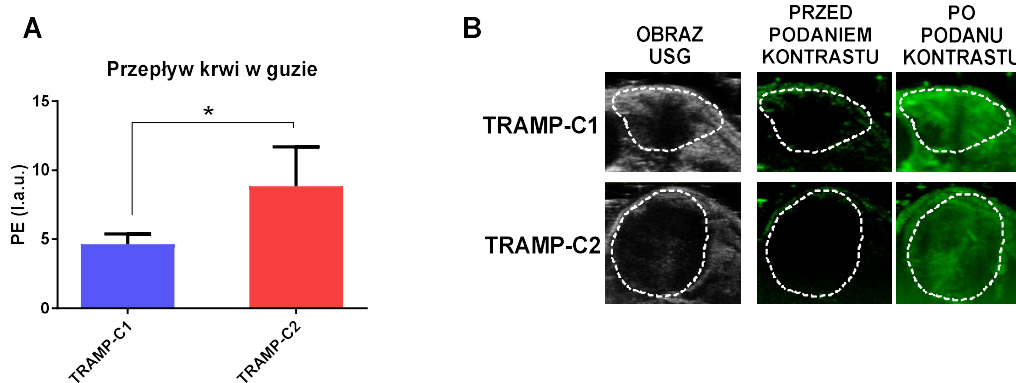
WYNIKI



Rycina 4.4 Analiza wybranych parametrów krwi u myszy po dożylnym podaniu komórek mysiego raka gruczołu krokowego TRAMP-C1 lub TRAMP-C2, grupę kontrolną stanowiły zwierzęta po dożylnym podaniu płynu Hanks'a. Na wykresach przedstawiono dane w postaci średnich arytmetycznych \pm odchylenie standardowe dla leukocytów, limfocytów, monocytów, granulocytów w 70 dniu eksperymentu. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu One-way ANOVA ($*p \leq 0,05$)

4.1.3. Ocena unaczynienia guza nowotworowego

Ocenę unaczynienia guza nowotworowego w modelu ortotopowym prowadzono przy użyciu technik obrazowania ultrasonograficznego po dożylnym podaniu kontrastu umożliwiające ocenę perfuzji krwi w badanej tkance w czasie rzeczywistym. Wyniki obrazowania wskazały na blisko 2-krotnie większy przepływ krwi w guzie TRAMP-C2 w stosunku do guza TRAMP-C1 (Rycina 4.5 A). Zależność tą można zauważyć także na przedstawionych zdjęciach z obrazowania USG (Rycina 4.5. B).



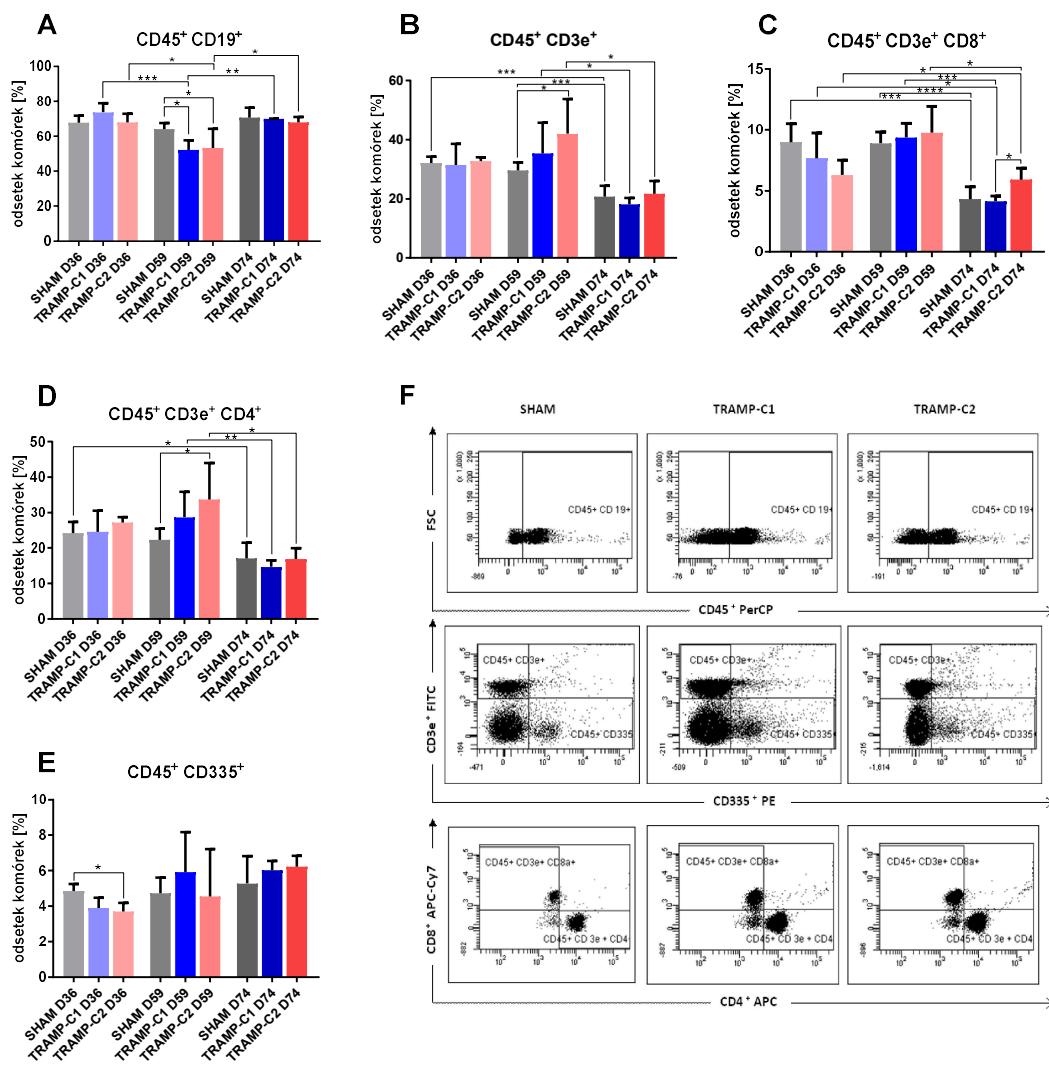
Rycina 4.5 Analiza przepływu krwi w guzie w stosunku do otaczającej tkanki wykonana w 65 dniu eksperymentu. (A) Ilość przepływającej krwi w guzach mysiego raka gruczołu krokowego TRAMP-C1 lub TRAMP-C2 przedstawiona w postaci średnich arytmetycznych \pm odchylenie standardowe. (B) Obraz ultrasonograficzny reprezentatywnych guzów mysiego raka gruczołu krokowego TRAMP-C1 lub TRAMP-C2 przed i po podaniu kontrastu. Obrys guza zaznaczono białą przerywaną linią. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu t ($*p \leq 0,05$)

4.1.4. Analiza subpopulacji limfocytów we krwi myszy obciążonych mysimi rakami gruczołu krokowego

W związku z istotnymi zmianami liczby limfocytów w trakcie rozwoju mysich raków gruczołu krokowego TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2, przy pomocy analizy

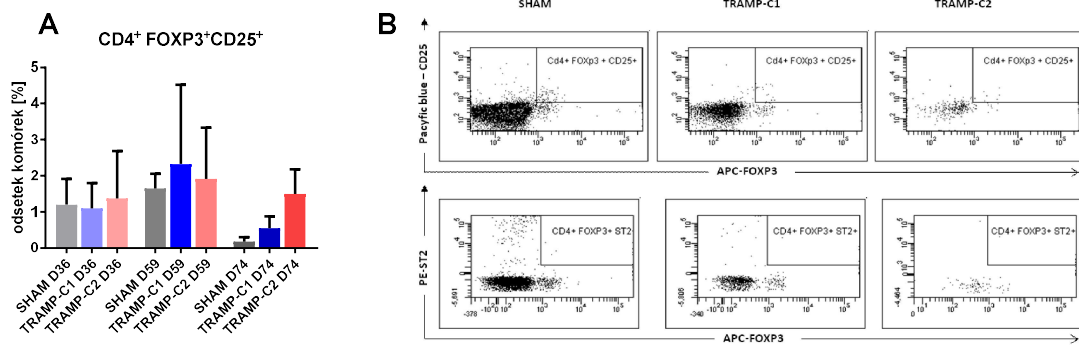
WYNIKI

cytometrycznej określono odsetek poszczególnych populacji limfocytów. Podczas analizy cytometrycznej subpopulacji limfocytów, w pierwszym kroku wyodrębniono komórki $CD45^+$, które następnie rozróżniano na podstawie ekspresji $CD335^+$ (komórki NK) $CD19^+$ (limfocyty B) oraz $CD3e^+$ (limfocyty T). W ramach dalszej analizy wśród komórek $CD45^+ CD3e^+$ określano na podstawie obecności markera $CD4$ -limfocyty T $CD4^+$ lub markera $CD8$ - limfocyty T $CD8^+$. Do analizy subpopulacji komórek Treg, komórki $CD4^+$ wyznakowano pod kątem obecności markerów $CD25^+$, $FOXP3^+$, w ramach dalszej analizy sprawdzano jaki odsetek komórek $CD25^+ FOXP3^+$ posiada receptor ST2.



Rycina 4.6 Odsetek subpopulacji limfocytów we krwi myszy poddanych operacji pozorowanej (SHAM) oraz obciążonych nowotworem TRAMP-C1 i TRAMP-C2. Analizy dokonano za pomocą cytometrii przepływej, poszczególne subpopulacje wyznakowywano specyficznymi dla nich markerami antygenowymi: A. limfocytów B ($CD45^+ CD19^+$), B. limfocytów T ($CD45^+ CD3e^+$), C. limfocytów T $CD8^+$ ($CD45^+ CD3e^+, CD8^+$), D. limfocytów T $CD4^+$ ($CD45^+ CD3e^+ CD4^+$), oraz E. komórek NK ($CD45^+ CD335^+$). F. Przykładowe dot-ploty analizy cytometrycznej subpopulacji limfocytów dla badanych grup.

WYNIKI



Rycina 4.7 Analiza populacji Tregs we krwi obwodowej. A. Odsetek Tregs we krwi myszy poddanych operacji pozorowanej (SHAM) oraz obarczonych nowotworem TRAMP-C1 i TRAMP-C2. Analizy dokonano za pomocą cytometrii przepływej, przy użyciu specyficznych dla populacji Tregs markerów (CD4, CD25, FOXP3). B. Przykładowe dot-ploty analizy cytometrycznej populacji Treg oraz Treg ST2⁺ dla badanych grup.

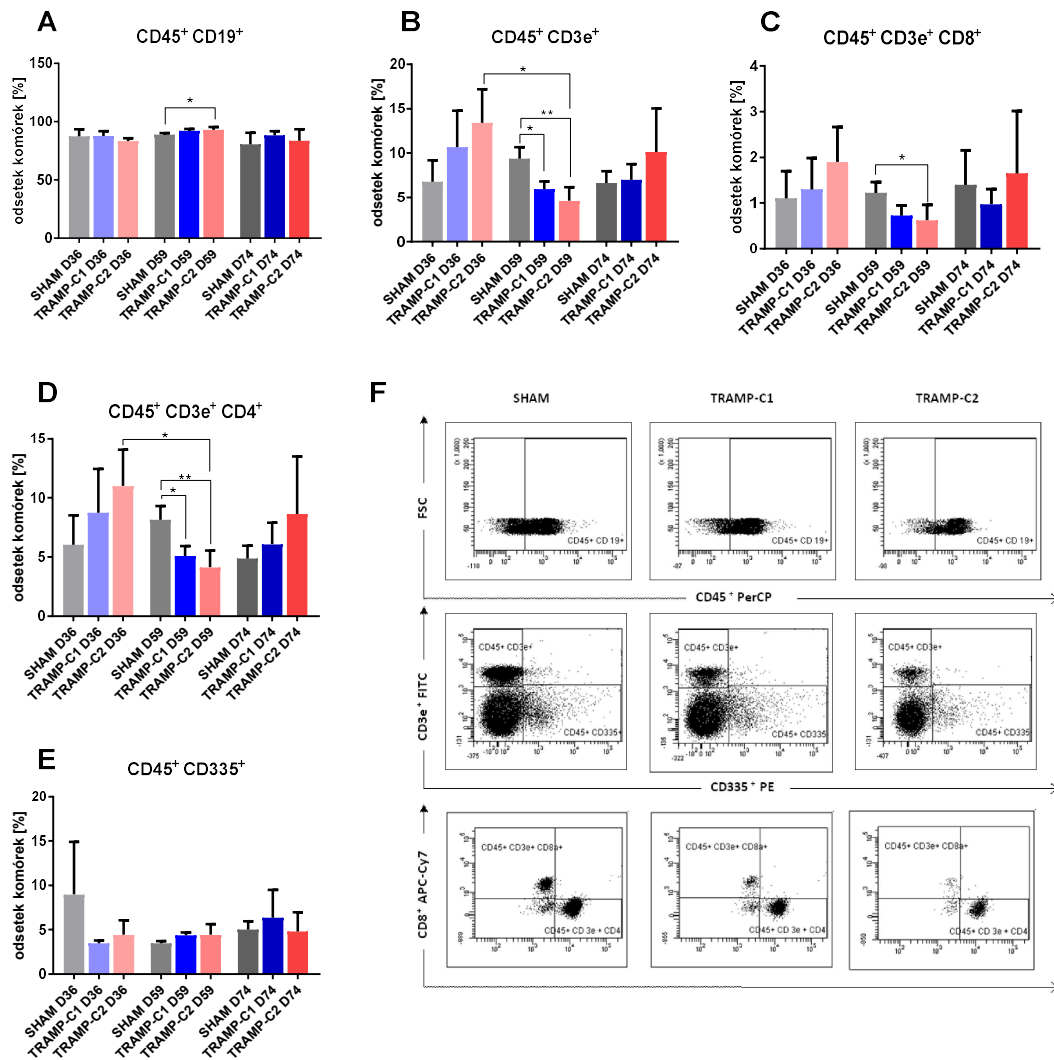
W cytometrycznej analizie subpopulacji limfocytów we krwi zaobserwowano istotny spadek odsetka limfocytów B (CD19⁺) (Rycina 4.6 A) u myszy obarczonych nowotworem TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 w 59 dniu eksperymentu. W dniu tym odnotowano także istotną różnicę w odsetku limfocytów B u myszy obarczonych nowotworami prostaty w stosunku do grupy kontrolnej SHAM. W 74 dniu eksperymentu poziom limfocytów B u myszy z nowotworem TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 powrócił do poziomu z dnia 36 zbliżonego do poziomu uzyskiwanego przez cały okres eksperymentu dla grupy SHAM. Odsetek ogólnej subpopulacji limfocytów T (CD3e⁺) (Rycina 4.6 B) oraz limfocytów T CD4⁺ (Rycina 4.6 D) istotnie wzrósł w 59 dniu eksperymentu u myszy obarczonych nowotworem TRAMP-C2; podobną tendencję, choć nie istotną statystycznie, obserwowano u myszy obarczonych nowotworem TRAMP-C1. W 74 dniu eksperymentu odnotowano istotny spadek ogólnej populacji limfocytów T oraz limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ (Rycina 4.6 C) we wszystkich badanych grupach również w kontrolnej grupie SHAM. Dodatkowo w 74 dniu eksperymentu obserwowano istotnie wyższy odsetek limfocytów T CD8⁺ u myszy obarczonych nowotworem TRAMP-C2 w stosunku do myszy obarczonych komórkami TRAMP-C1. Istotne zmiany w odsetku komórek NK (CD45⁺, CD335⁺) (Rycina 4.6 E) obserwowano jedynie w 36 dniu eksperymentu dla myszy obarczonych nowotworem TRAMP-C2 w stosunku do grupy SHAM, dla grupy TRAMP-C1 obserwowano podobne tendencje jednak bez istotności statystycznych. Na późniejszych etapach rozwoju nowotworu nie zauważono istotnych różnic w poziomie komórek NK.

Odsetek komórek Treg (CD4⁺ FOXP3⁺ CD25⁺) (Rycina 4.7) wzrastał wraz z rozwojem nowotworu u myszy obarczonych nowotworem TRAMP-C2. W 74 dniu

WYNIKI

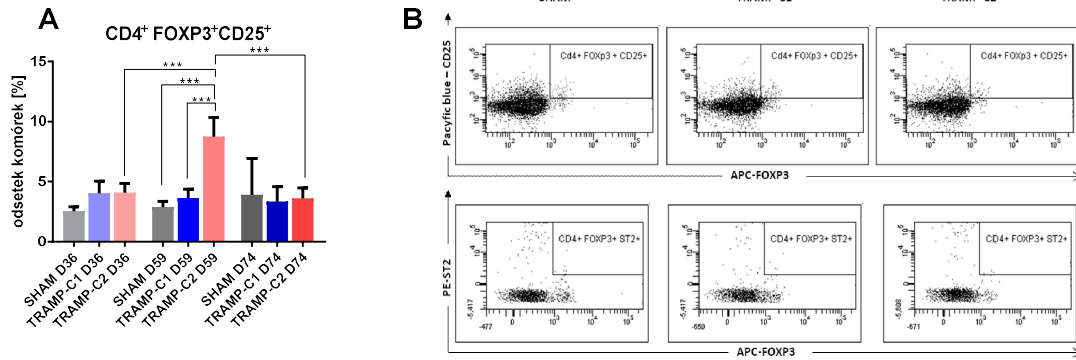
obserwowano istotnie wyższy odsetek Treg w grupie TRAMP-C2 w stosunku do TRAMP-C1 oraz grupy SHAM. Podobne tendencje, choć nie istotne statystycznie obserwowano także 54 dniu eksperymentu. W 36 dniu wszystkie badane grupy charakteryzowały się odsetkiem Treg na podobnym poziomie. W trakcie analizy cytometrycznej oceniano także odsetek komórek Treg wykazujących ekspresję receptora ST2⁺ na swojej powierzchni, jednak ilość komórek TregST2⁺, była zbyt niska aby dokonać rzetelnej analizy.

4.1.5. Analiza subpopulacji limfocytów w śledzionie myszy obarczonych mysimi rakami gruczołu krokowego



Rycina 4.8 Odsetek subpopulacji limfocytów w śledzionie myszy poddanych operacji pozorowanej (SHAM) oraz obarczonych nowotworem TRAMP-C1 i TRAMP-C2. Analizy dokonano za pomocą cytometrii przepływej, szczególnie subpopulacje wyznakowywano specyficznymi dla nich markerami antygenowymi: A. limfocytów B (CD45⁺ CD19⁺), B. limfocytów T (CD45⁺ CD3e⁺), C limfocytów T CD8⁺ (CD45⁺ CD3e⁺ CD8⁺), D. limfocytów T CD4⁺ (CD45⁺ CD3e⁺ CD4⁺), oraz E. komórek NK (CD45⁺ CD335⁺). F. Przykładowe dot-ploty analizy cytometrycznej subpopulacji limfocytów dla badanych grup.

WYNIKI



Rycina 4.9 Analiza populacji Tregs w śledzionie. A. Odsetek Tregs w śledzionie myszy poddanych operacji pozorowanej (SHAM) oraz obarczonych nowotworem TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2. Analizy dokonano za pomocą cytometrii przepływowej, przy użyciu specyficznych dla populacji Tregs markerów (CD4, CD25, FOXP3). B. Przykładowe dot-ploty analizy cytometrycznej populacji Treg oraz Treg ST2⁺ dla badanych grup.

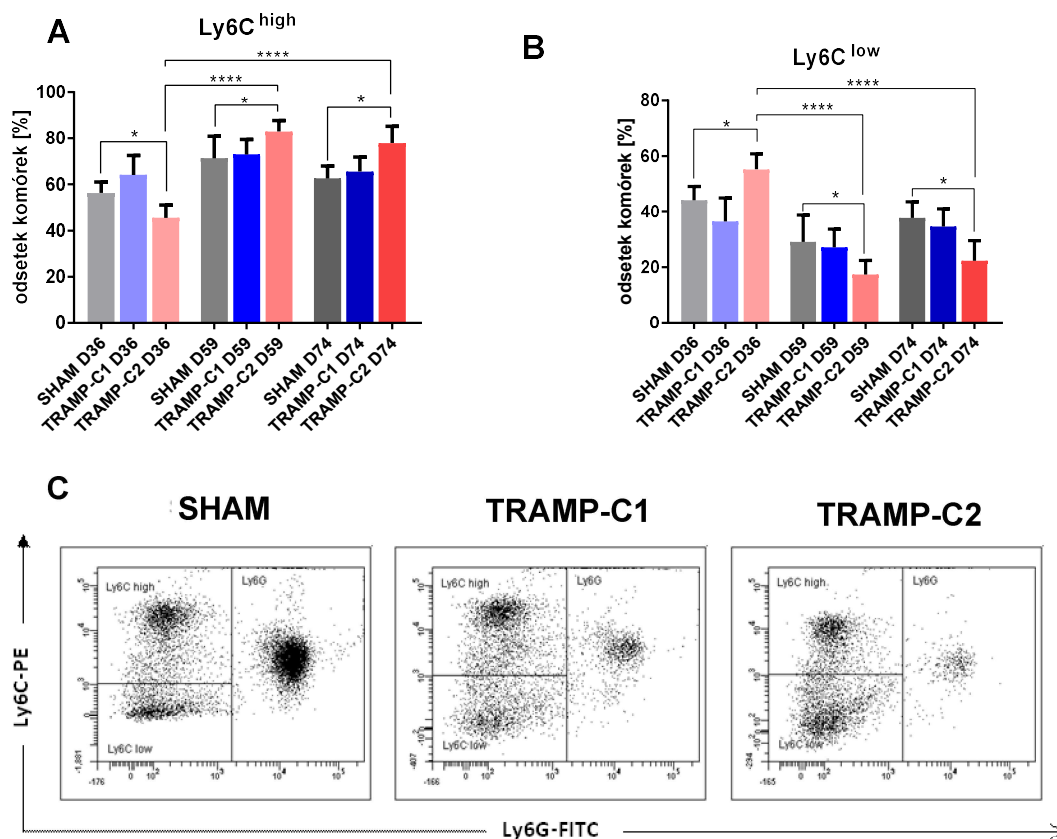
W analizie cytometrycznej subpopulacji limfocytów w śledzionie zaobserwowano istotny wzrost odsetka limfocytów B (CD19⁺) (Rycina 4.8 A) w 59 dniu eksperymentu u myszy obarczonych nowotworem TRAMP-C2. W 36 oraz 74 dniu eksperymentu limfocyty B były na podobnym poziomie we wszystkich badanych grupach. Znacznie więcej różnic obserwowano natomiast w odsetku ogólnej subpopulacji limfocytów T (CD3e⁺) (Rycina 4.8 B) oraz limfocytów T CD4⁺ (Rycina 4.8 D) i CD8⁺ (Rycina 4.8 C). Już w 36 dniu eksperymentu obserwowano istotny wzrost odsetka limfocytów T oraz limfocytów T CD4⁺ w grupie TRAMP-C2 w stosunku do grupy SHAM, podobne tendencje, choć nie istotne statystycznie, obserwowano dla limfocytów T CD8⁺. Grupa TRAMP-C1 również charakteryzowała się wyższymi odsetkami ogólnej populacji limfocytów T oraz limfocytów T CD4⁺ i T CD8⁺, różnice te były jednak mniejsze i nieistotne statystycznie. W 54 dniu eksperymentu zaobserwowano natomiast znaczący spadek ogólnej populacji limfocytów T oraz limfocytów T CD4⁺ i T CD8⁺ u myszy obarczonych zarówno nowotworem TRAMP-C1 jak i TRAMP-C2. W dniu tym odnotowano istotnie niższe poziomy ogólnej populacji limfocytów T oraz limfocytów T CD4⁺ i T CD8⁺ dla grupy TRAMP-C2, oraz ogólnej populacji limfocytów T oraz limfocytów T CD4⁺ dla grupy TRAMP-C1 w stosunku do grupy SHAM. W 74 dniu eksperymentu obserwowano tendencję do ponownego wzrostu odsetka ogólnej populacji limfocytów T oraz limfocytów T CD4⁺ i T CD8⁺ w grupie TRAMP-C2, w grupie TRAMP-C1 odsetek ten wzrósł nieznacznie w stosunku do dnia 59. W trakcie całego eksperymentu nie zaobserwowano istotnych zmian w poziomie komórek NK (CD335⁺) (Rycina 4.8 E).

WYNIKI

Dla myszy obarczonych nowotworem TRAMP-C2 w 59 dniu eksperymentu obserwowano istotny, ponad dwukrotny wzrost odsetka komórek Treg ($CD4^+$, $FOXP3^+$, $CD25^+$) w śledzionie. W 36 i 74 dniu eksperymentu odsetek komórek Treg był dla wszystkich badanych grup na podobnym poziomie.

Przy pomocy analiz cytometrycznych oceniano także odsetek Treg wykazujących ekspresję receptora ST-2, jednak analogicznie jak w analizie subpopulacji limfocytów we krwi, liczba komórek Treg $ST2^+$ była zbyt niska aby rzetelnie dokonać analizy.

4.1.6. Analiza odsetka monocytów $Ly6C^{low}$ i $Ly6C^{high}$ we krwi myszy obarczonych mysimi rakami gruczołu krokowego



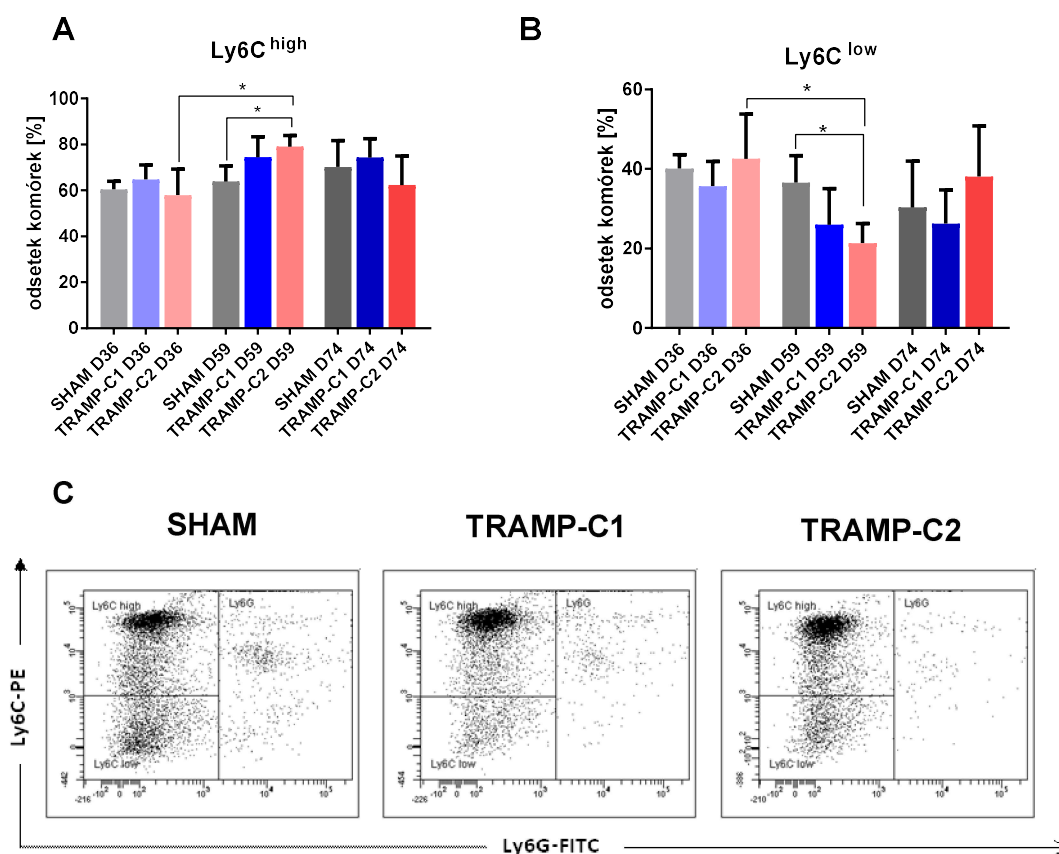
Rycina 4.10 Analiza subpopulacji monocytów we krwi myszy poddanych operacji pozorowanej (SHAM) oraz obarczonych nowotworem TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2. Analizy dokonano za pomocą cytometrii przepływowej, rozróżniając monocyty wyznakowane za pomocą markera CD11b na monocyty A. klasyczne ($Ly6C^{high}$) i B. nieklasyczne ($Ly6C^{low}$), C. Przykładowe dot-ploty analizy cytometrycznej subpopulacji monocytów dla badanych grup.

Analiza morfologiczna krwi myszy obarczonych nowotworami TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 wykazała istotne różnice w poziomie monocytów. W związku z powyższym postanowiono sprawdzić także subpopulacje monocytów

WYNIKI

z wykorzystaniem markera Ly6C za pomocą którego wyznakowano populacje monocytów klasycznych (Ly6C^{high}) i nieklasycznych (Ly6C^{low}) (Rycina 4.10). Zmiany w równowadze pomiędzy monocytami klasycznymi i nieklasycznym we krwi obwodowej obserwowano głównie u myszy obarczonych nowotworem TRAMP-C2. W 36 dniu eksperymentu odnotowano wyższy stosunek monocytów nieklasycznych w granicach 55%, natomiast w 59 i 74 dniu eksperymentu ich odsetek istotnie zmalał do poziomu 20% na korzyść monocytów klasycznych. Dla pozostałych grup TRAMP-C1 oraz SHAM nie obserwowano istotnych zmian w odsetku monocytów klasycznych i nie klasycznych.

4.1.7. Analiza odsetka monocytów Ly6C^{low} i LY6C^{high} w śledzience myszy obarczonych mysimi rakami gruczołu krokowego



Rycina 4.11 Analiza subpopulacji monocytów w śledzience myszy poddanych operacji pozorowanej (SHAM) oraz obarczonych nowotworem TRAMP-C1 i TRAMP-C2. Analizy dokonano za pomocą cytometrii przepływowej, rozróżniając monocyty wyznakowane za pomocą markera CD11b na monocyty A. klasyczne (Ly6C^{high}) i B. nieklasyczne (Ly6C^{low}), C. Przykładowe dot-ploty analizy cytometrycznej subpopulacji monocytów dla badanych grup.

WYNIKI

Analizę subpopulacji monocytów klasycznych (Ly6C^{high}) i nieklasycznych (Ly6C^{low}) (Rycina 4.11), przeprowadzono także w zawieszynie komórek śledziony. Powyższa analiza wykazała istotne zmiany subpopulacji monocytów u myszy obciążonych nowotworem TRAMP-C2, w grupie tej zaobserwowano istotny spadek monocytów nieklasycznych z poziomu 40% w 36 dniu do 20% w dniu 59 na korzyść monocytów klasycznych. Następnie w 74 dniu eksperymentu poziom ten ponownie wrócił do poziomu około 40%. Dla myszy obciążonych nowotworem TRAMP-C1 również obserwowano spadek monocytów nieklasycznych w 59 dniu, poziom ten został jednak utrzymany w 74 dniu eksperymentu, zmiany te były jednak dużo mniejsze i nieistotne statystycznie.

4.1.8. Analiza profilu cytokinowego u myszy obciążonych mysimi nowotworami gruczołu krokowego

W celu określenia profilu cytokinowego u myszy obciążonych mysimi nowotworami gruczołu krokowego TRAMP-C1 lub TRAMP-C2 wykonano przesiewowe testy, pozwalające na względną ocenę ilości cytokin w osoczu oraz tkance nowotworowej. Do badań tych wykorzystano macierze cytokinowe umożliwiające badanie 111 cytokin jednocześnie. Dzięki tym przesiewowym analizom wybrano kierunek dalszych, bardziej szczegółowych badań.

4.1.8.1. Profil cytokinowy w osoczu

Poziom cytokin w osoczu zbadano przy użyciu macierzy cytokinowej w 36, 59 oraz 74 dniu eksperymentu. Wyniki przedstawiono jako współczynnik intensywności chemiluminescencji danej cytokiny w stosunku do chemiluminescencji pól referencyjnych (kontrola pozytywna) znajdujących się na membranie macierzy, z uwzględnieniem wartości tła (Rycina 4.12).

W grupie chemokin obserwowano blisko dwukrotnie wyższe stężenia CXCL1/KC u myszy z nowotworami TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 w 36 oraz 59 dniu eksperymentu w stosunku do grupy SHAM. W 74 dniu eksperymentu odnotowano dwukrotny spadek CXCL1/KC w grupie TRAMP-C2 w stosunku do dnia 59. Myszy obciążone nowotworem TRAMP-C2 w 74 dniu eksperymentu charakteryzowały się również około dwukrotnie niższym poziomem czynników takich jak: CCL2, CCL3 oraz CCL20 w stosunku do grup TRAMP-C1 oraz SHAM. Dodatkowo, w trakcie rozwoju

WYNIKI

nowotworu TRAMP-C2 obserwowany jest spadek stężenia tych czynników. W grupie TRAMP-C2 obserwowano blisko dwukrotnie podwyższony poziom CCL21 w 36 oraz 59 dniu eksperymentu w stosunku do myszy SHAM; analogiczne różnice obserwowano dla TRAMP-C1 w 59 dniu.

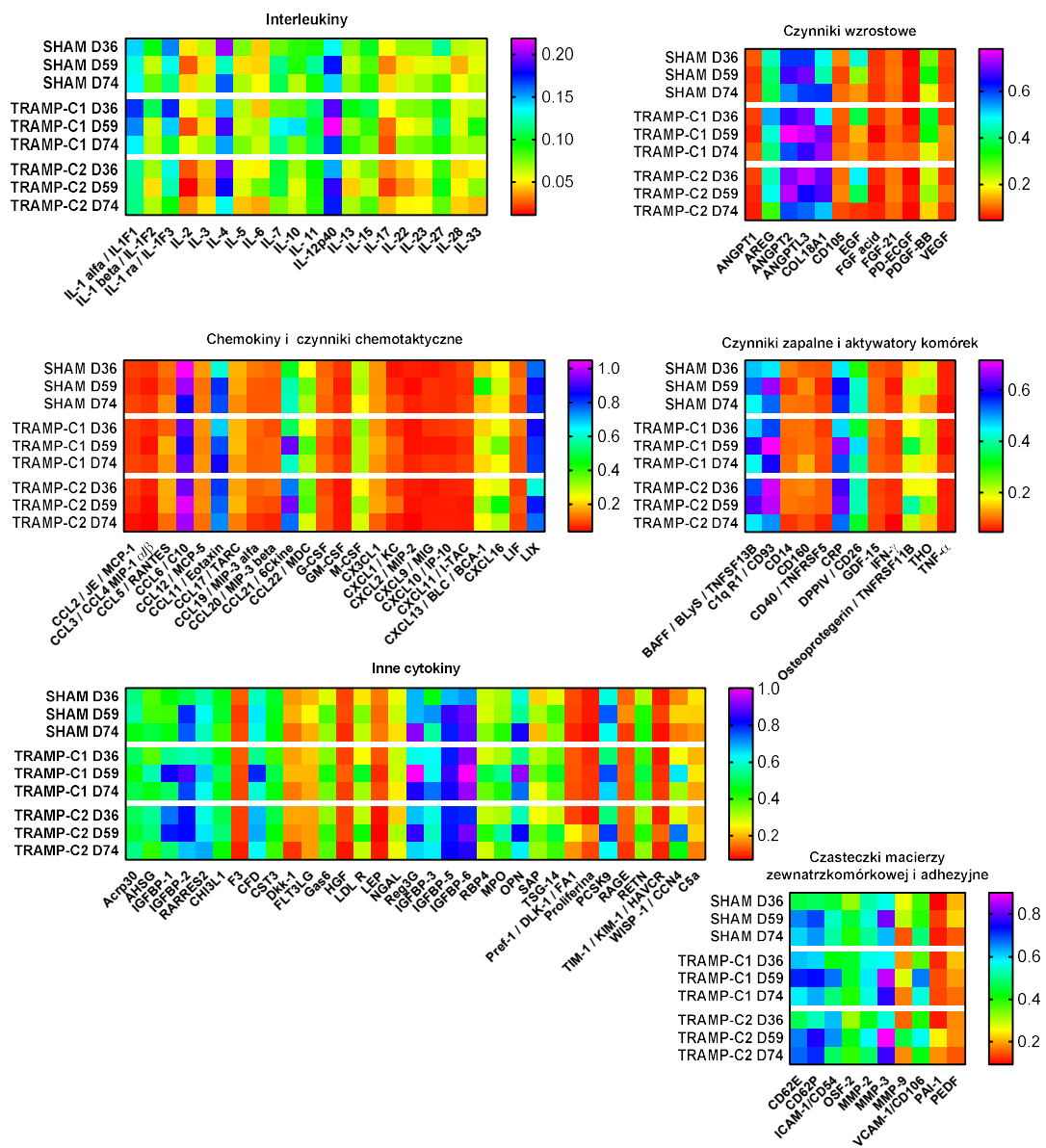
Wraz z rozwojem nowotworu TRAMP-C1 obserwowano dwukrotny spadek stężenia IL-1 β /IL-1F2 oraz IL-17. Poziom IL-17 w grupie TRAMP-C2 w 59 dniu eksperymentu spadł w stosunku do 36 dnia, po czym ponownie wzrósł w 74 dniu. W dniu tym odnotowano także blisko dwukrotnie wyższy poziom IL-17 w grupie TRAMP-C2 w stosunku do grupy TRAMP-C1. Odwrotną zależność obserwowano w 74 dniu dla IL-5, IL-6, IL-7, których wyższy poziom odnotowano w grupie TRAMP-C1. Stężenie tych cytokin malało wraz z rozwojem nowotworu TRAMP-C2 i rosło w nowotworze TRAMP-C1. Grupa TRAMP-C1 charakteryzowała się także ponad dwukrotnie wyższym poziomem IL-10 w 59 dniu eksperymentu. W trakcie całego eksperymentu zaobserwowano blisko dwukrotnie niższy poziom IL-2 w grupie TRAMP-2 w stosunku do grupy TRAMP-C1 oraz SHAM. W przypadku IL-33 zarówno u myszy obarczonych nowotworem TRAMP-C1 jak i TRAMP-C2 zauważono początkowo blisko dwukrotny wzrost stężenia interleukiny w 59 dniu w stosunku do 36 dnia eksperymentu, a następnie spadek w 74 dniu. W ostatnim dniu doświadczenia odnotowano także blisko dwukrotnie niższe stężenie IL-33 w grupie TRAMP-C2 w stosunku do grup SHAM oraz TRAMP-C1.

Wśród czynników wzrostowych największe zmiany obserwowano dla naskórkowego czynnika wzrostu (*ang. epidermal growth factor*, EGF), którego poziom we wszystkich badanych grupach spadał wraz z czasem trwania eksperymentu. W 59 dniu eksperymentu obserwowano ponad dwukrotnie wyższy poziom EGF dla grupy TRAMP-C2 w stosunku do TRAMP-C1, w 74 dniu ponad 6-krotny spadek EGF w grupie TRAMP-C2 w stosunku do dnia 36 i 5-krotny w stosunku do dnia 59. U myszy obarczonych nowotworem TRAMP-C1 w 74 dniu zaobserwowano także dwukrotnie wyższy poziom PD-ECGF w stosunku do grupy SHAM i TRAMP-C2.

Wśród czynników zapalnych i aktywatorów komórek zaobserwowano blisko dwukrotnie niższy poziom INF- γ w grupie TRAMP-C2 w stosunku do TRAMP-C1 oraz SHAM w 74 dniu eksperymentu. W grupie cząsteczek macierzy zewnątrzkomórkowej oraz cząsteczek adhezyjnych największe różnice pomiędzy nowotworami obserwowano

WYNIKI

w poziomie MMP-9 oraz serpiny E1 w 59 dniu eksperymentu. Dwukrotnie wyższy poziom tych czynników odnotowano w 59 dniu dla grupy TRAMP-C2. Stężenie MMP-9 w grupie TRAMP-C2 w 59 dniu eksperymentu było blisko trzykrotnie wyższe w stosunku do dnia 36 i 74. W 59 dniu obserwowano także dwukrotny spadek MMP-3 oraz serpiny E1 (PAI-1) u myszy obciążonych nowotworem TRAMP-C2 oraz blisko dwukrotny spadek ICAM-1, MMP-3 oraz VCAM-1 u myszy z nowotworem TRAMP-C1.



Rycina 4.12 Profil cytokin w osoczu myszy obciążonych mysim rakiem gruczołu krokowego TRAMP-C1 lub TRAMP-C2. Grupami kontrolnymi w eksperymencie były myszy poddane operacji SHAM. Wyniki przedstawiono w postaci heat-mapy ukazującej współczynnik intensywności chemiluminescencji danej cytokiny w stosunku do chemiluminescencji pól referencyjnych znajdujących się na membranie macierzy, z uwzględnieniem wartości t_{la}.

WYNIKI

Wśród pozostałych badanych cytokin w grupie TRAMP-C2 obserwowano w 59 dniu ponad dwukrotny wzrost stężenia Prf-1, proliferyny oraz WISP-1, w 74 dniu natomiast odnotowano spadek ich stężenia. Podobne zmiany stężeń odnotowano w grupie TRAMP-C1 dla IGFBP-1, oraz WISP-1. Dodatkowo w grupie TRAMP-C1 w 59 dniu doszło do blisko dwukrotnego wzrostu stężenia: LDL R, RBP-4, mieloperoksydazy (MPO) oraz osteopontyny (OPN). Różnice pomiędzy nowotworami odnotowano w poziomie Pref-1 oraz proliferyny, których dwukrotnie wyższym poziomem charakteryzowała się grupa TRAMP-C2.

4.1.8.2. Profil cytokinowy w guzie nowotworowym

Poziom cytokin w lizatach z guzów nowotworowych zbadano przy użyciu macierzy cytokinowej w materiale pobranym od myszy obarczonych nowotworem TRAMP-C1 lub TRAMP-C2 w 59 oraz 74 dniu eksperymentu. Wyniki przedstawiono jako współczynnik intensywności chemiluminescencji danej cytokiny w stosunku do chemiluminescencji pól referencyjnych (kontrola pozytywna) znajdujących się na membranie macierzy, z uwzględnieniem wartości tła (Rycina 4.13).

W przeprowadzonej analizie w trakcie rozwoju nowotworu TRAMP-C2 zaobserwowano nieznaczny spadek poziomu chemokin takich jak: CX3CL1, CXCL1, CXCL9, CXCL10. Wraz z rozwojem choroby w guzach myszy TRAMP-C2 odnotowano blisko dwukrotny wzrost stężenia CCL12, oraz CCL6, jednocześnie w 74 dniu eksperymentu zarówno poziom CCL12 jak i CCL6 w grupie TRAMP-C2 był dwukrotnie wyższy niż w grupie TRAMP-C1. W rozwoju nowotworu TRAMP-C2 zaobserwowano również blisko dwukrotny spadek w guzie poziomu CCL2 oraz CCL3, poziom tych czynników był wyższy w 74 dniu eksperymentu z grupy TRAMP-C1 w stosunku do grupy TRAMP-C2. W grupie interleukin największe różnice zaobserwowano dla IL-33. Zarówno w guzie TRAMP-C1 jak i TRAMP-C2 wraz z rozwojem choroby blisko dwukrotnie spadł poziom IL-33. Dodatkowo obserwowano różnice pomiędzy nowotworami dla tej interleukiny, zarówno w 59 jak i w 74 dniu eksperymentu ponad dwukrotnie wyższym jej poziomem charakteryzowała się grupa TRAMP-C1.

Różnice pomiędzy grupami obserwowano także w poziomie ekspresji czynników wzrostowych, gdzie wyższe stężenia EGF oraz amfireguliny (AREG) odnotowano w tkance nowotworowej TRAMP-C1. Jednocześnie obserwowano wzrost stężenia EGF

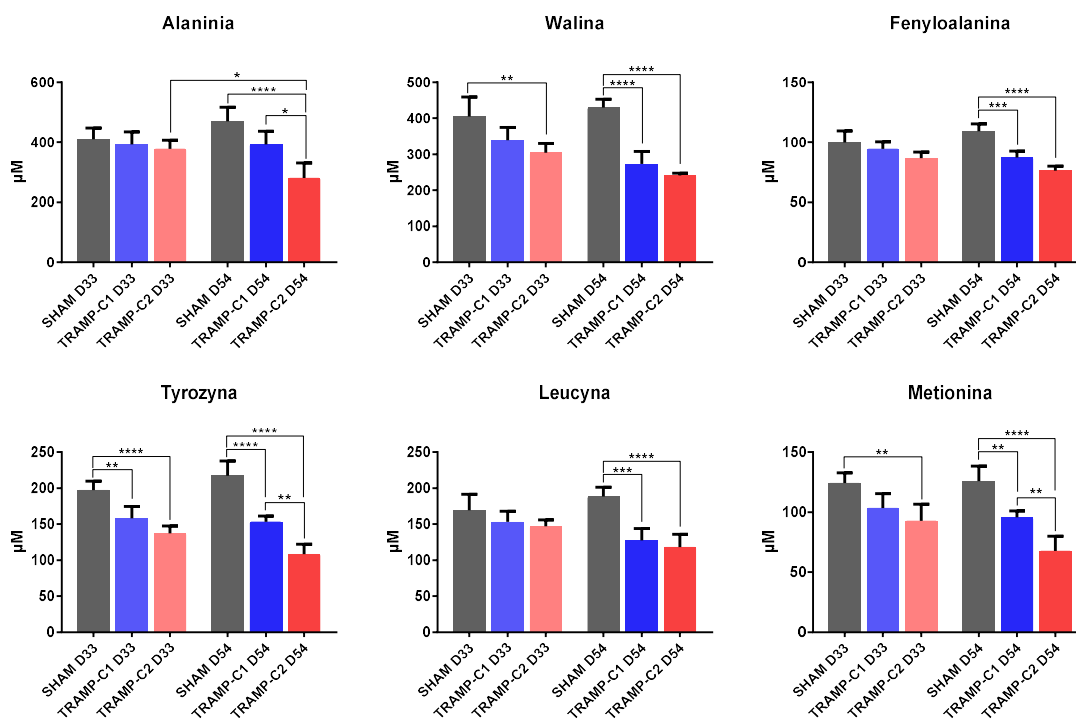
WYNIKI

4.1.9. Analiza ekspresji genów związanych z procesem inwazji i przerzutowania w tkance nowotworowej

Największe różnice w ekspresji badanych genów pomiędzy nowotworem TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 obserwowano w 74 dniu eksperymentu. W tym dniu tym odnotowano wyższą ekspresję *Ccl7*, *Cdh11* (kadheryna 11), *Cdkn2a* (zależny od cykliny inhibitor kinazy 2A) oraz *Mmp10*, *13* i *3* dla guzów TRAMP-C2. W ostatnim dniu eksperymentu w guzach TRAMP-C1 natomiast obserwowano wyższą ekspresję *Cdh1*, *Kiss1*, oraz *Mmp7*. Na szczególną uwagę zwraca fakt istotnych zmian ekspresji genów kodujących cząsteczki adhezyjne e-kadherynę oraz kadherynę 11. Zarówno w guzie TRAMP-C1 jak i TRAMP-C2 obserwowano istotny wzrost ekspresji *Cdh11* w 54 dniu eksperymentu i ponowny spadek do poziomu z dnia 36 w dniu 74, odwrotne tendencje obserwowano dla *Cdh1* dla którego w 54 dniu odnotowano spadek, a następnie powrót do wcześniejszego poziomu w 74 dniu. Wraz z rozwojem nowotworów obserwowano istotne zmiany w ekspresji genów kodujących MMPs. W guzie TRAMP-C2 ekspresja *Mmp10* i *Mmp13* wzrosła w 54 dniu eksperymentu i utrzymywała się na podobnym poziomie w dniu 74, natomiast ekspresja *Mmp3* rosła wraz z rozwojem guza zarówno w 54 jak i 74 dniu eksperymentu. W 54 dniu eksperymentu w guzie TRAMP-C2 obserwowano spadek ekspresji *Mmp7* utrzymujący się także w dniu 74. W guzie TRAMP-C1 obserwowano istotne zmiany ekspresji *Mmp13*, która istotnie wzrosła w 54 dniu i powracała do poziomu z 36 dnia w dniu 74. Odwrotne tendencje obserwowano dla *Mmp7* którego ekspresja spadła w 54 dniu, po czym wzrosła w dniu 74. Spośród pozostałych enzymów istotne różnice obserwowano dla ekspresji *Timp4* (inhibitor metaloproteinaz 4), którego wyższą ekspresję obserwowano w 36 dniu dla guzów TRAMP-C2 w stosunku do TRAMP-C1; wraz z rozwojem guza TRAMP-C2 ekspresja *Timp4* znacznie spadła. Natomiast ekspresja *Cdkn2a* w obu nowotworach spadała w 54 dniu eksperymentu i pozostawała na podobnym poziomie w 74 dni dla guza TRAMP-C2, natomiast w guzie TRAMP-C1 powróciła do poziomu z dnia 36.

WYNIKI

i metioniny różnice pomiędzy grupami w 54 dniu eksperymentu były istotne statystycznie.



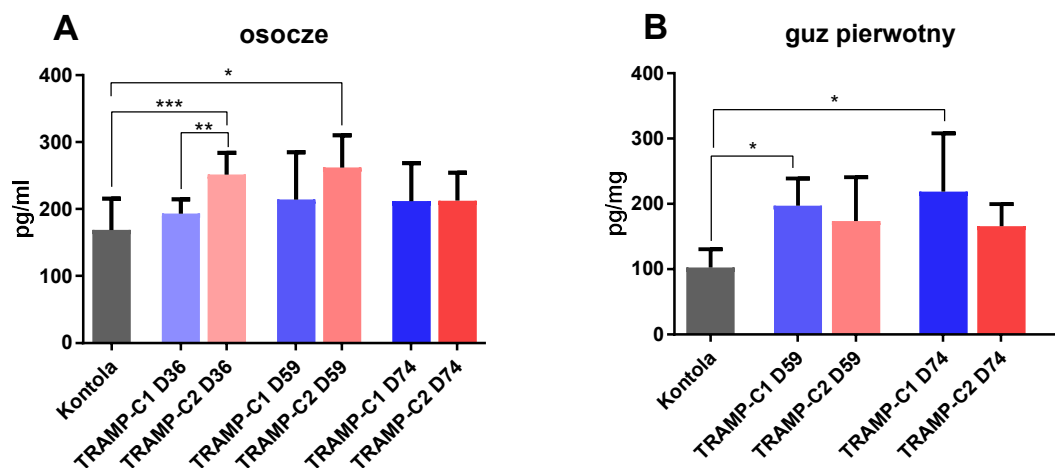
Rycina 4.15 Profil aminokwasowy w osoczu myszy obciążonych mysim nowotworem gruczołu krokowego w 33 oraz 54 dniu eksperymentu. Grupę kontrolną stanowiły myszy poddane operacji pozorowanej (SHAM). Wyniki na wykresie przedstawiono w formie średniej \pm odchylenie standardowe. Analizę przeprowadzono przy użyciu testu One-way ANOVA (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$)

4.1.11. Pomiar stężenia IL-33 w osoczu oraz tkance nowotworowej myszy obciążonych mysim rakiem gruczołu krokowego.

Na podstawie wyników uzyskanych w analizie macierzy cytokinowej, do dalszych badań wyselekcjonowano IL-33. Choć rola IL-33 w rozwoju nowotworów jest intensywnie badana w ostatnich latach, w dostępnym piśmiennictwie istnieje niewiele danych mówiących o jej roli w rozwoju raka prostaty. W osoczu największe różnice obserwowano w 36 dniu eksperymentu, gdzie stężenie IL-33 u myszy obciążonych komórkami TRAMP-C2 było istotnie wyższe zarówno w stosunku do grupy kontrolnej, jak i grupy TRAMP-C1. W 59 dniu różnice istotne statystycznie obserwowano już jedynie w stosunku do grupy kontrolnej, choć nadal zauważany jest wyższy poziom IL-33 w grupie TRAMP-C2 w stosunku do TRAMP-C1. Do wyrównania stężeń IL-33 w osoczu myszy obciążonych nowotworem TRAMP-C1 i TRAMP-C2 doszło w 74 dniu eksperymentu (Rycina 4.16 A).

WYNIKI

W tkance nowotworowej, zarówno w 59 jak i w 74 dniu eksperymentu obserwowano statystycznie istotnie wyższe stężenia IL-33 w grupie TRAMP-C1 w stosunku do grupy kontrolnej. Choć podobne tendencje obserwowano dla grupy TRAMP-C2, różnice te nie były istotne statystycznie. Nie odnotowano też istotnych różnic pomiędzy grupami; obserwowany jest jedynie niewiele wyższy poziom IL-33 w guzie TRAMP-C1 w stosunku do TRAMP-C2 (Rycina 4.16 B).



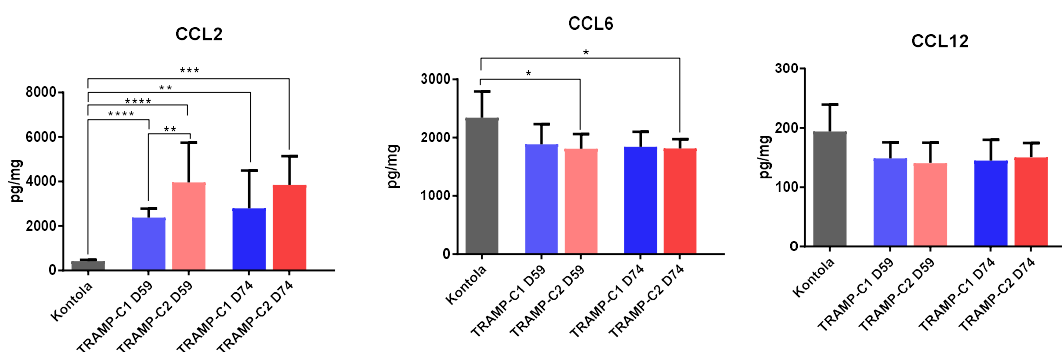
Rycina 4.16 Stężenie IL-33 w osoczu oraz lizatach z guzów nowotworowych myszy obciążonych mysim nowotworem gruczołu krokowego TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2. Kontrolę stanowiło osocze oraz lizaty z prostaty myszy zdrowych. Wyniki na wykresie przedstawiono w formie średniej \pm odchylenie standardowe. Analizę przeprowadzono przy użyciu testu One-way ANOVA (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$)

4.1.12. Pomiar stężenia wybranych chemokin w tkance nowotworowej myszy obciążonych mysim rakiem gruczołu krokowego.

Na podstawie analizy macierzy cytokinowych oraz genowych, a także piśmiennictwa dotyczącego wpływu IL-33 na poziom chemokin w różnych typach nowotworów do dalszych badań przy użyciu testów ELISA wybrano CCL2, CCL6 oraz CCL12. Największe różnice obserwowano w poziomie CCL2 w tkance guzów, której stężenia w obu grupach obciążonych nowotworem mysiego raka gruczołu krokowego były istotnie wyższe w stosunku do zdrowej tkanki prostaty. Dodatkowo w 59 dniu eksperymentu poziom CCL2 był istotnie wyższy w grupie TRAMP-C2 w stosunku do grupy TRAMP-C1. Analogiczną tendencję odnotowano w 74 dniu eksperymentu, jednak różnice jakie uzyskano w tym dniu nie były istotne statystycznie.

WYNIKI

W tkance nowotworowej myszy z grupy TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 obserwowano niższe stężenia CCL6 oraz CCL12 w stosunku do tkanki zdrowej mysiej prostaty. Statystycznie różnice te były istotne jedynie w poziomie CCL6 w grupie TRAMP-C2 w 59 oraz 74 dniu eksperymentu. Dla obu nowotworów poziomy w/w cytokin były zbliżone (Rycina 4.17).

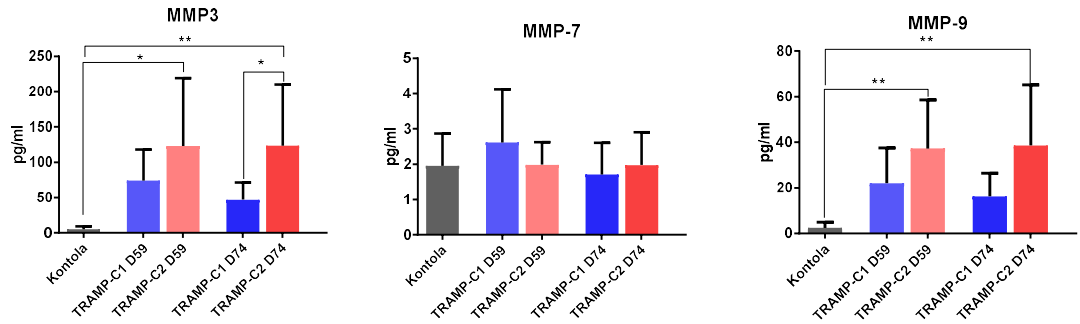


Rycina 4.17 Stężenie CCL2, CCL6 oraz CCL12 w lizatach z guzów nowotworowych myszy obciążonych mysim nowotworem gruczołu krokowego TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2. Kontrolę stanowiły lizaty z prostaty myszy zdrowych. Wyniki na wykresie przedstawiono w formie średniej \pm odchylenie standardowe. Analizę przeprowadzono przy użyciu testu One-way ANOVA (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$)

4.1.13. Pomiar stężenia wybranych metaloproteinaz w tkance nowotworowej myszy obciążonych mysim rakiem gruczołu krokowego.

Na podstawie analizy macierzy cytokinowych oraz genowych, a także piśmiennictwa dotyczącego wpływu IL-33 na poziom MMPs w różnych typach nowotworów do dalszych badań przy użyciu testów ELISA wybrano MMP-3, MMP-7 oraz MMP-9. Istotne różnice obserwowano w poziomach MMP-3 oraz MMP-9, dla których odnotowano bardzo zbliżone korelacje. Dla obu MMPs odnotowano wyższe stężenia w grupach obciążonych nowotworem mysiego raka gruczołu krokowego w stosunku do zdrowej tkanki prostaty. Grupa TRAMP-C2 charakteryzowała się jednak większym wzrostem poziomu MMP-3 oraz MMP-9 zarówno w 59 jak i 74 dniu eksperymentu, istotne statystycznie różnice odnotowano jednak tylko w 74 dniu. W przypadku MMP-7 nie odnotowano istotnych różnic pomiędzy grupami (Rycina 4.18).

WYNIKI



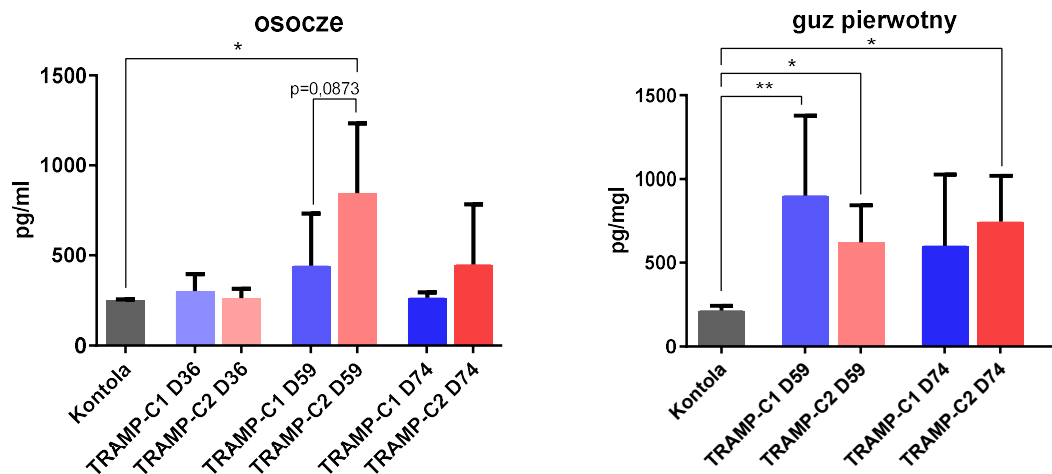
Rycina 4.18 Stężenie MMPs 3, 7 oraz 9 w liszaty z guzów nowotworowych myszy obarczonej mysim nowotworem gruczołu krokowego TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2. Kontrolę stanowiły liszaty z prostaty zdrowych. Wyniki na wykresie przedstawiono w formie średniej \pm odchylenie standardowe. Analizę przeprowadzono przy użyciu testu One-way ANOVA (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

4.1.14. Ocena stopnia uszkodzenia śródbłonna naczyń krwionośnych w ortotopowym modelu mysich raków gruczołu krokowego.

Poziom endoteliny 1 (*ang. endothelin 1*, ET-1) oznaczano zarówno w osoczu jak i tkance nowotworowej. W osoczu myszy obarczonej nowotworem TRAMP-C2 obserwowano wzrost stężenia ET-1 w 59 dniu eksperymentu. W tym dniu w grupie TRAMP-C2 odnotowano tendencję do wyższego stężenia ET-1 niż w grupie TRAMP-C1 oraz istotnie wyższy poziom w stosunku do osocza myszy zdrowych. W 74 dniu eksperymentu poziom ET-1 spadł w grupie TRAMP-C2, jednak nadal obserwowano jej nieznacznie wyższy poziom w stosunku do grupy TRAMP-C1 oraz kontroli.

Inne zależności obserwowano w poziomie ET-1 w tkance guza pierwotnego, gdzie w przypadku obu nowotworów odnotowano wyższe stężenie ET-1 w stosunku do zdrowej tkanki prostaty. W 59 dniu nieznacznie wyższy poziom ET-1 odnotowano dla grupy TRAMP-C1 w stosunku do TRAMP-C2, w 74 dniu natomiast tendencje te były odwrotne. Różnice pomiędzy grupami nie były jednak istotne statystycznie (Rycina 4.19).

WYNIKI

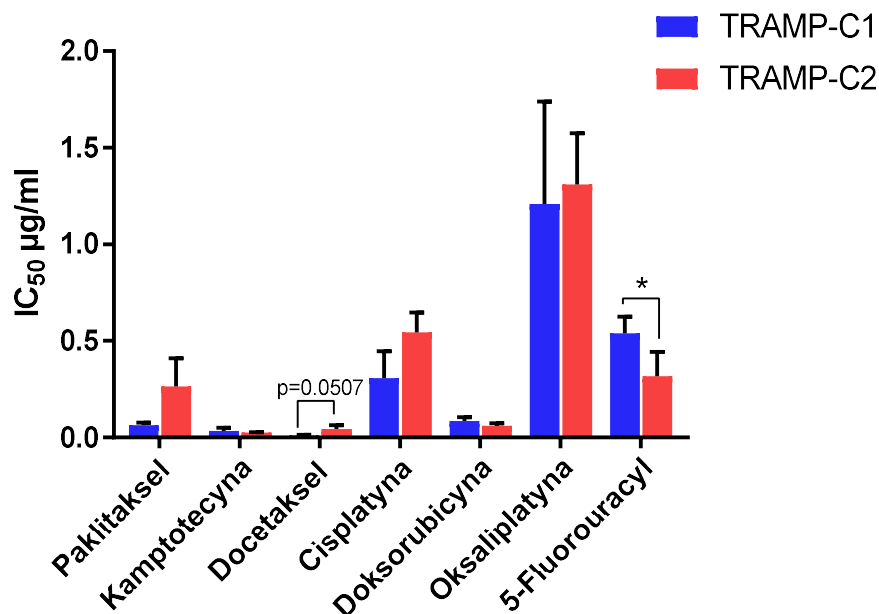


Rycina 4.19 Stężenie endoteliny-1 w osoczu oraz lizatach z guzów nowotworowych myszy obciążonych mysim nowotworem gruczołu krokowego TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2. Kontrolę stanowiło osocze oraz lizaty z prostaty zdrowych. Wyniki na wykresie przedstawiono w formie średniej \pm odchylenie standardowe. Analizę przeprowadzono przy użyciu testu One-way ANOVA (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

4.2. Badania *in vitro*

4.2.1. Wrażliwość linii TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 na cytostatyki

Wrażliwość TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 na cytostatyki testowano przy użyciu testu SRB. Na podstawie uzyskanych wyników wyliczono wartości IC_{50} określające stężenie związku hamującego proliferację komórek w 50% (Rycina 4.20). Najsilniejsze działanie przeciwproliferacyjne wykazały kamptotecyna, docetaksel oraz doksorubicyna. Obie linie mysiego raka gruczołu krokowego charakteryzowały się zbliżoną wrażliwością na działanie kamptotecyny i doksorubicyny; inaczej było w przypadku docetakselu, gdzie zaobserwowano tendencję do silniejszego hamowania proliferacji komórek linii TRAMP-C1. Wyższą wrażliwość linii TRAMP-C1 w stosunku do linii TRAMP-C2 obserwowano także przy zastosowaniu paklitakselu oraz cisplatyny. Istotnie silniejsze właściwości przeciwproliferacyjne 5-fluorouracylu odnotowano natomiast dla linii TRAMP-C2. Najslabsze działanie hamujące wzrost komórek TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 obserwowano dla oksaliplatyny, obie linie charakteryzowały się zbliżoną wrażliwością na ten cytostatyk.

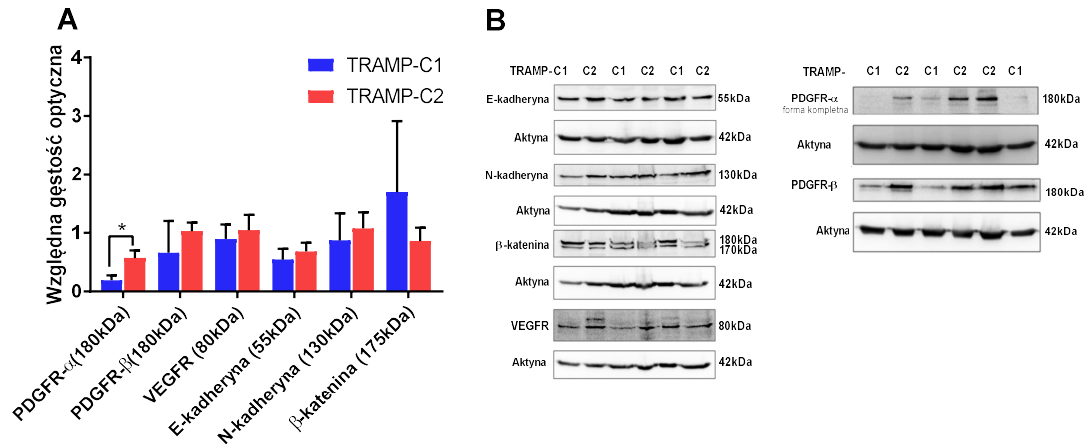


Rycina 4.20 Wrażliwość linii TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 na cytostatyki. Wynik przedstawiono formie średniej wartości $IC_{50} \pm$ odchylenie standardowe. Analizę statystyczną wykonano przy użyciu testu T ($*p \leq 0,05$).

4.2.2. Ekspresja wybranych białek w komórkach mysiego raka gruczołu krokowego TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2

Za pomocą metody Western-blot w lizatach komórkowych linii TRAMP-C1 i TRAMP-C2 oznaczano ekspresję białek adhezyjnych (E-kadheryny, N-kadheryny i β -kateniny) oraz receptorów dla czynników wzrostowych (VEGFR, PDGFR- α i PDGFR- β). Wyniki przedstawiono w postaci średniej z 3 powtórzeń wraz z odchyleniem standardowym intensywności chemiluminescencji danego białka do intensywności chemiluminescencji β -aktyny (Rycina 4.21 A). Ekspresja białek adhezyjnych E-kadheryny, N-kadheryny i β -kateniny była zbliżona dla obu linii, podobnie jak poziom VEGFR. Różnice obserwowano natomiast w poziomie receptora płytkowego czynnika wzrostu PDFGR- α , którego istotnie wyższą ekspresję obserwowano dla linii TRAMP-C2. Podobne tendencje, choć nie istotne statystycznie, odnotowano w poziomie PDFGR- β .

WYNIKI

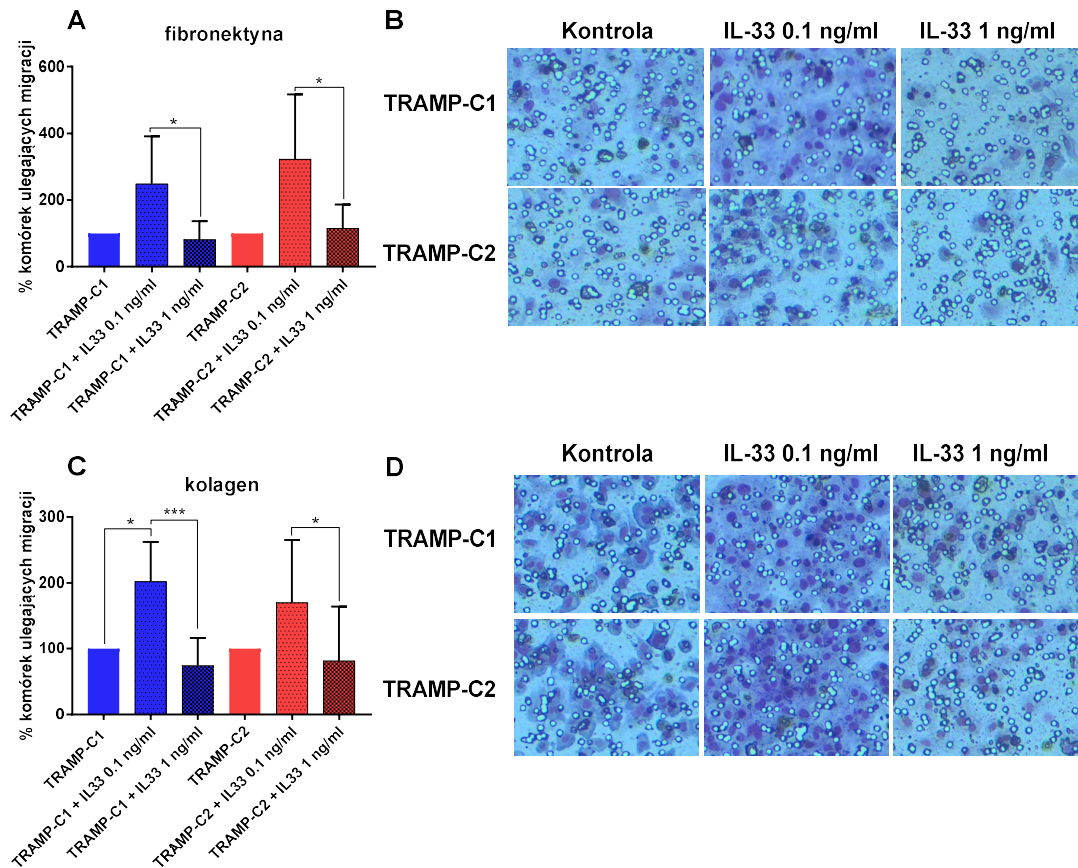


Rycina 4.21 Ekspresja E-kadheryny, N-kadheryny, B-kateniny, VEGFR, PDGFR- α i PDGFR- β w komórkach linii TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2. (A) Ekspresja w/w białek w komórkach TRAMP-C1 i TRAMP-C2. Wyniki przedstawiono w postaci wartości średnich intensywności chemiluminescencji w odniesieniu do intensywności chemiluminescencji uzyskanej dla β -aktyny \pm odchylenie standardowe. (B) Zdjęcia membrany PVDF dla poszczególnych białek. Analizę statystyczną wykonano wykorzystując test 2way Anova.

4.2.3. Wpływ IL-33 na migrację komórek linii mysiego raka gruczołu krokowego.

Zastosowanie IL-33 w stężeniu 0,1 ng/ml wzmagало migrację komórek TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 zarówno przez kolagen jak i fibronektynę. Najmocniej efekt ten obserwowany był przy migracji linii TRAMP-C1 przez kolagen. Podwyższenie zastosowanego stężenia IL-33 do 1 ng/ml znosiło ten efekt we wszystkich badanych kombinacjach (Rycina 4.22 A i C). Efekt ten można zaobserwować na poniższych zdjęciach (Rycina 4.22 B i D).

WYNIKI

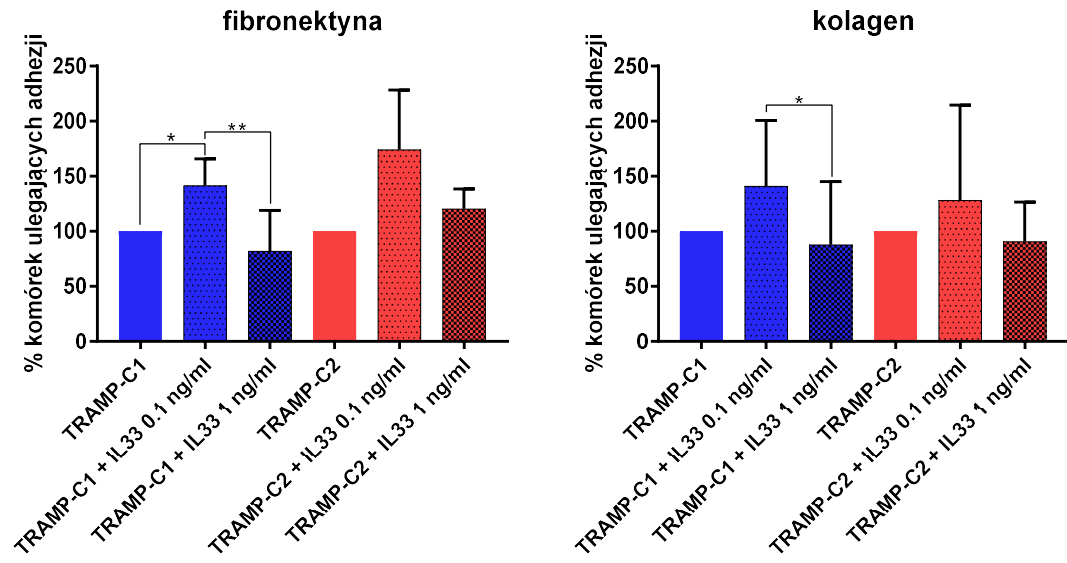


Rycina 4.22 Wpływ IL-33 w stężeniach 0,1 ng/ml oraz 1 ng/ml na migrację komórek mysiego raka gruczołu krokowego TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 przez (A i B) fibronektynę oraz (C i D) kolagen. Wyniki przedstawiono w postaci wartości średnich \pm odchylenie standardowe. Za 100% przyjęto wartości dla komórek nie traktowanych. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu T (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$).

4.2.4. Wpływ IL-33 na adhezję komórek linii mysiego raka gruczołu krokowego.

Zastosowanie IL-33 w stężeniu 0,1 ng/ml spowodowało wzrost liczby komórek linii TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 ulegających adhezji do kolagenu i fibronektyny. Najmocniej efekt ten był widoczny w adhezji komórek TRAMP-C1 do fibronektyny. Zwiększenie stężenia IL-33 do 1 ng/ml znosiło ten efekt dla obu linii zarówno w adhezji do kolagenu jak i fibronektyny (Rycina 4.23).

WYNIKI



Rycina 4.23 Wpływ IL-33 w stężeniach 0,1 ng/ml oraz 1 ng/ml na adhezję komórek mysiego raka gruczołu krokowego TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 do fibronektyny oraz kolagenu. Wyniki przedstawiono w postaci wartości średnich \pm odchylenie standardowe. Za 100% przyjęto wartości dla komórek nietraktowanych. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu T (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

5. Dyskusja

Rozwój nowotworu i jego progresja jest procesem niezwykle skomplikowanym i wieloetapowym. Poznanie i zbadanie czynników promujących i hamujących rozwój nowotworu jest niezwykle istotne aby ustalić miarodajne markery prognostyczne oraz aby poznać cele do opracowania nowych strategii terapeutycznych.

W ramach niniejszej pracy porównano dwie mysie linie nowotworu prostaty TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2, wywodzące się z guza pierwotnego transgenicznych myszy TRAMP [92]. Mimo wspólnego pochodzenia oraz identycznych warunków hodowli, już w pierwszych testach *in vitro* zaobserwowano różnice pomiędzy liniami. W teście wrażliwości na cytostatyki zaobserwowano niższą wrażliwość linii TRAMP-C1 na 5-fluorouracyl, linia TRAMP-C2 była natomiast mniej wrażliwa na paklitaksel, docetaksel oraz cisplatynę. W ramach dalszej analizy porównawczej sprawdzono ekspresję białek adhezyjnych (E-kadheryny, N-kadheryny i β -kateniny) oraz receptorów dla czynników wzrostowych (VEGFR, PDGFR- α i PDGFR- β). Dla linii TRAMP-C2 obserwowano istotnie wyższą ekspresję PDGFR- α oraz nieistotnie wyższą ekspresję PDGFR- β . PDGFR- α i PDGFR- β ulegają ekspresji w wielu typach nowotworów m.in. w raku prostaty [236] [237], promując rozwój nowotworu i angiogenezę [238] [237].

W badaniu tumorogenności linii TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 przeprowadzonym przez B.A. Foster i wsp., krótszy czas podwojenia objętości guza odnotowano dla linii TRAMP-C1 przy podskórnym wszczepieniu komórek nowotworowych [92]. W badaniach będących przedmiotem niniejszej rozprawy postanowiono wykorzystać model ortotopowy raka prostaty, który lepiej symuluje kliniczną postać raka prostaty, w szczególności w odniesieniu do mikrośrodowiska guza co pokazano w wielu modelach badawczych [239] [85]. Po ortotopowym wszczepieniu komórek, linia TRAMP-C2 charakteryzowała się szybszym wzrostem guzów nowotworowych. Na wczesnym etapie rozwoju nowotworu nie obserwowano istotnych różnic w wielkości guza nowotworowego TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2. W trakcie rozwoju nowotworów obserwowano jednak coraz większe różnice pomiędzy wielkością guzów, na koniec eksperymentu średnia objętość guzów w grupie TRAMP-C2 była blisko 3-krotnie wyższa w stosunku do grupy TRAMP-C1. Dodatkowo w grupie myszy zaszczepionych komórkami TRAMP-C2 obserwowano wolniejszy przyrost masy ciała w stosunku do

DYSKUSJA

grupy TRAMP-C1. Różnice w kinetyce wzrostu badanych linii pomiędzy modelem podskórnym, a ortotopowym mogą więc wynikać ze środowiska w jakim wzrastały oraz różnych sygnałów pochodzących z TME. Aby lepiej poznać różnice w rozwoju tych dwóch raków prostaty w eksperymencie zaplanowano 3 punkty czasowe pobierania materiału do dalszych analiz.

Dane zawarte w piśmiennictwie dotyczące przerzutów nowotworowych w modelu ortotopowym dla linii TRAMP-C2 są niejednoznaczne. Część badaczy obserwowała przerzuty do węzłów chłonnych, nerek i płuc u wszystkich nieleczonych myszy zaszczepionych do prostaty komórkami TRAMP-C2 [96]. W innym badaniu odnotowano przerzuty do krezki (40%) i nerek (30%) u myszy młodych, oraz do krezki (78%), wątroby (17%), śledziony (17%), nerek (39%) oraz poduszki tłuszczowej najądrza (17%) u myszy starych [11]. Obecność przerzutów nowotworowych w tym modelu uzależniona jest od pochodzenia zwierząt doświadczalnych, wieku oraz czasu prowadzenia obserwacji. Brak danych w piśmiennictwie na temat przerzutów po ortotopowym wszczepieniu komórek TRAMP-C1, model ten traktowany jest jako model przedprzerutowy [10]. W przeprowadzonym w ramach niniejszej rozprawy badaniu, w żadnym punkcie czasowym nie zaobserwowano przerzutów makroskopowych. W analizie histopatologicznej zaobserwowano przerzuty do węzłów chłonnych, zarówno u myszy zaszczepionych komórkami TRAMP-C1 (45%) jak i TRAMP-C2 (78%). Dla obu grup przerzuty zaobserwowano dopiero 74 dni po zaszczepieniu komórkami nowotworowymi. U myszy z nowotworem TRAMP-C1 obserwowano jedynie pojedyncze komórki w węzłach chłonnych. W grupie TRAMP-C2 obserwowano zarówno pojedyncze komórki, jak i liczne ogniska przerzutowe. Wyniki te świadczą o wyższym potencjale przerzutowym komórek TRAMP-C2. Bardziej agresywny charakter linii TRAMP-C2 potwierdzono w dożylnym modelu przerzutowym (komórki wszczepione do żyły ogonowej). W płucach myszy zaszczepionych *i.v.* komórkami TRAMP-C2 zaobserwowano przerzuty makroskopowe (50%), odnotowano także istotnie wyższą masę płuc w stosunku do płuc myszy z grupy TRAMP-C1. W analizie histopatologicznej zaobserwowano pojedyncze komórki nowotworowe w płucu jednej myszy zaszczepionej komórkami TRAMP-C1 (17%) oraz pojedyncze i liczne przerzuty w grupie TRAMP-C2 (71%).

Odpowiednia sieć naczyń krwionośnych jest krytycznym punktem w rozwoju nowotworu i tworzeniu przerzutów odległych. Dlatego proces angiogenezy jest

DYSKUSJA

niezwykle istotny w rozwoju nowotworów litych, w tym raka prostaty [240]. Dobrze rozwinięta sieć naczyń guza często koreluje z jego inwazyjnością i rozwojem przerzutów [241]. W celu sprawdzenia unaczynienia guza, przeprowadzono analizę przepływu krwi w guzie w stosunku do otaczającej tkanki. Istotnie wyższy przepływ krwi obserwowano w guzie TRAMP-C2 w stosunku do guza TRAMP-C1. Lepiej rozwinięta sieć naczyń krwionośnych guza może tłumaczyć szybszy wzrost oraz wyższy potencjał tworzenia przerzutów.

Jedną z cytokin silnie związaną z procesem angiogenezy jest ET-1, która ponadto odgrywa istotną rolę w modulacji mitogenezy, apoptozy, inwazji guza i tworzeniu przerzutów [242] [243]. Jej znaczenie od wielu lat opisywane jest również w rozwoju raka prostaty [244] [245]. W przedstawionych w niniejszej pracy badaniach zaobserwowano istotnie wyższe poziomy ET-1 w guzach raka prostaty TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 w stosunku do zdrowej tkanki prostaty, nie odnotowano jednak istotnych różnic pomiędzy nowotworami. W badaniu stężenia ET-1 w osoczu istotne różnice odnotowano w 59 dniu eksperymentu, gdzie odnotowano wzrost poziomu ET-1 u myszy obciążonych nowotworami TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2. W dniu tym zaobserwowano także największe różnice w poziomie ET-1 pomiędzy TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2. W dniu 74 także obserwowano niewielkie różnice pomiędzy nowotworami jednak poziom ET-1 w obu nowotworach znacznie obniżył się. Uzyskane wyniki pokazują, że kluczowym momentem w angiogenezie, stymulacji komórek do proliferacji i tworzeniu przerzutów może być etap przed-przerzutowy (D59) w którym odnotowano najwyższy poziom ET-1 dla nowotworu charakteryzującego się wyższym potencjałem przerzutowym, wyniki te korelują z wynikami przepływu krwi w guzie. Znaczenie tego etapu rozwoju nowotworu (D59) widać również w przesiewowej analizie macierzy cytokinowych, gdzie obserwowano m.in. wyższy poziom proangiogennej chemokiny CXCL1/KC [246] oraz EGF [247] w guzie TRAMP-C2 w stosunku do guza TRAMP-C1. Wyższe poziomy CXCL1/KC obserwowano również w osoczu myszy obciążonych nowotworami TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 w 36 i 59 dniu eksperymentu w stosunku do grupy SHAM.

Analiza porównawcza dwóch modeli raka prostaty różniących się tempem wzrostu, potencjałem przerzutowym oraz zdolnością do tworzenia nowych naczyń krwionośnych dostarczyła cennych informacji na temat cząsteczek/mediatorów mogących mieć kluczowe znaczenie w rozwoju przerzutującego raka prostaty.

DYSKUSJA

Model syngeniczny pozwala badać znaczenie i rolę układu immunologicznego w rozwoju nowotworu, w związku z czym w ramach pierwszych analiz, postanowiono przeprowadzić analizę morfologiczną krwi. Analiza ta wykazała istotne zmiany w liczbie komórek układu odpornościowego, zwłaszcza na późnym etapie rozwoju nowotworu (D74), co świadczy o silnym stanie zapalnym wywołanym rozwojem guza i przerzutów. Najwyższe poziomy leukocytów, limfocytów oraz monocytów odnotowano w dniu 74 dla myszy obarczonych nowotworem TRAMP-C2.

Monocyty wpływają na wiele aspektów progresji nowotworowej, różne podzbiory monocytów biorą udział zarówno w pro- jak i przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej. Wpływają na rozwój nowotworu poprzez fagocytozę, wydzielanie mediatorów pronowotworowych, promowanie angiogenezy, przebudowę ECM, rekrutację limfocytów oraz różnicowanie makrofagów i komórek dendrytycznych związanych z nowotworem [248] [249]. Na podstawie wielkości, morfologii oraz obecnych na powierzchni markerów, monocyty podzielono na 2 główne grupy: monocyty klasyczne i monocyty nieklasyczne. Monocyty klasyczne charakteryzujące się na powierzchni markerami: $Ly6C^{high}CCR2^{+}CD43^{-}CX3CR1^{low}MHC-II^{-}$ są dużymi, ziarnistymi komórkami o średnim okresie półtrwania w krwioobiegu poniżej 24 h. Klasyczne monocyty są szybciej rekrutowane do tkanek objętych stanem zapalnym i zdolne są do przyciągania innych komórek układu odpornościowego, wydzielania cytokin, innych czynników zapalnych i pełnią funkcje prozapalne [250] [251]. Monocyty nieklasyczne natomiast charakteryzują się innym układem markerów powierzchniowych: $Ly6C^{low}CCR2^{-}CD43^{+}CX3CR1^{high}MHC-II^{-}$ są mniejsze, mniej ziarniste i charakteryzują się dłuższym okresem półtrwania w krwioobiegu. Monocyty nieklasyczne, podobnie jak klasyczne, zdolne są do wynaczynienia, a proces ten jest znacznie dłuższy niż w przypadku monocytów klasycznych. Monocyty nieklasyczne pozostają głównie w krwioobiegu, pełniąc funkcje patrolujące i przeciwzapalne [252]. Zgodnie z danymi z ostatnich lat nowotwór już na wczesnych etapach rozwoju może przeprogramowywać hematopoezę w szpiku kostnym oraz śledzionie, co skutkuje zwiększonym odsetkiem monocytów we krwi. W wielu nowotworach wysoki odsetek monocytów we krwi koreluje ze złym rokowaniem [248]. Dodatkowo w raku prostaty zaobserwowano, że odsetek monocytów we krwi koreluje nie tylko z zaawansowaniem nowotworu ale także z naciekami makrofagów w miejscu guza [75] [74].

DYSKUSJA

W badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej zaobserwowano istotny wzrost odsetka monocytów we krwi myszy obarczonych nowotworem o wyższym potencjale przerzutowania TRAMP-C2 w 59 dniu eksperymentu i pozostał on na podobnym poziomie wraz z rozwojem nowotworu. W przypadku nowotworu TRAMP-C1 nie obserwowano istotnych zmian w liczbie monocytów. W najnowszych badaniach dotyczących korelacji liczby monocytów obwodowych zaobserwowano silny związek pomiędzy liczbą monocytów, a przerzutami raka prostaty do węzłów chłonnych [253]. W prezentowanych w ramach niniejszej pracy badaniach, podwyższoną liczbę obwodowych monocytów obserwowano jedynie u myszy obarczonych nowotworem o wyższym potencjale przerzutowania TRAMP-C2. U myszy obarczonych nowotworem TRAMP-C1 nie obserwowano istotnych zmian w liczbie monocytów. Szczególną uwagę należy zwrócić na fakt, że istotnie wyższy odsetek monocytów u myszy TRAMP-C2 obserwowano już w 59 dniu eksperymentu, kiedy jeszcze w badaniach histopatologicznych nie obserwowano ognisk wtórnych w węzłach chłonnych. Wyniki te pokazują, że liczba monocytów skorelowana może być nie tyle z obecnością przerzutów do węzłów chłonnych, ale z agresywnością nowotworu i jego potencjałem przerzutowym.

Wyższy odsetek monocytów we krwi myszy TRAMP-C2 skorelowany był także z wyższym poziomem CCL2 w guzie TRAMP-C2, co może sugerować, że nowotwór poprzez lokalnie wyższy poziom CCL2 wpływa na liczbę monocytów we krwi. Lokalne znaczenie poziomu CCL2 na odsetek monocytów we krwi obwodowej obserwowano w badaniach nad cukrzycą [254].

W związku z istotnymi różnicami w liczbie monocytów w trakcie rozwoju nowotworów TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2, w ramach dalszych badań przy użyciu cytometrii przepływowej zbadano odsetek populacji monocytów klasycznych i nieklasycznych we krwi oraz w zawiesinie komórek śledziony. Analiza ta pokazała, wyższe poziomy monocytów nieklasycznych zarówno we krwi jak i śledzionie myszy obarczonych nowotworem TRAMP-C2 w 36 dniu eksperymentu, wraz z rozwojem nowotworu (D59) TRAMP-C2 obserwowano istotny spadek subpopulacji monocytów nieklasycznych na korzyść monocytów klasycznych. Na późniejszym etapie rozwoju nowotworu (D74) poziomy badanych subpopulacji monocytów we krwi obwodowej myszy TRAMP-C2 pozostały bez zmian w stosunku do dnia 59, w zawiesinie komórek śledziony obserwowano natomiast powrót do poziomów z dnia 36 eksperymentu.

DYSKUSJA

W przypadku nowotworu TRAMP-C1 nie zaobserwowano istotnych zmian w badanych subpopulacjach. Tak istotna zmiana stosunku monocytów nieklasycznych do klasycznych na etapie rozwoju nowotworu poprzedzającym pojawienie się pierwszych przerzutów może być istotną informacją na temat znaczenia subpopulacji monocytów w rozwoju i przerzutowaniu raka prostaty.

Część badaczy łączy obecność poszczególnych subpopulacji klasycznych i nieklasycznych monocytów z polaryzacją fenotypu makrofagów w miejscu guza; dane te nie są jednak jednoznaczne. Część danych przedstawionych w piśmiennictwie wskazuje na silną zależność pomiędzy obecnością monocytów nieklasycznych i makrofagów M2 [255] [256], co mogłoby świadczyć o przeważającym fenotypie M2 makrofagów na wczesnym etapie rozwoju nowotworu o wyższym potencjale przerzutowym. Jednak wiele badań wskazuje, że monocyty klasyczne po wynaczynieniu do tkanki mogą być przekształcane zarówno w makrofagi M1 jak i M2 [257] [258]. W celu dokładnego poznania znaczenia zmian odsetka subpopulacji monocytów zarówno we krwi obwodowej jak i zawieszynie komórek śledziony potrzebne są jednak dalsze szczegółowe badania.

Limfocyty, jako mocno zróżnicowana grupa komórek układu odpornościowego, wpływają na różne aspekty rozwoju nowotworu. Choć podwyższony poziom limfocytów jest istotnym markerem w wielu nowotworach, w przypadku pacjentów z rakiem prostaty obserwowano istotnie niższy poziom limfocytów w stosunku do pacjentów nie obarczonych rakiem prostaty [259]. Podobnie niższe poziomy limfocytów stwierdzono u pacjentów z PSA powyżej 4 ng/ml w stosunku do pacjentów z PSA poniżej 4 ng/ml [260]. W przeprowadzonych badaniach własnych obserwowano podwyższone poziomy limfocytów u myszy obarczonych zarówno nowotworem TRAMP-C1 jak i TRAMP-C2 w zaawansowanym stadium nowotworu. Celem dokładnej analizy populacji limfocytów przeprowadzono analizę cytometryczną mononuklearów krwi obwodowej oraz komórek śledziony. W analizie tej można zaobserwować, że większość zmian w populacji limfocytów T obserwowanych we krwi obwodowej była poprzedzona podobnymi zmianami w śledzionie. Istotny wzrost odsetka ogólnej populacji limfocytów T oraz limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ obserwowany we krwi obwodowej w 59 dniu eksperymentu u myszy obarczonych nowotworem TRAMP-C2 poprzedzony był podwyższonym odsetkiem tych subpopulacji w zawieszynie komórek śledziony w 36 dniu eksperymentu w tej grupie. Spadek odsetka

DYSKUSJA

tych subpopulacji we krwi obwodowej w 74 dniu był poprzedzony ich spadkiem w śledzionie w 59 dniu eksperymentu. Podobne tendencje, choć nie istotne statystycznie, obserwowano we krwi obwodowej oraz śledzionie u myszy obciążonych guzami TRAMP-C1. Fakt, że zmiany w odsetku ogólnej populacji limfocytów T oraz limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ obserwowane są w obu nowotworach, jednak znacznie bardziej nasilone w nowotworze bardziej agresywnym pokazuje, że mogą być one szczególnie istotne w procesie przerzutowania raka prostaty. W ramach dalszych analiz oceniano odsetek komórek Treg, dla których również zaobserwowano, że zmiany we krwi obwodowej poprzedzone są zmianami w śledzionie. Istotny wzrost odsetka Treg odnotowano w 74 dniu we krwi obwodowej, co poprzedzone było istotnym wzrostem odsetka komórek Treg w śledzionie obserwowanym w dniu 59. Istotne zmiany w odsetku komórek Treg obserwowano tylko u myszy obciążonych bardziej agresywnym nowotworem TRAMP-C2, w przypadku TRAMP-C1 nie odnotowano żadnych znaczących zmian. Dane innych badaczy pokazują, że u chorych z rakiem prostaty obserwowany jest wyższy odsetek komórek Treg we krwi obwodowej [261], badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy pokazują, że odsetek komórek Treg może być powiązany ze stopieniem inwazyjności nowotworu.

Dla obu nowotworów obserwowano podobny spadek odsetka limfocytów B we krwi obwodowej w 59 dniu eksperymentu. Analiza zawiesiny komórek śledziony wykazała, w tym samym dniu, istotny wzrost komórek B w grupie TRAMP-C2. W dalszym etapie rozwoju nowotworu zaobserwowano powrót poziomu limfocytów B do poziomu zbliżonego do grupy SHAM.

Komórki układu odpornościowego i komórki nowotworowe wzajemnie wpływają na siebie na wszystkich etapach rozwoju nowotworu. Wraz z postępem choroby zmienia się krajobraz immunologiczny obserwowany m.in. w TME, krwi obwodowej oraz w przeprogramowaniu hematopoezy [46]. We wczesnych stadiach rozwoju nowotworu zazwyczaj obserwowany jest wyższy odsetek komórek odpornościowych wykazujących działanie przeciwnowotworowe, takich jak limfocyty T CD8⁺, CD4⁺ Th1, makrofagi M1 i komórki NK, które rozpoznają i eliminują bardziej immunogenne komórki nowotworowe. W ramach dalszej progresji, komórki nowotworowe promują pronowotworowe działanie układu immunologicznego, w związku z czym w późniejszych etapach rozwoju choroby nowotworowej obserwowany jest wzrost odsetka między innymi makrofagów M2, komórek CD4⁺ Th2 i Treg [262].

DYSKUSJA

Analiza subpopulacji limfocytów we krwi obwodowej oraz zawiesinie komórek śledziony myszy obarczonych mysim nowotworem prostaty pokazuje, początkową przewagę przeciwnowotworowego działania układu immunologicznego (wyższy odsetek limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺), jednak wraz z rozwojem nowotworu obserwujemy przeprogramowanie na działanie pronowotworowe (spadek odsetka limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺, i wzrost odsetka komórek Treg). Istotnie większe zmiany obserwowano dla linii TRAMP-C2 charakteryzującej się bardziej agresywnym charakterem, co sugeruje szczególnie istotną rolę homeostazy immunologicznej w przerzutującym raku prostaty.

Jak wspomniano w rozdziale 1.1.4. komórki układu odpornościowego i komórki nowotworowe wzajemnie na siebie wpływają. Metabolizm komórek nowotworowych może wpływać na układ immunologiczny poprzez konkurencję o składniki odżywcze, zakwaszenie środowiska oraz wydzielanie produktów przemiany materii [78].

Odmienne metabolizmy są jedną z charakterystycznych cech komórek nowotworowych [78]. W ciągu ostatnich lat zaobserwowano szczególne znaczenie metabolizmu aminokwasów w wielu typach nowotworów. Aminokwasy dla komórek nowotworowych są niezbędnym źródłem składników odżywczych, budulcowych oraz odgrywają istotną rolę w utrzymaniu wewnątrzkomórkowego stanu redoks i detoksykacji amoniaku [263] [264] [265]. W jednym z badań zaobserwowano istotne różnice w profilu aminokwasów u pacjentów z rakiem prostaty w stosunku do grupy zdrowych mężczyzn. Spośród przebadanych aminokwasów autorzy wyselekcjonowali grupę 6 aminokwasów (metionina, etanoloaminę, glutaminę, izoleucynę, argininę oraz leucynę), których stężenia w surowicy mogą mieć potencjalnie prognostyczne znaczenie w raku prostaty [266]. W badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy sprawdzono profil aminokwasów w osoczu myszy obarczonych rakiem prostaty oraz grupie poddanej operacji pozorowanej. Zmiany w poziomie tyrozyny, waliny i metioniny dla obu nowotworów w stosunku do grupy SHAM zauważono już w 36 dniu eksperymentu, bardziej istotne były zmiany uzyskane dla grupy TRAMP-C2. Dodatkowo wraz z rozwojem nowotworów obserwowano dalszy spadek poziomu tych aminokwasów. W 54 dniu eksperymentu obserwowano istotne spadki stężenia alaniny, waliny, fenyloalaniny, tyrozyny, leucyny/izoleucyny, argininy oraz metioniny w obu nowotworach w stosunku do grupy kontrolnej. W badaniu profilu aminokwasów u pacjentów chorych na raka prostaty również odnotowano spadek poziomu tych aminokwasów w stosunku do grupy zdrowej, choć w tym badaniu różnice uzyskane dla

DYSKUSJA

tyrozyny i waliny nie były statystycznie istotne [266]. W badaniach własnych dodatkowo zaobserwowano istotne różnice w poziomie aminokwasów pomiędzy nowotworem TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2. W osoczu myszy obarczonych bardziej inwazyjnym nowotworem TRAMP-C2 w dniu 33 odnotowano istotnie niższy poziom argininy, a w 54 dniu alaniny, tyrozyny oraz metioniny w stosunku do grupy TRAMP-C1. Uzyskane dane potwierdzają, że analiza profilu aminokwasów może być użytecznym narzędziem w diagnostyce raka prostaty. Dodatkowo niższe poziomy argininy, alaniny, tyrozyny i metioniny obserwowane w bardziej agresywnym i silniej przerzutującym nowotworze TRAMP-C2 sugerują, że mogą być one pomocne w ocenie rokowań dla chorych na nowotwór prostaty.

Dostępność poszczególnych aminokwasów jest niezbędna do proliferacji i dojrzewania komórek układu odpornościowego. Niska dostępność aminokwasów może zahamować aktywację poszczególnych komórek układu odpornościowego lub powodować ich upośledzone działanie. Arginina i metionina są niezwykle istotnymi aminokwasami biorącymi udział w proliferacji i dojrzewaniu cytotoksycznych limfocytów T oraz komórek NK, biorą również udział w syntezie cytokin [82] [267]. Dodatkowa suplementacja argininy i metioniny w nowotworach wspomaga przeciwnowotworową odpowiedź w chorobie nowotworowej [268] [269]. Wstępne badania nad suplementacją fenyloalaniny w modelu Danio pręgowanego również wykazały wzmożenie odpowiedzi immunologicznej gospodarza [270]. Egzogenna alanina, choć może być ona syntezowana przez komórki z innych źródeł, również jest niezbędna do prawidłowego dojrzewania limfocytów T, a jej niedobór hamuje ich aktywację [79].

Rozgałęzione aminokwasy takie jak walina, leucyna i izoleucyna również niezbędne są do proliferacji i różnicowania limfocytów, wpływają także na syntezę cytokin. Jedne z ostatnich badań pokazały, że rozgałęzione aminokwasy odgrywają istotną rolę w proliferacji i aktywności metabolicznej mezenchymalnych komórek macierzystych oraz zmniejszają wydzielanie NF- κ B [271].

Mniejsza dostępność alaniny, waliny, fenyloalaniny, tyrozyny, leucyny/izoleucyny, argininy oraz metioniny spowodowana nowotworem u myszy TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 z pewnością istotnie wpływa również na funkcjonowanie układu immunologicznego. Na szczególną uwagę zasługuje fakt istotnie obniżonych

DYSKUSJA

poziomów alaniny, argininy i metioniny w grupie TRAMP-C2 oraz znaczenie tych aminokwasów w proliferacji, różnicowaniu i aktywacji limfocytów T.

W celu dokładniejszej analizy roli układu immunologicznego w rozwoju mysiego raka prostaty TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 przeprowadzono analizę macierzy cytokinowych umożliwiającą względne określenie poziomów 111 różnych cytokin. Do badań tych użyto zarówno osocze jak i lizaty guzów nowotworowych zebranych w 3 różnych czasach na różnych etapach rozwoju nowotworu. Dodatkowo dokonano oceny ekspresji szerokiego panelu genów związanych z rozwojem raka prostaty w guzach nowotworowych. W analizie osocza zaobserwowano znacząco niższy poziom IL-2 przez cały czas eksperymentu oraz INF- γ w dniu 74 u myszy obciążonych nowotworem TRAMP-C2 w stosunku do grupy SHAM i TRAMP-C1, co może świadczyć o przesunięciu równowagi w tym nowotworze w kierunku limfocytów Th2 [272]. U myszy TRAMP-C1 obserwowano ponadto wyższy poziom IL-10 zaliczanej do cytokin Th2 [46] w 59 dniu eksperymentu w stosunku do grupy TRAMP-C2 i SHAM, na dalszym etapie rozwoju nowotworu poziom tej interleukiny powrócił do poziomu obserwowanego dla grupy SHAM. W badaniach klinicznych pokazano, że u mężczyzn z nowotworem prostaty obserwowane są wyższe poziomy IL-10 oraz niższe poziomy IL-2 i INF- γ [272] [60] [61]; prezentowane w rozprawie wyniki pokazują, że mogą być one również powiązane z agresywnością tego nowotworu.

W analizie macierzy cytokinowych naszą szczególną uwagę przykuła IL-33, dla której odnotowano znaczne zmiany w tkance guza TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2. Dodatkowo zaobserwowano w surowicy i/lub w lizatach z guzów zmiany poziomu innych markerów tj. CCL2, CCL6 oraz MMPs, na których poziom zgodnie z piśmiennictwem może wpływać IL-33 [166] [273] [189]. Poznanie znaczenia IL-33 w rozwoju raka prostaty jest tym bardziej istotne, że dotychczasowe dane są niejednoznaczne.

IL-33 odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy, naprawie tkanek, infekcji, zapaleniu, alergii i nowotworach. Mimo narastającej z roku na rok ilości prac dotyczących wpływu IL-33 na powstawanie i rozwój nowotworów, wciąż nie ma jasnej odpowiedzi czy IL-33 promuje czy hamuje rozwój nowotworów. Wraz z rozwojem wiedzy na ten temat przybywa dowodów zarówno na jej działanie pro- jak i przeciwnowotworowe [14] [274]. Wpływ IL-33 na rozwój nowotworu obserwowany

DYSKUSJA

jest zarówno poprzez jej bezpośrednie działanie na komórki nowotworowe [171][164], jak i oddziaływanie na komórki układu odpornościowego i komórki zrębu [274].

Mimo wielu prac traktujących o roli IL-33 w progresji różnych nowotworów, jej znaczenie w raku prostaty jest bardzo słabo poznane. Dotychczasowe dane pokazują, że u pacjentów z rakiem prostaty odnotowano wyższe stężenia IL-33 w surowicy w stosunku do kontrolnej grupy zdrowych mężczyzn. Dodatkowo stężenie IL-33 skorelowane jest ze stadiem zaawansowania nowotworu [151]. W analizie ekspresji genu IL-33 w guzie raka prostaty odnotowano natomiast, że niższa ekspresja genu *IL33* związana była z cięższym przebiegiem choroby, przerzutami i szybszym czasem nawrotów po prostatektomii [170]. W badaniach własnych z wykorzystaniem testu ELISA obserwowano istotne różnice w stężeniu IL-33 w osoczu myszy obarczonych bardziej agresywnym nowotworem TRAMP-C2 w 36 i 59 dniu eksperymentu, co jest spójne z wynikami uzyskanymi dla pacjentów z rakiem prostaty [151]. Poziom IL-33 w surowicy myszy obarczonych nowotworem TRAMP-C2 spadł jednak do poziomów uzyskiwanych dla grupy TRAMP-C1 w 74 dniu eksperymentu, nadal był jednak wyższy w porównaniu do grupy kontrolnej. W lizatach z guzów nowotworowych obserwowano podwyższone poziomy IL-33 w stosunku do prawidłowej tkanki prostaty grupy kontrolnej. Wyższe stężenia IL-33 w łagodniejszym guzie TRAMP-C1 w stosunku do bardziej agresywnego TRAMP-C2 są widoczne, jednak nie istotne statystycznie. Uzyskane wyniki poziomu IL-33 w guzie również zgodne są z piśmiennictwem [170]. Uzyskane dane pokazują, że zarówno w zastosowanym przez nas modelu, jak i w badaniach klinicznych wysokie stężenie IL-33 w surowicy koreluje ze złym rokowaniem w raku prostaty.

W ramach dalszych badań sprawdzono wpływ IL-33 na komórki TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 w warunkach *in vitro*. W ramach badań zastosowano 2 stężenia IL-33 0,1 oraz 1 ng/ml. Niższe stężenie 0,1 ng/ml znacząco zwiększało zdolność komórek TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 do migracji przez inserty opłaszczony zarówno kolagenem jak i fibronektyną, podczas gdy stężenie 1 ng/ml nie wpływało istotnie na migrację komórek. Podobne obserwacje odnotowano w badaniu adhezji komórek TRAMP-C1 do kolagenu i fibronektyny. W badaniach nad komórkami glejaka, IL-33 zwiększała zdolność do migracji i adhezji komórek U251 i U87 zależnie od dawki, jednakże w badaniu tym zastosowano znacznie wyższe stężenia IL-33 10-50 ng/ml [275]. Analogiczne wyniki dla migracji komórek i inwazji przy zastosowaniu

DYSKUSJA

podobnych stężeń odnotowano dla komórek raka żołądka oraz płuc [187]. Jednak analiza wpływu IL-33 na migrację i adhezję do ECM komórek raka kosmówki JEG3 pokazała, że przy zastosowaniu stężenia 1 i 100 ng/ml, IL-33 hamowała zarówno adhezję jak i migrację komórek [276]. Bardzo ciekawe wyniki uzyskano dla komórek raka dróg żółciowych, gdzie podobnie jak w badaniach własnych niskie stężenia IL-33 promowały migrację (0,002-2 ng/ml), wysokie natomiast hamowały ją (20-200 ng/ml) [171]. Wyniki te pokazują, że szczególną uwagę w badaniach nad IL-33 w rozwoju raka, ale także i w innych chorobach należy zwrócić na zastosowane stężenia. W przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy badaniach wpływu IL-33 na adhezję i migrację komórek raka prostaty wykorzystano stężenie 0,1 ng/ml przybliżone do stężenia, jakie wykryto w guzach nowotworowych (0,1-0,3 ng/ml) oraz stężenie 10 krotnie wyższe 1 ng/ml. Oznacza to, że poziom IL-33 wykryty w guzach TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 wpływa na komórki nowotworowe promując tworzenie przerzutów nowotworowych poprzez wspomaganie ich migracji, a silna nadekspresja IL-33 w komórkach mogłaby znosić ten efekt.

Szlak sygnałowy IL-33/ST-2 wpływa na poziom wielu różnych cytokin i chemokin. W piśmiennictwie opisano m.in. istotne znaczenie wpływu IL-33 na poziom chemokiny CCL2, dla której odnotowano różnice w badaniach własnych podczas analizy macierzy cytokinowych. IL-33 zwiększa ekspresję CCL2, która jest silnym chemoatraktantem dla komórek układu odpornościowego, m.in. monocytów, komórek NK, limfocytów T co istotnie wpływa na progresję nowotworu [166][173]. Wyższą ekspresję CCL2 zaobserwowano także po stymulacji IL-33 ludzkich komórek tucznych [277]. Chemokina ta jest szczególnie ciekawa w progresji raka prostaty, jej znacznie wyższy poziom obserwowany jest w guzie pierwotnym w stosunku do tkanki prawidłowej [278]. Dodatkowo istnieją doniesienia, że poziom CCL2 w surowicy może korespondować ze złym rokowaniem, choć badania nie są jednoznacznie i wymagają dalszych prac [279]. W badaniach wykorzystujących ludzką linię raka prostaty PC-3 wykazano, że CCL2 może zwiększać inwazję komórek nowotworowych i migrację w raku prostaty [280]. W badaniach własnych przy wykorzystaniu testu ELISA zaobserwowano istotnie wyższy poziom CCL2 w guzach nowotworowych TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 w stosunku do prawidłowej tkanki prostaty. Guzy w grupie o wyższym potencjale przerzutowym - TRAMP-C2 charakteryzowały się istotnie wyższym poziomem CCL2 w stosunku do TRAMP-C1 w 59 dniu eksperymentu. W 74

DYSKUSJA

dniu eksperymentu poziom stężenia CCL2 w grupie TRAMP-C2 nie zmienił się istotnie, natomiast u części myszy w grupie TRAMP-C1 jej poziom wzrósł, co może być związane z rozpoczęciem tworzenia przerzutów w tej grupie. Uzyskane wyniki pokazują, że tkanka nowotworowa raka prostaty charakteryzuje się wyższym poziomem CCL2 w stosunku do tkanki zdrowej, a dodatkowo wyższy poziom CCL2 w guzie koreluje z jego większą inwazyjnością. W przeprowadzonej analizie nie zaobserwowano korelacji pomiędzy stężeniem w guzie IL-33 i CCL2. Wyższe stężenie CCL2 w guzie TRAMP-C2 w 59 i 74 dniu może być związane z wyższymi poziomami IL-33 w osoczu w 36 i 59 dniu, jednak w celu potwierdzenia tej teorii niezbędne jest przeprowadzenie dalszych badań.

Analizując macierze cytokinowe i genowe naszą uwagę zwrócił fakt istotnych różnic w poziomach różnych MMPs pomiędzy guzami TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2. MMPs są niezwykle istotnymi cząsteczkami biorącymi czynny udział w progresji nowotworu wpływając na angiogenezę, tworzenie przerzutów i ucieczkę komórek nowotworowych przed odpowiedzią układu immunologicznego [281]. Do dalszych analiz z użyciem testów ELISA wybrano – MMP-3, MMP-7 oraz MMP-9. W przeprowadzonych badaniach własnych zaobserwowano istotne różnice w poziomach MMP-3 oraz MMP-9, których wyższe stężenie obserwowano w guzach TRAMP-C2 oraz TRAMP-C1 w stosunku do zdrowej tkanki. Wyższa inwazyjność nowotworu (guz TRAMP-C2) związana była z wyższym poziomem MMP-3 i MMP-9. Wyższe stężenia MMP-3 oraz MMP-9 obserwowano także u pacjentów z przerzutującym rakiem prostaty i związane były z gorszym rokowaniem i krótszym czasem przeżycia [282] [283] [284]. Podobne obserwacje odnotowano w badaniach *in vitro* wykorzystujących ludzkie linie raka prostaty [285] [286]. Dodatkowo wysoki poziom MMP-3 był powiązany z unaczynieniem guza, a ablacja MMP-3 w komórkach raka prostaty spowodowała wolniejszy i mniej efektywny proces angiogenezy [282]. Również w zastosowanym w badaniach własnych w modelu mysiego raka prostaty zaobserwowano wyższy poziom MMP-3 oraz MMP-9 w modelu charakteryzującym się wyższą inwazyjnością (TRAMP-C2). Dodatkowo, jak wspomniano wcześniej, guz TRAMP-C2 dla którego obserwowano istotnie wyższe stężenie MMP-3 charakteryzował się wyższym przepływem krwi i lepszym unaczynieniem. Zgodnie z piśmiennictwem IL-33 wpływa na stężenie tych MMPs, promując progresję nowotworu i tworzenie przerzutów [287][187][207]. W przeprowadzonej w ramach

DYSKUSJA

realizowanych badań analizie nie zaobserwowano korelacji pomiędzy stężeniem w guzie MMP-3,-9 i IL-33, możliwe jednak, że podwyższone poziomy MMP-3 i -9 w guzie TRAMP-C2 są efektem podwyższonego stężenia IL-33 w osoczu myszy TRAMP-C2 w 36 i 59 dniu eksperymentu. W celu potwierdzenia ten teorii niezbędne są jednak dodatkowe eksperymenty.

6. Wnioski

1. Linie mysiego raka prostaty TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 tworzą przerzuty nowotworowe zarówno w modelu ortotopowym, jak i dożylnym. Linia TRAMP-C2 charakteryzuje się szybszym wzrostem guza i tworzeniem większej liczby przerzutów.
2. Guzy nowotworowe w modelu TRAMP-C2 charakteryzują się lepiej rozwiniętą siecią naczyń krwionośnych, co obserwowane jest jako szybszy przepływ krwi w guzie.
3. Rozwojowi nowotworów TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 towarzyszą istotne zamiany w układzie odpornościowym obserwowane w zmianie odsetka poszczególnych subpopulacji monocytów i limfocytów, oraz poziomie markerów zapalnych w znacznie mierze korelujących z wynikami badań klinicznych w piśmiennictwie. Nowotwór o wyższej agresywności- TRAMP-C2 charakteryzuje się istotnie większymi zmianami w krajobrazie immunologicznym. Na podstawie uzyskanych danych można stwierdzić, że zastosowane modele raka prostaty są szczególnie przydatne do badania układu odpornościowego w rozwoju i przerzutowaniu raka prostaty oraz nowych immunoterapii.
4. Wraz z rozwojem nowotworów TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 istotnie zmienia się profil aminokwasów w osoczu i jest powiązany z agresywnością nowotworu. Fakt, że uzyskane wyniki korelują z wynikami badań klinicznych publikowanych w piśmiennictwie, że zastosowane modele mogą być wykorzystywane do badań metabolizmu w raku prostaty i terapii opartych na ingerencji w metabolizm aminokwasów.
5. Wyższe stężenia IL-33 w surowicy na początkowych etapach rozwoju nowotworu korelują z wyższą agresywnością nowotworu.
6. IL-33 wpływa na migrację i adhezję komórek TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 *in vitro* zależnie od zastosowanego stężenia. IL-33 w stężeniach odpowiadających tym obserwowanym w guzach nowotworowych znacząco promuje migrację i adhezję komórek, wyższe stężenie IL-33 nie wywołuje natomiast istotnego efektu.

BIBLIOGRAFIA

- [1] R. Hesketh, *Introduction to Cancer Biology*. Cambridge University Press, 2012. doi: 10.1017/cbo9781139012904.
- [2] G. M. Cooper, *The Cell A Molecular Approach. 2nd Edition, Sunderland (MA)*. 2000. [Online]. Available: [https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkposzje\)\)/reference/ReferencesPaper.aspx?ReferenceID=2001952](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkposzje))/reference/ReferencesPaper.aspx?ReferenceID=2001952)
- [3] “Cancer.” <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed Feb. 22, 2022).
- [4] H. Sung *et al.*, “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 71, no. 3, pp. 209–249, May 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [5] A. M. Lewandowska, M. Rudzki, S. Rudzki, T. Lewandowski, and B. Laskowska, “Environmental risk factors for cancer - review paper,” *Ann Agric Environ Med*, vol. 26, no. 1. pp. 1–7, Mar. 22, 2019. doi: 10.26444/aaem/94299.
- [6] T. J. Key, K. E. Bradbury, A. Perez-Cornago, R. Sinha, K. K. Tsilidis, and S. Tsugane, “Diet, nutrition, and cancer risk: What do we know and what is the way forward?,” *BMJ*, vol. 368, Mar. 2020, doi: 10.1136/bmj.m511.
- [7] J. Didkowska, U. Wojciechowska, I. Michałek, F. Caetano dos Santos, and P. Olasek, “Nowotwory Złośliwe W Polsce W 2019 Roku (Cancer in Poland in 2019).,” *Kraj. Rejestr Nowotworów*, 2021, [Online]. Available: <http://onkologia.org.pl>
- [8] M. Wang *et al.*, “Role of tumor microenvironment in tumorigenesis,” *J. Cancer*, vol. 8, no. 5, pp. 761–773, 2017, doi: 10.7150/jca.17648.
- [9] G. Landskron, M. De La Fuente, P. Thuwajit, C. Thuwajit, and M. A. Hermoso, “Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment,” *J Immunol Res*, vol. 2014. 2014. doi: 10.1155/2014/149185.
- [10] J. A. Ardura, L. Álvarez-Carrión, I. Gutiérrez-Rojas, P. A. Friedman, A. R. Gortázar, and V. Alonso, “MINDIN secretion by prostate tumors induces premetastatic changes in bone via β -catenin,” *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 27, no. 7, pp. 441–456, Jul. 2020, doi: 10.1530/ERC-20-0116.
- [11] D. Bianchi-Frias *et al.*, “The aged microenvironment influences the tumorigenic potential of malignant prostate epithelial cells,” *Mol. Cancer Res.*, vol. 17, no. 1, pp. 321–331, Jan. 2019, doi: <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-18-0522>.
- [12] H. Onda *et al.*, “Identification of genes differentially expressed in canine vasospastic cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage,” *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 19, no. 11, pp. 1279–1288, 1999, doi: 10.1097/00004647-199911000-00013.
- [13] J. Schmitz *et al.*, “IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines,” *Immunity*, vol. 23, no. 5, pp. 479–490, Nov. 2005, doi: 10.1016/j.immuni.2005.09.015.
- [14] J. Jarosz, D. Papiernik, and J. Wietrzyk, “IL-33 - positive or negative role in cancer progression?,” *Postepy Hig. Med. Dosw.*, vol. 73, pp. 626–635, Nov. 2019, doi: 10.5604/01.3001.0013.5955.
- [15] D. S. M. Oliveira, S. Dzinic, A. I. Bonfil, A. D. Saliganan, S. Sheng, and R. D. Bonfil, “The mouse prostate: A basic anatomical and histological guideline,” *Bosn J Basic Med Sci.*, vol. 16, no. 1. pp. 8–13, 2016. doi: 10.17305/bjbms.2016.917.
- [16] T. Suwa, A. Nyska, J. K. Haseman, J. F. Mahler, and R. R. Maronpot,

BIBLIOGRAFIA

- “Spontaneous Lesions in Control B6C3F1 Mice and Recommended Sectioning of Male Accessory Sex Organs,” *Toxicol. Pathol.*, vol. 30, no. 2, pp. 228–234, 2002, doi: 10.1080/019262302753559560.
- [17] M. Ittmann, “Anatomy and histology of the human and murine prostate,” *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 8, no. 5, p. a030346, May 2018, doi: 10.1101/cshperspect.a030346.
- [18] J. M. Arriaga and C. Abate-Shen, “Genetically engineered mouse models of prostate cancer in the postgenomic era,” *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 9, no. 2, p. a030528, Feb. 2019, doi: 10.1101/cshperspect.a030528.
- [19] L. A. Mucci *et al.*, “Familial risk and heritability of cancer among twins in nordic countries,” *JAMA - J. Am. Med. Assoc.*, vol. 315, no. 1, pp. 68–76, Jan. 2016, doi: 10.1001/jama.2015.17703.
- [20] K. A. Cooney, “Inherited Predisposition to Prostate Cancer: From Gene Discovery to Clinical Impact,” *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.*, vol. 128, pp. 14–23, 2017.
- [21] C. Vanopstall *et al.*, “Title: Meis-mediated suppression of human prostate cancer growth and metastasis through *hoxb13*-dependent regulation of proteoglycans,” *Elife*, vol. 9, pp. 1–64, Jun. 2020, doi: 10.7554/eLife.53600.
- [22] J. LIU *et al.*, “Androgen deprivation-induced OPHN1 amplification promotes castration-resistant prostate cancer,” *Oncol. Rep.*, vol. 47, no. 1, pp. 1–10, Jan. 2022, doi: 10.3892/or.2021.8214.
- [23] “Prostate Cancer — Cancer Stat Facts.” <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/prost.html> (accessed Jun. 17, 2022).
- [24] M. S. Willis and F. H. Wians, “The role of nutrition in preventing prostate cancer: A review of the proposed mechanism of action of various dietary substances,” *Clinica Chimica Acta*, vol. 330, no. 1–2, pp. 57–83, 2003. doi: 10.1016/S0009-8981(03)00048-2.
- [25] L. A. Mucci, K. M. Wilson, and E. L. Giovannucci, “Epidemiology of prostate cancer,” *Pathol. Epidemiol. Cancer*, vol. 10, no. 2, pp. 107–125, 2016, doi: 10.1007/978-3-319-35153-7_9.
- [26] A. C. Vidal *et al.*, “Obesity, race, and long-term prostate cancer outcomes,” *Cancer*, vol. 126, no. 16, pp. 3733–3741, Aug. 2020, doi: 10.1002/cncr.32906.
- [27] M. N. Okobia, J. M. Zmuda, R. E. Ferrell, A. L. Patrick, and C. H. Bunker, “Chromosome 8q24 variants are associated with prostate cancer risk in a high risk population of African ancestry,” *Prostate*, vol. 71, no. 10, pp. 1054–1063, Jul. 2011, doi: 10.1002/pros.21320.
- [28] C. M. Robbins, S. Hooker, R. A. Kittles, and J. D. Carpten, “EphB2 SNPs and sporadic prostate cancer risk in African American Men,” *PLoS One*, vol. 6, no. 5, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0019494.
- [29] D. Hatcher, G. Daniels, I. Osman, and P. Lee, “Molecular mechanisms involving prostate cancer racial disparity,” *Am J Clin Exp Urol.*, vol. 1, no. 3, pp. 235–248, 2009.
- [30] I. Ahmad, O. J. Sansom, and H. Y. Leung, “Advances in mouse models of prostate cancer,” *Expert Rev. Mol. Med.*, vol. 10, no. 16, Jun. 2008, doi: 10.1017/S1462399408000689.
- [31] F. Bladou, R. L. Vessella, K. R. Buhler, W. J. Ellis, L. D. True, and P. H. Lange, “Cell proliferation and apoptosis during prostatic tumor xenograft involution and regrowth after castration,” *Int. J. Cancer*, vol. 67, no. 6, pp. 785–790, 1996, doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19960917)67:6<785::AID-IJC6>3.0.CO;2-N.
- [32] J. M. Liu, C. P. Yu, H. C. Chuang, C. Te Wu, and R. J. Hsu, “Androgen

BIBLIOGRAFIA

- deprivation therapy for prostate cancer and the risk of autoimmune diseases,” *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, vol. 22, no. 3, pp. 475–482, Sep. 2019, doi: 10.1038/s41391-019-0130-9.
- [33] L. W. Chu, J. Ritchey, S. S. Devesa, S. M. Quraishi, H. Zhang, and A. W. Hsing, “Prostate Cancer Incidence Rates in Africa,” *Prostate Cancer*, vol. 2011, pp. 1–6, 2011, doi: 10.1155/2011/947870.
- [34] A. W. Hsing, L. Tsao, and S. S. Devesa, “International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality,” *Int. J. Cancer*, vol. 85, no. 1, pp. 60–67, Jan. 2000, doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(20000101)85:1<60::AID-IJC11>3.0.CO;2-B.
- [35] A. T. Omaye and S. T. Omaye, “Caveats for the good and bad of dietary red meat,” *Antioxidants*, vol. 8, no. 11, Nov. 01, 2019. doi: 10.3390/antiox8110544.
- [36] D. P. Labbé *et al.*, “High-fat diet fuels prostate cancer progression by rewiring the metabolome and amplifying the MYC program,” *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–14, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-12298-z.
- [37] D. Aune *et al.*, “Dairy products, calcium, and prostate cancer risk: A systematic review and meta-analysis of cohort studies,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 101, no. 1, pp. 87–117, Jan. 2015, doi: 10.3945/ajcn.113.067157.
- [38] S. V. Singh *et al.*, “Sulforaphane-induced cell death in human prostate cancer cells is initiated by reactive oxygen species,” *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 20, pp. 19911–19924, May 2005, doi: 10.1074/jbc.M412443200.
- [39] X. Liu, J. D. Allen, J. T. Arnold, and M. R. Blackman, “Lycopene inhibits IGF-I signal transduction and growth in normal prostate epithelial cells by decreasing DHT-modulated IGF-I production in co-cultured reactive stromal cells,” *Carcinogenesis*, vol. 29, no. 4, pp. 816–823, Apr. 2008, doi: 10.1093/carcin/bgn011.
- [40] M. Zhou, “High-grade prostatic intraepithelial neoplasia, PIN-like carcinoma, ductal carcinoma, and intraductal carcinoma of the prostate,” *Mod. Pathol.*, vol. 31, no. 1, pp. 71–79, Jan. 2018, doi: 10.1038/modpathol.2017.138.
- [41] M. Varma *et al.*, “TNM clinical staging of prostate cancer: issues and solutions,” *BJU Int.*, vol. 123, no. 3, pp. 382–384, Mar. 2019, doi: 10.1111/bju.14589.
- [42] J. Herden, C. Wittekind, and L. Weissbach, “Discrepancy between theory and practice of the clinical tumor-nodes-metastasis (TNM) classification for localized prostate cancer,” *Ann. Transl. Med.*, vol. 7, no. 11, pp. 250–250, Jun. 2019, doi: 10.21037/atm.2019.05.42.
- [43] The Union for International Cancer Control’s (UICC), “8th Edition of the UICC TNM classification of Malignant Tumors published | UICC,” *UICC*, 2016. <https://www.uicc.org/news/8th-edition-uicc-tnm-classification-malignant-tumors-published> (accessed Nov. 12, 2020).
- [44] M. Piñeros *et al.*, “Essential TNM: a registry tool to reduce gaps in cancer staging information,” *Lancet Oncol.*, vol. 20, no. 2, pp. e103–e111, Feb. 01, 2019. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30897-0.
- [45] F. R. Greten and S. I. Grivennikov, “Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences,” *Immunity*, vol. 51, no. 1, pp. 27–41, Jul. 16, 2019. doi: 10.1016/j.immuni.2019.06.025.
- [46] K. J. Hiam-Galvez, B. M. Allen, and M. H. Spitzer, “Systemic immunity in cancer,” *Nat Rev Cancer.*, vol. 21, no. 6, pp. 345–359, Apr. 09, 2021. doi: 10.1038/s41568-021-00347-z.
- [47] C. Wang, Y. Zhang, and W. Q. Gao, “The evolving role of immune cells in prostate cancer,” *Cancer Lett.*, vol. 525, pp. 9–21, Jan. 2022, doi:

BIBLIOGRAFIA

- 10.1016/J.CANLET.2021.10.027.
- [48] P. Tsou, H. Katayama, E. J. Ostrin, and S. M. Hanash, “The Emerging Role of B Cells in Tumor Immunity,” *Cancer Res.*, vol. 76, no. 19, pp. 5591–5601, Oct. 2016, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0431.
- [49] J. R. Woo *et al.*, “Tumor infiltrating B-cells are increased in prostate cancer tissue,” *J. Transl. Med.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–9, Jan. 2014, doi: 10.1186/1479-5876-12-30.
- [50] G. Gannot *et al.*, “Decrease in CD8+ lymphocyte number and altered cytokine profile in human prostate cancer,” *Am. J. Cancer Res.*, vol. 1, no. 1, pp. 120–127, 2011, [Online]. Available: /pmc/articles/PMC3180108/
- [51] R. J. Mo *et al.*, “Expression of PD-L1 in tumor-associated nerves correlates with reduced CD8 + tumor-associated lymphocytes and poor prognosis in prostate cancer,” *Int. J. Cancer*, vol. 144, no. 12, pp. 3099–3110, Jun. 2019, doi: 10.1002/ijc.32061.
- [52] R. Muthuswamy, J. M. Corman, K. Dahl, G. S. Chatta, and P. Kalinski, “Functional reprogramming of human prostate cancer to promote local attraction of effector CD8+ T cells,” *Prostate*, vol. 76, no. 12, pp. 1095–1105, Sep. 2016, doi: 10.1002/pros.23194.
- [53] K. S. Sfanos, T. C. Bruno, A. K. Meeker, A. M. De Marzo, W. B. Isaacs, and C. G. Drake, “Human prostate-infiltrating CD8+ T lymphocytes are oligoclonal and PD-1+,” *Prostate*, vol. 69, no. 15, pp. 1694–1703, Nov. 2009, doi: 10.1002/pros.21020.
- [54] A. S. Japp *et al.*, “Dysfunction of PSA-specific CD8+ T cells in prostate cancer patients correlates with CD38 and Tim-3 expression,” *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 64, no. 11, pp. 1487–1494, Nov. 2015, doi: 10.1007/s00262-015-1752-y.
- [55] Y. Yang *et al.*, “High intratumoral CD8+ T-cell infiltration is associated with improved survival in prostate cancer patients undergoing radical prostatectomy,” *Prostate*, vol. 81, no. 1, pp. 20–28, Jan. 2021, doi: 10.1002/pros.24068.
- [56] B. J. Burbach *et al.*, “Irreversible electroporation augments checkpoint immunotherapy in prostate cancer and promotes tumor antigen-specific tissue-resident memory CD8+ T cells,” *Nat. Commun.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–16, Jun. 2021, doi: 10.1038/s41467-021-24132-6.
- [57] N. Ness *et al.*, “Infiltration of CD8+ lymphocytes is an independent prognostic factor of biochemical failure-free survival in prostate cancer,” *Prostate*, vol. 74, no. 14, pp. 1452–1461, 2014, doi: 10.1002/PROS.22862.
- [58] A. D. Waldman, J. M. Fritz, and M. J. Lenardo, “A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 20, no. 11, pp. 651–668, May 2020, doi: 10.1038/s41577-020-0306-5.
- [59] P. Muranski and N. P. Restifo, “Adoptive immunotherapy of cancer using CD4+ T cells,” *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 21, no. 2, pp. 200–208, Apr. 2009, doi: 10.1016/J.COI.2009.02.004.
- [60] X. Filella, J. Alcover, M. A. Zarco, P. Beardo, R. Molina, and A. M. Ballesta, “Analysis of type T1 and T2 cytokines in patients with prostate cancer,” *Prostate*, vol. 44, no. 4, pp. 271–274, 2000, doi: 10.1002/1097-0045(20000901)44:4<271::AID-PROS2>3.0.CO;2-G.
- [61] N. A. Bhavsar *et al.*, “A peripheral circulating TH1 cytokine profile is inversely associated with prostate cancer risk in CLUE II,” *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 23, no. 11, pp. 2561–2567, Nov. 2014, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-

BIBLIOGRAFIA

- 14-0010.
- [62] G. Jobin, R. Rodriguez-Suarez, and K. Betito, “Association Between Natural Killer Cell Activity and Colorectal Cancer in High-Risk Subjects Undergoing Colonoscopy,” *Gastroenterology*, vol. 153, no. 4, pp. 980–987, 2017, doi: 10.1053/j.gastro.2017.06.009.
- [63] B. S. Tae, B. J. Jeon, Y. H. Lee, H. Choi, J. Y. Park, and J. H. Bae, “Can natural killer cell activity help screen patients requiring a biopsy for the diagnosis of prostate cancer?,” *Int. Braz J Urol*, vol. 46, no. 2, pp. 244–252, 2020, doi: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2019.0268.
- [64] S. Muhammad Ali Tahir *et al.*, “Loss of IFN- γ Production by Invariant NK T Cells in Advanced Cancer,” *J. Immunol.*, vol. 167, no. 7, pp. 4046–4050, Oct. 2001, doi: 10.4049/jimmunol.167.7.4046.
- [65] F. Cortesi *et al.*, “Bimodal CD40/Fas-Dependent Crosstalk between iNKT Cells and Tumor-Associated Macrophages Impairs Prostate Cancer Progression,” *Cell Rep.*, vol. 22, no. 11, pp. 3006–3020, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.celrep.2018.02.058.
- [66] M. Bellone *et al.*, “iNKT cells control mouse spontaneous carcinoma independently of tumor-specific cytotoxic T cells,” *PLoS One*, vol. 5, no. 1, Jan. 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0008646.
- [67] S. Davidsson *et al.*, “FOXP3⁺ regulatory T cells in normal prostate tissue, postatrophic hyperplasia, prostatic intraepithelial neoplasia, and tumor histological lesions in men with and without prostate cancer,” *Prostate*, vol. 78, no. 1, pp. 40–47, Jan. 2018, doi: 10.1002/PROS.23442.
- [68] K. S. Sfanos *et al.*, “Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals T H17 and Treg skewing,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 14, no. 11, pp. 3254–3261, Jun. 2008, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-5164.
- [69] Q. Zhang *et al.*, “Targeting Th17-IL-17 Pathway in Prevention of Micro-Invasive Prostate Cancer in a Mouse Model,” *Prostate*, vol. 77, no. 8, pp. 888–899, Jun. 2017, doi: 10.1002/PROS.23343.
- [70] J. Liu, X. Geng, J. Hou, and G. Wu, “New insights into M1/M2 macrophages: key modulators in cancer progression,” *Cancer Cell Int.*, vol. 21, no. 1, pp. 1–7, Dec. 2021, doi: 10.1186/S12935-021-02089-2/FIGURES/2.
- [71] W. Hu *et al.*, “Alternatively activated macrophages are associated with metastasis and poor prognosis in prostate adenocarcinoma,” *Oncol. Lett.*, vol. 10, no. 3, pp. 1390–1396, Sep. 2015, doi: 10.3892/OL.2015.3400.
- [72] A. Erlandsson *et al.*, “M2 macrophages and regulatory T cells in lethal prostate cancer,” *Prostate*, vol. 79, no. 4, pp. 363–369, Mar. 2019, doi: 10.1002/PROS.23742.
- [73] S. H. Kim, J. Roszik, E. A. Grimm, and S. Ekmekcioglu, “Impact of l-Arginine Metabolism on Immune Response and Anticancer Immunotherapy,” *Front. Oncol.*, vol. 8, no. MAR, Mar. 2018, doi: 10.3389/FONC.2018.00067.
- [74] T. Hayashi *et al.*, “Peripheral blood monocyte count reflecting tumor-infiltrating macrophages is a predictive factor of adverse pathology in radical prostatectomy specimens,” *Prostate*, vol. 77, no. 14, pp. 1383–1388, Oct. 2017, doi: 10.1002/pros.23398.
- [75] K. A. Cavassani *et al.*, “Circulating monocytes from prostate cancer patients promote invasion and motility of epithelial cells,” *Cancer Med.*, vol. 7, no. 9, pp. 4639–4649, Sep. 2018, doi: 10.1002/cam4.1695.
- [76] Y. Wang, X. Dong, Z. Qu, K. Peng, X. Sun, and R. Chen, “Correlation between peripheral blood neutrophil-lymphocyte ratio and CD34 expression in prostate

BIBLIOGRAFIA

- cancer,” *BMC Cancer*, vol. 20, no. 1, pp. 1–12, Sep. 2020, doi: 10.1186/s12885-020-07382-3.
- [77] T. Lan, L. Chen, and X. Wei, “Inflammatory cytokines in cancer: Comprehensive understanding and clinical progress in gene therapy,” *Cells*, vol. 10, no. 1, pp. 1–16, Jan. 01, 2021. doi: 10.3390/cells10010100.
- [78] B. Faubert, A. Solmonson, and R. J. DeBerardinis, “Metabolic reprogramming and cancer progression,” *Science*, vol. 368, no. 6487, Apr. 10, 2020. doi: 10.1126/science.aaw5473.
- [79] N. Ron-Harel *et al.*, “T Cell Activation Depends on Extracellular Alanine,” *Cell Rep.*, vol. 28, no. 12, pp. 3011–3021.e4, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.celrep.2019.08.034.
- [80] L. V. Sinclair *et al.*, “Antigen receptor control of methionine metabolism in T cells,” *Elife*, vol. 8, no. 27, p. e44210, Mar. 2019, doi: 10.7554/eLife.44210.
- [81] S. Sengupta, A. Kennemer, K. Patrick, P. Tschlis, and M. Guerau-de-Arellano, “Protein Arginine Methyltransferase 5 in T Lymphocyte Biology,” *Trends Immunol.*, vol. 41, no. 10, pp. 918–931, Oct. 01, 2020. doi: 10.1016/j.it.2020.08.007.
- [82] M. H. Hung *et al.*, “Tumor methionine metabolism drives T-cell exhaustion in hepatocellular carcinoma,” *Nat. Commun.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–15, Dec. 2021, doi: 10.1038/s41467-021-21804-1.
- [83] K. C. Valkenburg and K. J. Pienta, “Drug discovery in prostate cancer mouse models,” *Expert Opin Drug Discov.*, vol. 10, no. 9, pp. 1011–1024, Sep. 02, 2015. doi: 10.1517/17460441.2015.1052790.
- [84] M. M. Grabowska *et al.*, “Mouse models of prostate cancer: Picking the best model for the question,” *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 33, no. 2–3, pp. 377–397, 2014. doi: 10.1007/s10555-013-9487-8.
- [85] W. Liu, Y. Zhu, L. Ye, Y. Zhu, and Y. Wang, “Establishment of an orthotopic prostate cancer xenograft mouse model using microscope-guided orthotopic injection of LNCaP cells into the dorsal lobe of the mouse prostate,” *BMC Cancer*, vol. 22, no. 1, pp. 1–12, Feb. 2022, doi: 10.1186/s12885-022-09266-0.
- [86] C. Shi, X. Chen, and D. Tan, “Development of patient-derived xenograft models of prostate cancer for maintaining tumor heterogeneity,” *Transl Androl Urol.*, vol. 8, no. 5, pp. 519–528, 2019. doi: 10.21037/tau.2019.08.31.
- [87] P. Jantscheff, J. Beshay, T. Lemarchand, C. Obodozie, C. Schächtele, and H. Weber, “Mouse-derived isograft (MDI) in vivo tumor models I. spontaneous sMDI models: Characterization and cancer therapeutic approaches,” *Cancers (Basel)*, vol. 11, no. 2, Feb. 2019, doi: 10.3390/cancers11020244.
- [88] N. M. Greenberg *et al.*, “Prostate cancer in a transgenic mouse,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 8, pp. 3439–3443, Apr. 1995, doi: 10.1073/pnas.92.8.3439.
- [89] A. Scherl, J. F. Li, R. D. Cardiff, and N. Schreiber-Agus, “Prostatic intraepithelial neoplasia and intestinal metaplasia in prostates of Probasin-RAS transgenic mice,” *Prostate*, vol. 59, no. 4, pp. 448–459, Jun. 2004, doi: 10.1002/pros.20020.
- [90] J. R. Gingrich, R. J. Barrios, B. A. Foster, and N. M. Greenberg, “Pathologic progression of autochthonous prostate cancer in the TRAMP model,” *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, vol. 2, no. 2, pp. 70–75, 1999, doi: 10.1038/sj.pcan.4500296.
- [91] R. Chen *et al.*, “A simple quantitative PCR assay to determine TRAMP transgene zygosity,” *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, vol. 24, no. 2, pp. 358–361, Jun. 2021,

BIBLIOGRAFIA

- doi: 10.1038/s41391-020-00282-4.
- [92] B. A. Foster, J. R. Gingrich, E. D. Kwon, C. Madias, and N. M. Greenberg, "Characterization of prostatic epithelial cell lines derived from transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) model," *Cancer Res.*, vol. 57, no. 16, pp. 3325–3330, 1997.
- [93] E. S. Leman, M. C. Madigan, G. Brünagel, N. Takaha, D. S. Coffey, and R. H. Getzenberg, "Nuclear matrix localization of high mobility group protein I(Y) in a transgenic mouse model for prostate cancer," *J. Cell. Biochem.*, vol. 88, no. 3, pp. 599–608, Feb. 2003, doi: 10.1002/jcb.10368.
- [94] N. Said, H. F. Frierson, D. Chernauskas, M. Conaway, K. Motamed, and D. Theodorescu, "The role of SPARC in the TRAMP model of prostate carcinogenesis and progression," *Oncogene*, vol. 28, no. 39, pp. 3487–3498, Oct. 2009, doi: 10.1038/onc.2009.205.
- [95] M. E. Grossmann, M. Wood, and E. Celis, "Expression, specificity and immunotherapy potential of prostate-associated genes in murine cell lines," *World J. Urol.*, vol. 19, no. 5, pp. 365–370, 2001, doi: 10.1007/PL00007104.
- [96] S. O. Freytag, K. N. Barton, and Y. Zhang, "Efficacy of oncolytic adenovirus expressing suicide genes and interleukin-12 in preclinical model of prostate cancer," *Gene Ther.*, vol. 20, no. 12, pp. 1131–1139, Dec. 2013, doi: 10.1038/GT.2013.40.
- [97] J. Lardizabal, J. Ding, Z. Delwar, P. S. Rennie, and W. Jia, "A TRAMP-derived orthotopic prostate syngeneic (TOPS) cancer model for investigating anti-tumor treatments," *Prostate*, vol. 78, no. 6, pp. 457–468, May 2018, doi: 10.1002/pros.23490.
- [98] K. D. Somers *et al.*, "Orthotopic treatment model of prostate cancer and metastasis in the immunocompetent mouse: Efficacy of flt3 ligand immunotherapy," *Int. J. Cancer*, vol. 107, no. 5, pp. 773–780, Dec. 2003, doi: 10.1002/ijc.11464.
- [99] M. Martini *et al.*, "IFN- γ -mediated upmodulation of MHC class I expression activates tumor-specific immune response in a mouse model of prostate cancer," *Vaccine*, vol. 28, no. 20, pp. 3548–3557, Apr. 2010, doi: 10.1016/j.vaccine.2010.03.007.
- [100] T. Yoneda *et al.*, "Overexpression of SOCS3 mediated by adenovirus vector in mouse and human castration-resistant prostate cancer cells increases the sensitivity to NK cells in vitro and in vivo," *Cancer Gene Ther.*, vol. 26, no. 11–12, pp. 388–399, Nov. 2019, doi: 10.1038/s41417-018-0075-5.
- [101] N. Kunimura *et al.*, "Combination of rAd-p53 in situ gene therapy and anti-PD-1 antibody immunotherapy induced anti-tumor activity in mouse syngeneic urogenital cancer models," *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, p. 17464, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-74660-2.
- [102] K. Kitagawa *et al.*, "Preclinical development of a WT1 oral cancer vaccine using a bacterial vector to treat castration-resistant prostate cancer," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 18, no. 5, pp. 980–990, 2019, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-18-1105.
- [103] X. L. Luo *et al.*, "Development and characterization of mammary intraductal (MIND) spontaneous metastasis models for triple-negative breast cancer in syngeneic mice," *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–11, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-61679-8.
- [104] J. W. Yu *et al.*, "Tumor-immune profiling of murine syngeneic tumor models as a framework to guide mechanistic studies and predict therapy response in distinct tumor microenvironments," *PLoS One*, vol. 13, no. 11, p. e0206223, Nov. 2018,

BIBLIOGRAFIA

- doi: 10.1371/journal.pone.0206223.
- [105] A. Le Naour, A. Rossary, and M. P. Vasson, “EO771, is it a well-characterized cell line for mouse mammary cancer model? Limit and uncertainty,” *Cancer Med.*, vol. 9, no. 21, pp. 8074–8085, Nov. 07, 2020. doi: 10.1002/cam4.3295.
- [106] W. R. Gutierrez *et al.*, “Divergent immune landscapes of primary and syngeneic Kras-driven mouse tumor models,” *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–14, Dec. 2021, doi: 10.1038/s41598-020-80216-1.
- [107] A. Lingel *et al.*, “Structure of IL-33 and Its Interaction with the ST2 and IL-1RAcP Receptors-Insight into Heterotrimeric IL-1 Signaling Complexes,” *Structure*, vol. 17, no. 10, pp. 1398–1410, Oct. 2009, doi: 10.1016/j.str.2009.08.009.
- [108] X. Liu *et al.*, “Structural insights into the interaction of IL-33 with its receptors,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 37, pp. 14918–14923, Sep. 2013, doi: 10.1073/pnas.1308651110.
- [109] V. Carriere *et al.*, “IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 1, pp. 282–287, Jan. 2007, doi: 10.1073/pnas.0606854104.
- [110] E. S. Baekkevold *et al.*, “Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules,” *Am. J. Pathol.*, vol. 163, no. 1, pp. 69–79, 2003, doi: 10.1016/S0002-9440(10)63631-0.
- [111] L. Roussel, M. Erard, C. Cayrol, and J. Girard, “Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A–H2B acidic pocket,” *EMBO Rep.*, vol. 9, no. 10, pp. 1006–1012, Oct. 2008, doi: 10.1038/embor.2008.145.
- [112] M. Li, B. C. A. M. van Esch, P. A. J. Henricks, J. Garssen, and G. Folkerts, “IL-33 is involved in the anti-inflammatory effects of butyrate and propionate on tnf α -activated endothelial cells,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 5, pp. 1–15, Mar. 2021, doi: 10.3390/ijms22052447.
- [113] C. Moussion, N. Ortega, and J. P. Girard, “The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: A novel ‘Alarmin’?,” *PLoS One*, vol. 3, no. 10, p. e3331, Oct. 2008, doi: 10.1371/journal.pone.0003331.
- [114] C. Shimokawa *et al.*, “Mast Cells Are Crucial for Induction of Group 2 Innate Lymphoid Cells and Clearance of Helminth Infections,” *Immunity*, vol. 46, no. 5, pp. 863–874.e4, May 2017, doi: 10.1016/j.immuni.2017.04.017.
- [115] M. Pichery *et al.*, “Endogenous IL-33 Is Highly Expressed in Mouse Epithelial Barrier Tissues, Lymphoid Organs, Brain, Embryos, and Inflamed Tissues: In Situ Analysis Using a Novel Il-33–LacZ Gene Trap Reporter Strain,” *J. Immunol.*, vol. 188, no. 7, pp. 3488–3495, Apr. 2012, doi: 10.4049/jimmunol.1101977.
- [116] T. Li *et al.*, “Graft IL-33 regulates infiltrating macrophages to protect against chronic rejection,” *J. Clin. Invest.*, vol. 130, no. 10, pp. 5397–5412, Oct. 2020, doi: 10.1172/JCI133008.
- [117] J. Bessa *et al.*, “Altered subcellular localization of IL-33 leads to non-resolving lethal inflammation,” *J. Autoimmun.*, vol. 55, no. 1, pp. 33–41, Dec. 2014, doi: 10.1016/j.jaut.2014.02.012.
- [118] F. Madouri *et al.*, “Caspase-1 activation by NLRP3 inflammasome dampens IL-33-dependent house dust mite-induced allergic lung inflammation,” *J. Mol. Cell Biol.*, vol. 7, no. 4, pp. 351–365, Aug. 2015, doi: 10.1093/jmcb/mjv012.
- [119] K. Neumann, B. Schiller, and G. Tiegs, “NLRP3 inflammasome and IL-33:

BIBLIOGRAFIA

- Novel players in sterile liver inflammation,” *Int J Mol Sci.*, vol. 19, no. 9. p. 2732, Sep. 12, 2018. doi: 10.3390/ijms19092732.
- [120] C. Cayrol and J. P. Girard, “The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 22, pp. 9021–9026, Jun. 2009, doi: 10.1073/pnas.0812690106.
- [121] C. Cayrol and J. P. Girard, “The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 22, pp. 9021–9026, 2009, doi: 10.1073/pnas.0812690106.
- [122] Q. Liu *et al.*, “IL-33–mediated IL-13 secretion by ST2+ Tregs controls inflammation after lung injury,” *JCI Insight*, vol. 4, no. 6, p. e123919, Mar. 2019, doi: 10.1172/jci.insight.123919.
- [123] A. U. Lüthi *et al.*, “Suppression of Interleukin-33 Bioactivity through Proteolysis by Apoptotic Caspases,” *Immunity*, vol. 31, no. 1, pp. 84–98, 2009, doi: 10.1016/j.immuni.2009.05.007.
- [124] S. P. Gadani, J. T. Walsh, I. Smirnov, J. Zheng, and J. Kipnis, “The Glia-Derived Alarmin IL-33 Orchestrates the Immune Response and Promotes Recovery following CNS Injury,” *Neuron*, vol. 85, no. 4, pp. 703–709, 2015, doi: 10.1016/j.neuron.2015.01.013.
- [125] C. Galand *et al.*, “IL-33 promotes food anaphylaxis in epicutaneously sensitized mice by targeting mast cells,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 138, no. 5, pp. 1356–1366, 2016, doi: 10.1016/j.jaci.2016.03.056.
- [126] U. M *et al.*, “Oxidative stress serves as a key checkpoint for IL-33 release by airway epithelium,” *Allergy*, vol. 72, no. 10, pp. 1521–1531, Oct. 2017, doi: 10.1111/ALL.13158.
- [127] H. Kouzaki, K. Iijima, T. Kobayashi, S. M. O’Grady, and H. Kita, “The Danger Signal, Extracellular ATP, Is a Sensor for an Airborne Allergen and Triggers IL-33 Release and Innate Th2-Type Responses,” *J. Immunol.*, vol. 186, no. 7, pp. 4375–4387, Apr. 2011, doi: 10.4049/jimmunol.1003020.
- [128] M. Hristova *et al.*, “Airway epithelial dual oxidase 1 mediates allergen-induced IL-33 secretion and activation of type 2 immune responses,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 137, no. 5, pp. 1545–1556.e11, May 2016, doi: 10.1016/j.jaci.2015.10.003.
- [129] D. Straus, D. T. Pryor, S. A. Kee, T. T. Haque, and J. J. Ryan, “IL-33 sensitizes mast cells to respond to a second alarmin, ATP, but not PAMPs,” *J. Immunol.*, vol. 206, no. 1 Supplement, 2021.
- [130] E. Katz-Kiriakos *et al.*, “Epithelial IL-33 appropriates exosome trafficking for secretion in chronic airway disease,” *JCI Insight*, vol. 6, no. 4, p. e136166, Feb. 2021, doi: 10.1172/jci.insight.136166.
- [131] D. Talabot-Ayer, C. Lamacchia, C. Gabay, and G. Palmer, “Interleukin-33 is biologically active independently of caspase-1 cleavage,” *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 29, pp. 19420–19426, Jul. 2009, doi: 10.1074/jbc.M901744200.
- [132] E. Lefrançais *et al.*, “IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 5, pp. 1673–1678, Jan. 2012, doi: 10.1073/pnas.1115884109.
- [133] E. Lefrançais *et al.*, “Central domain of IL-33 is cleaved by mast cell proteases for potent activation of group-2 innate lymphoid cells,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 43, pp. 15502–15507, Oct. 2014, doi: 10.1073/pnas.1410700111.
- [134] F. Perez *et al.*, “IL-33 Alarmin and Its Active Proinflammatory Fragments Are Released in Small Intestine in Celiac Disease,” *Front. Immunol.*, vol. 11, p. 2609,

BIBLIOGRAFIA

- Oct. 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.581445.
- [135] M. Saresella *et al.*, “IL-33 and its decoy sST2 in patients with Alzheimer’s disease and mild cognitive impairment,” *J. Neuroinflammation*, vol. 17, no. 1, pp. 1–10, Jun. 2020, doi: 10.1186/s12974-020-01806-4.
- [136] S. Bae *et al.*, “Contradictory functions (activation/termination) of neutrophil proteinase 3 enzyme (PR3) in interleukin-33 biological activity,” *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 11, pp. 8205–8213, Mar. 2012, doi: 10.1074/jbc.M111.295055.
- [137] A. U. Lüthi *et al.*, “Suppression of Interleukin-33 Bioactivity through Proteolysis by Apoptotic Caspases,” *Immunity*, vol. 31, no. 1, pp. 84–98, Jul. 2009, doi: 10.1016/j.immuni.2009.05.007.
- [138] E. S. Cohen *et al.*, “Oxidation of the alarmin IL-33 regulates ST2-dependent inflammation,” *Nat. Commun.*, vol. 6, no. 14, p. 8327, Sep. 2015, doi: 10.1038/ncomms9327.
- [139] C. Alt *et al.*, “Long-Acting IL-33 Mobilizes High-Quality Hematopoietic Stem and Progenitor Cells More Efficiently Than Granulocyte Colony-Stimulating Factor or AMD3100,” *Biol. Blood Marrow Transplant.*, vol. 25, no. 8, pp. 1475–1485, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.bbmt.2019.05.030.
- [140] K. Oshikawa, K. Yanagisawa, S. Tominaga, and Y. Sugiyama, “Expression and function of the ST2 gene in a murine model of allergic airway inflammation,” *Clin. Exp. Allergy*, vol. 32, no. 10, pp. 1520–1526, Oct. 2002, doi: 10.1046/j.1365-2745.2002.01494.x.
- [141] X. Yin, H. Cao, Y. Wei, and H. H. Li, “Alteration of the IL-33-sST2 pathway in hypertensive patients and a mouse model,” *Hypertens. Res.*, vol. 42, no. 11, pp. 1664–1671, Jun. 2019, doi: 10.1038/s41440-019-0291-x.
- [142] D. P. Lu *et al.*, “Serum soluble ST2 is associated with ER-positive breast cancer,” *BMC Cancer*, vol. 14, no. 1, pp. 1–8, Mar. 2014, doi: 10.1186/1471-2407-14-198.
- [143] Z. P. Yang *et al.*, “The association of serum IL-33 and sST2 with breast cancer,” *Dis. Markers*, vol. 2015, p. 516895, 2015, doi: 10.1155/2015/516895.
- [144] H. Hu *et al.*, “IL-33 facilitates endocrine resistance of breast cancer by inducing cancer stem cell properties,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 485, no. 3, pp. 643–650, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.02.080.
- [145] O. Shani *et al.*, “Fibroblast-derived IL33 facilitates breast cancer metastasis by modifying the immune microenvironment and driving type 2 immunity,” *Cancer Res.*, vol. 80, no. 23, pp. 5317–5329, Dec. 2020, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-2116.
- [146] E. C. Halvorsen *et al.*, “IL-33 increases ST2 + Tregs and promotes metastatic tumour growth in the lungs in an amphiregulin-dependent manner,” *Oncoimmunology*, vol. 8, no. 2, Feb. 2019, doi: 10.1080/2162402X.2018.1527497.
- [147] N. Huang, X. Cui, W. Li, C. Zhang, L. Liu, and J. Li, “IL-33/ST2 promotes the malignant progression of gastric cancer via the MAPK pathway,” *Mol. Med. Rep.*, vol. 23, no. 5, pp. 1–8, May 2021, doi: 10.3892/MMR.2021.12000.
- [148] L. A. Hu, Y. Fu, D. N. Zhang, and J. Zhang, “Serum IL-33 as a diagnostic and prognostic marker in nonsmall cell lung cancer,” *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, vol. 14, no. 4, pp. 2563–2566, 2013, doi: 10.7314/APJCP.2013.14.4.2563.
- [149] C. Wang *et al.*, “IL-33 signaling fuels outgrowth and metastasis of human lung cancer,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 479, no. 3, pp. 461–468, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.09.081.
- [150] X. Tong *et al.*, “Interleukin-33 predicts poor prognosis and promotes ovarian

BIBLIOGRAFIA

- cancer cell growth and metastasis through regulating ERK and JNK signaling pathways,” *Mol. Oncol.*, vol. 10, no. 1, pp. 113–125, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.molonc.2015.06.004.
- [151] N. Chatrabnous *et al.*, “Association of elevated interleukin-33 serum levels with tumorstages in patients with prostate cancer,” *Eur. Cytokine Netw.*, vol. 30, no. 4, pp. 144–150, Dec. 2019, doi: 10.1684/ECN.2019.0438.
- [152] W. Wang, J. Wu, M. Ji, and C. Wu, “Exogenous interleukin-33 promotes hepatocellular carcinoma growth by remodelling the tumour microenvironment,” *J. Transl. Med.*, vol. 18, no. 1, p. 477, Dec. 2020, doi: 10.1186/s12967-020-02661-w.
- [153] X Zheng, J. Chu, H. Jing, L. Choi, M. Wang, and W. Zhou, “Up-regulation of interleukin-33 serum levels in metastatic prostate cancer – American Journal of Biomedicine,” *Am. J. Biomed.*, vol. 2, no. 8, pp. 928–939, 2014, Accessed: Sep. 12, 2021. [Online]. Available: <https://ajbm.net/interleukin-33-in-prostate-cancer/>
- [154] I. Jovanovic *et al.*, “ST2 deletion enhances innate and acquired immunity to murine mammary carcinoma,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 41, no. 7, pp. 1902–1912, Jul. 2011, doi: 10.1002/EJI.201141417.
- [155] I. P. Jovanovic *et al.*, “Interleukin-33/ST2 axis promotes breast cancer growth and metastases by facilitating intratumoral accumulation of immunosuppressive and innate lymphoid cells,” *Int. J. Cancer*, vol. 134, no. 7, pp. 1669–1682, Apr. 2014, doi: 10.1002/ijc.28481.
- [156] J. Y. Kim, G. Kim, S. C. Lim, and H. S. Choi, “IL-33-induced transcriptional activation of Ipin1 accelerates breast tumorigenesis,” *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 9, p. 2174, Apr. 2021, doi: 10.3390/cancers13092174.
- [157] X. Feng *et al.*, “Recombinant virus-like particles presenting IL-33 successfully modify the tumor microenvironment and facilitate antitumor immunity in a model of breast cancer,” *Acta Biomater.*, vol. 100, pp. 316–325, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.actbio.2019.09.024.
- [158] Z. Y *et al.*, “IL-33 promotes growth and liver metastasis of colorectal cancer in mice by remodeling the tumor microenvironment and inducing angiogenesis,” *Mol. Carcinog.*, vol. 56, no. 1, pp. 272–287, Jan. 2017, doi: 10.1002/MC.22491.
- [159] K. M. Larsen, M. K. Minaya, V. Vaish, and M. M. O. Peña, “The role of IL-33/ST2 pathway in tumorigenesis,” *Int J Mol Sci.*, vol. 19, no. 9, p. 2676, Sep. 09, 2018. doi: 10.3390/ijms19092676.
- [160] M. Akimoto, R. Maruyama, H. Takamaru, T. Ochiya, and K. Takenaga, “Soluble IL-33 receptor sST2 inhibits colorectal cancer malignant growth by modifying the tumour microenvironment,” *Nat. Commun.*, vol. 24, no. 7, p. 13589, Nov. 2016, doi: 10.1038/ncomms13589.
- [161] Y. Li *et al.*, “IL-33 facilitates proliferation of colorectal cancer dependent on COX2/PGE2,” *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 37, no. 1, p. 196, Aug. 2018, doi: 10.1186/s13046-018-0839-7.
- [162] C. Wang *et al.*, “IL-33 signaling fuels outgrowth and metastasis of human lung cancer,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 479, no. 3, pp. 461–468, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.09.081.
- [163] X. Zhou *et al.*, “IL-33 promotes the growth of non-small cell lung cancer cells through regulating miR-128-3p/CDIP1 signalling pathway,” *Cancer Manag. Res.*, vol. 13, pp. 2379–2388, Mar. 2021, doi: 10.2147/CMAR.S276297.
- TRAMP-C2, changes in the immune landscape were observed in the levels of inf enhanced the migration and invasiveness of human lung cancer cells,” *Oncotargets. Ther.*, vol. 11, pp. 843–849, Feb. 2018, doi: 10.2147/OTT.S155905.

BIBLIOGRAFIA

- [165] K. Wang *et al.*, “IL-33 blockade suppresses tumor growth of human lung cancer through direct and indirect pathways in a preclinical model,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 40, pp. 68571–68582, Aug. 2017, doi: 10.18632/oncotarget.19786.
- [166] Y. Yue *et al.*, “Interleukin-33-nuclear factor- κ B-CCL2 signaling pathway promotes progression of esophageal squamous cell carcinoma by directing regulatory T cells,” *Cancer Sci.*, vol. 111, no. 3, pp. 795–806, Mar. 2020, doi: 10.1111/cas.14293.
- [167] A. Alam *et al.*, “Fungal mycobiome drives IL-33 secretion and type 2 immunity in pancreatic cancer,” *Cancer Cell*, vol. 40, no. 2, pp. 153-167.e11, Feb. 2022, doi: 10.1016/J.CCELL.2022.01.003.
- [168] J. Liu, J. X. Shen, J. L. Hu, W. H. Huang, and G. J. Zhang, “Significance of interleukin-33 and its related cytokines in patients with breast cancers,” *Front. Immunol.*, vol. 7, no. 5, p. 141, 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00141.
- [169] M. Yang *et al.*, “Lower expression level of IL-33 is associated with poor prognosis of pulmonary adenocarcinoma,” *PLoS One*, vol. 13, no. 3, p. e0193428, Mar. 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0193428.
- [170] I. Saranchova *et al.*, “Discovery of a Metastatic Immune Escape Mechanism Initiated by the Loss of Expression of the Tumour Biomarker Interleukin-33,” *Sci. Rep.*, vol. 13, no. 6, p. 30555, Sep. 2016, doi: 10.1038/srep30555.
- [171] S. Yangngam *et al.*, “High level of interleukin-33 in cancer cells and cancer-associated fibroblasts correlates with good prognosis and suppressed migration in cholangiocarcinoma,” *J. Cancer*, vol. 11, no. 22, pp. 6571–6581, 2020, doi: 10.7150/jca.48327.
- [172] Y. Fang *et al.*, “IL-33 acts as a foe to MIA PaCa-2 pancreatic cancer,” *Med. Oncol.*, vol. 34, no. 2, p. 23, Feb. 2017, doi: 10.1007/s12032-016-0880-3.
- [173] C. O’Donnell *et al.*, “An antitumorigenic role for the IL-33 receptor, ST2L, in colon cancer,” *Br. J. Cancer*, vol. 114, no. 1, pp. 37–43, Jan. 2016, doi: 10.1038/bjc.2015.433.
- [174] M. F. Eissmann *et al.*, “Interleukin 33 Signaling Restrains Sporadic Colon Cancer in an Interferon- γ -Dependent Manner,” *Cancer Immunol. Res.*, vol. 6, no. 4, pp. 409–421, Apr. 2018, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0218.
- [175] L. Qi *et al.*, “Interleukin-33 activates and recruits natural killer cells to inhibit pulmonary metastatic cancer development,” *Int. J. cancer*, vol. 146, no. 5, pp. 1421–1434, Mar. 2020, doi: 10.1002/IJC.32779.
- [176] P. Luo *et al.*, “The IL-33/ST2 pathway suppresses murine colon cancer growth and metastasis by upregulating CD40 L signaling,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 127, p. 110232, Jul. 2020, doi: 10.1016/J.BIOPHA.2020.110232.
- [177] D. Dominguez *et al.*, “Exogenous IL-33 Restores Dendritic Cell Activation and Maturation in Established Cancer,” *J. Immunol.*, vol. 198, no. 3, pp. 1365–1375, Feb. 2017, doi: 10.4049/JIMMUNOL.1501399.
- [178] V. Lucarini *et al.*, “IL-33 restricts tumor growth and inhibits pulmonary metastasis in melanoma-bearing mice through eosinophils,” *Oncoimmunology*, vol. 6, no. 6, p. e1317420, Jun. 2017, doi: 10.1080/2162402X.2017.1317420.
- [179] K. Gao *et al.*, “Transgenic expression of IL-33 activates CD8+ T cells and NK cells and inhibits tumor growth and metastasis in mice,” *Cancer Lett.*, vol. 335, no. 2, pp. 463–471, Jul. 2013, doi: 10.1016/j.canlet.2013.03.002.
- [180] X. Gao *et al.*, “Tumoral Expression of IL-33 Inhibits Tumor Growth and Modifies the Tumor Microenvironment through CD8 + T and NK Cells,” *J. Immunol.*, vol. 194, no. 1, pp. 438–445, Jan. 2015, doi: 10.4049/jimmunol.1401344.

BIBLIOGRAFIA

- [181] H. He *et al.*, “PD-1 blockade combined with IL-33 enhances the antitumor immune response in a type-1 lymphocyte-mediated manner,” *Cancer Treat. Res. Commun.*, vol. 28, p. 100379, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.CTARC.2021.100379.
- [182] B. Arneth, “Tumor microenvironment,” *Medicina (Lithuania)*, vol. 56, no. 1. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, p. 15, Dec. 30, 2020. doi: 10.3390/medicina56010015.
- [183] N. M. Anderson and M. C. Simon, “The tumor microenvironment,” *Curr. Biol.*, vol. 30, no. 16, pp. R921–R925, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.cub.2020.06.081.
- [184] Z.-P. Yang *et al.*, “The Association of Serum IL-33 and sST2 with Breast Cancer,” *Dis. Markers*, vol. 2015, p. 516895, 2015, doi: 10.1155/2015/516895.
- [185] X. Sun *et al.*, “Inflammatory cell-derived CXCL3 promotes pancreatic cancer metastasis through a novel myofibroblast-hijacked cancer escape mechanism,” *Gut*, vol. 71, no. 1, pp. 129–147, 2022, doi: 10.1136/gutjnl-2020-322744.
- [186] Y. C. Lin *et al.*, “Interleukin-33-enhanced CXCR4 signaling circuit mediated by carcinoma-associated fibroblasts promotes invasiveness of head and neck cancer,” *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 14, p. 3442, Jul. 2021, doi: 10.3390/cancers13143442.
- [187] X. X. Yu, Z. Hu, X. Shen, L. Y. Dong, W. Z. Zhou, and W. H. Hu, “IL-33 Promotes Gastric Cancer Cell Invasion and Migration Via ST2–ERK1/2 Pathway,” *Dig. Dis. Sci.*, vol. 60, no. 5, pp. 1265–1272, May 2015, doi: 10.1007/s10620-014-3463-1.
- [188] X. Liu *et al.*, “IL-33/ST2 pathway contributes to metastasis of human colorectal cancer,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 453, no. 3, pp. 486–492, Oct. 2014, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.09.106.
- [189] F. Yang *et al.*, “IL-33/ST2 Axis Regulates Vasculogenic Mimicry via ERK1/2-MMP-2/9 Pathway in Melanoma,” *Dermatology*, vol. 235, no. 3, pp. 225–233, May 2019, doi: 10.1159/000498857.
- [190] W. Ariyoshi, T. Okinaga, W. Chaweewannakorn, S. Akifusa, and T. Nisihara, “Mechanisms involved in enhancement of matrix metalloproteinase-9 expression in macrophages by interleukin-33,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 232, no. 12, pp. 3481–3495, Dec. 2017, doi: 10.1002/JCP.25809.
- [191] M. Z. Milosavljevic *et al.*, “Deletion of IL-33R attenuates VEGF expression and enhances necrosis in mammary carcinoma,” *Oncotarget*, vol. 7, no. 14, pp. 18106–18115, 2016, doi: 10.18632/oncotarget.7635.
- [192] T. C. Theoharides *et al.*, “IL-33 augments substance P–induced VEGF secretion from human mast cells and is increased in psoriatic skin,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, no. 9, pp. 4448–4453, Mar. 2010, doi: 10.1073/PNAS.1000803107.
- [193] C. Duez, B. Gross, P. Marquillies, V. Ledroit, B. Ryffel, and C. Glineur, “Regulation of IL (Interleukin)-33 Production in Endothelial Cells via Kinase Activation and Fas/CD95 Upregulation,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 40, no. 11, pp. 2619–2631, 2020, doi: 10.1161/ATVBAHA.120.314832.
- [194] Y.-S. Choi *et al.*, “Interleukin-33 induces angiogenesis and vascular permeability through ST2/TRAF6-mediated endothelial nitric oxide production,” *Blood*, vol. 114, no. 14, pp. 3117–3126, Oct. 2009, doi: 10.1182/BLOOD-2009-02-203372.
- [195] S. G. Kalathil and Y. Thanavala, “Importance of myeloid derived suppressor cells in cancer from a biomarker perspective,” *Cell. Immunol.*, vol. 361, p. 104280, Mar. 2021, doi: 10.1016/J.CELLIMM.2020.104280.
- [196] P. Xiao *et al.*, “Interleukin 33 in tumor microenvironment is crucial for the accumulation and function of myeloid-derived suppressor cells,” *Oncoimmunology*, vol. 5, no. 1, p. e1063772, 2016, doi:

BIBLIOGRAFIA

- 10.1080/2162402X.2015.1063772.
- [197] S. N. Byrne, C. Beaugie, C. O’Sullivan, S. Leighton, and G. M. Halliday, “The immune-modulating cytokine and endogenous alarmin interleukin-33 is upregulated in skin exposed to inflammatory UVB radiation,” *Am. J. Pathol.*, vol. 179, no. 1, pp. 211–222, Jul. 2011, doi: 10.1016/j.ajpath.2011.03.010.
- [198] A. M. Saadalla *et al.*, “Mast cells promote small bowel cancer in a tumor stage-specific and cytokine-dependent manner,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 115, no. 7, pp. 1588–1592, Feb. 2018, doi: 10.1073/pnas.1716804115.
- [199] R. L. Maywald *et al.*, “IL-33 activates tumor stroma to promote intestinal polyposis,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, no. 19, pp. E2487–E2496, May 2015, doi: 10.1073/PNAS.1422445112.
- [200] L. Cristinziano *et al.*, “Il-33 and superantigenic activation of human lung mast cells induce the release of angiogenic and lymphangiogenic factors,” *Cells*, vol. 10, no. 1, pp. 1–20, Jan. 2021, doi: 10.3390/cells10010145.
- [201] M. F. Eissmann *et al.*, “IL-33-mediated mast cell activation promotes gastric cancer through macrophage mobilization,” *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-10676-1.
- [202] S. Zhu, M. Yi, Y. Wu, B. Dong, and K. Wu, “Roles of tumor-associated macrophages in tumor progression: implications on therapeutic strategies,” *Exp Hematol Oncol.*, vol. 10, no. 1. Exp Hematol Oncol, p. 60, Dec. 01, 2021. doi: 10.1186/s40164-021-00252-z.
- [203] M. Liguori *et al.*, “The soluble glycoprotein NMB (GPNMB) produced by macrophages induces cancer stemness and metastasis via CD44 and IL-33,” *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 18, no. 3, pp. 711–722, Jul. 2021, doi: 10.1038/s41423-020-0501-0.
- [204] A. De Boeck *et al.*, “Glioma-derived IL-33 orchestrates an inflammatory brain tumor microenvironment that accelerates glioma progression,” *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–24, Oct. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-18569-4.
- [205] H. Xu *et al.*, “The IL-33/ST2 axis affects tumor growth by regulating mitophagy in macrophages and reprogramming their polarization,” *Cancer Biol. Med.*, vol. 18, no. 1, p. 172, Feb. 2021, doi: 10.20892/J.ISSN.2095-3941.2020.0211.
- [206] S. Taniguchi, A. Elhance, A. van Duzer, S. Kumar, J. J. Leitenberger, and N. Oshimori, “Tumor-initiating cells establish an IL-33–TGF- β niche signaling loop to promote cancer progression,” *Science.*, vol. 369, no. 6501, p. eaay1813, Jul. 2020, doi: 10.1126/science.aay1813.
- [207] J. Wu *et al.*, “Interleukin-33 is a Novel Immunosuppressor that Protects Cancer Cells from TIL Killing by a Macrophage-Mediated Shedding Mechanism,” *Adv. Sci.*, vol. 8, no. 21, Nov. 2021, doi: 10.1002/adv.202101029.
- [208] H. Spits *et al.*, “Innate lymphoid cells—a proposal for uniform nomenclature,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 13, no. 2, pp. 145–149, Jan. 2013, doi: 10.1038/nri3365.
- [209] A. Long *et al.*, “Type 2 Innate Lymphoid Cells Impede IL-33–Mediated Tumor Suppression,” *J. Immunol.*, vol. 201, no. 11, pp. 3456–3464, Dec. 2018, doi: 10.4049/JIMMUNOL.1800173.
- [210] G. Ercolano *et al.*, “PPAR γ drives IL-33-dependent ILC2 pro-tumoral functions,” *Nat. Commun.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–13, May 2021, doi: 10.1038/s41467-021-22764-2.
- [211] J. A. Moral *et al.*, “ILC2s amplify PD-1 blockade by activating tissue-specific cancer immunity,” *Nat. 2020 5797797*, vol. 579, no. 7797, pp. 130–135, Feb. 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2015-4.
- [212] W. M *et al.*, “Tumor-Derived Lactic Acid Contributes to the Paucity of

BIBLIOGRAFIA

- Intratumoral ILC2s,” *Cell Rep.*, vol. 30, no. 8, pp. 2743–2757.e5, Feb. 2020, doi: 10.1016/J.CELREP.2020.01.103.
- [213] J. Kim *et al.*, “Intratumorally Establishing Type 2 Innate Lymphoid Cells Blocks Tumor Growth,” *J. Immunol.*, vol. 196, no. 5, pp. 2410–2423, Mar. 2016, doi: 10.4049/JIMMUNOL.1501730.
- [214] G. Varricchi *et al.*, “Eosinophils: The unsung heroes in cancer?,” *Oncoimmunology*, vol. 7, no. 2. Oncoimmunology, p. e1393134, Feb. 01, 2018. doi: 10.1080/2162402X.2017.1393134.
- [215] L. Simson *et al.*, “Regulation of Carcinogenesis by IL-5 and CCL11: A Potential Role for Eosinophils in Tumor Immune Surveillance,” *J. Immunol.*, vol. 178, no. 7, pp. 4222–4229, Apr. 2007, doi: 10.4049/JIMMUNOL.178.7.4222.
- [216] S. Sanada, D. Hakuno, L. J. Higgins, E. R. Schreiter, A. N. J. McKenzie, and R. T. Lee, “IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system,” *J. Clin. Invest.*, vol. 117, no. 6, pp. 1538–1549, Jun. 2007, doi: 10.1172/JCI30634.
- [217] S. Andreone *et al.*, “IL-33 promotes CD11b/CD18-mediated adhesion of eosinophils to cancer cells and synapse-polarized degranulation leading to tumor cell killing,” *Cancers (Basel)*, vol. 11, no. 11, p. 1664, Nov. 2019, doi: 10.3390/cancers11111664.
- [218] M. Kienzl *et al.*, “IL-33 reduces tumor growth in models of colorectal cancer with the help of eosinophils,” *Oncoimmunology*, vol. 9, no. 1, p. 1776059, Jan. 2020, doi: 10.1080/2162402X.2020.1776059.
- [219] K. Johansson, C. Malmhäll, P. Ramos-Ramírez, and M. Rådinger, “Bone marrow type 2 innate lymphoid cells: a local source of interleukin-5 in interleukin-33-driven eosinophilia,” *Immunology*, vol. 153, no. 2, pp. 268–278, Feb. 2018, doi: 10.1111/IMM.12842.
- [220] M. R. Galdiero, G. Varricchi, M. Seaf, G. Marone, F. Levi-Schaffer, and G. Marone, “Bidirectional mast cell-eosinophil interactions in inflammatory disorders and cancer,” *Frontiers in Medicine*, vol. 24, no. 4. p. 103, 2017. doi: 10.3389/fmed.2017.00103.
- [221] Y. Kondo *et al.*, “Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adaptive immune system,” *Int. Immunol.*, vol. 20, no. 6, pp. 791–800, Jun. 2008, doi: 10.1093/INTIMM/DXN037.
- [222] Y. Xia *et al.*, “Endogenous IL-33 exerts CD8+ T cell antitumor responses overcoming pro-tumor effects by regulatory T cells in a colon carcinoma model,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 518, no. 2, pp. 331–336, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.bbrc.2019.08.058.
- [223] M. Komai-Koma, E. Wang, M. Kurowska-Stolarska, D. Li, C. McSharry, and D. Xu, “Interleukin-33 promoting Th1 lymphocyte differentiation depends on IL-12,” *Immunobiology*, vol. 221, no. 3, p. 412, Mar. 2016, doi: 10.1016/J.IMBIO.2015.11.013.
- [224] Z. Jin *et al.*, “IL-33 Released in the Liver Inhibits Tumor Growth via Promotion of CD4 + and CD8 + T Cell Responses in Hepatocellular Carcinoma,” *J. Immunol.*, vol. 201, no. 12, pp. 3770–3779, Dec. 2018, doi: 10.4049/jimmunol.1800627.
- [225] T. Rivera Vargas, E. Humblin, F. Végran, F. Ghiringhelli, and L. Apetoh, “TH9 cells in anti-tumor immunity,” *Seminars in Immunopathology*, vol. 39, no. 1. pp. 39–46, Nov. 10, 2017. doi: 10.1007/s00281-016-0599-4.
- [226] E. Pastille *et al.*, “The IL-33/ST2 pathway shapes the regulatory T cell phenotype

BIBLIOGRAFIA

- to promote intestinal cancer,” *Mucosal Immunol.*, vol. 12, no. 4, pp. 990–1003, Jun. 2019, doi: 10.1038/s41385-019-0176-y.
- [227] A. Li *et al.*, “IL-33 Signaling Alters Regulatory T Cell Diversity in Support of Tumor Development,” *Cell Rep.*, vol. 29, no. 10, pp. 2998–3008.e8, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.celrep.2019.10.120.
- [228] A. Hatzioannou *et al.*, “An intrinsic role of IL-33 in Treg cell-mediated tumor immunoevasion,” *Nat. Immunol.*, vol. 21, no. 1, pp. 75–85, Jan. 2020, doi: 10.1038/s41590-019-0555-2.
- [229] J. Son *et al.*, “Tumor-Infiltrating Regulatory T-cell Accumulation in the Tumor Microenvironment Is Mediated by IL33/ST2 Signaling,” *Cancer Immunol. Res.*, vol. 8, no. 11, pp. 1393–1406, Nov. 2020, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0828.
- [230] J. Biton *et al.*, “In Vivo Expansion of Activated Foxp3 + Regulatory T Cells and Establishment of a Type 2 Immune Response upon IL-33 Treatment Protect against Experimental Arthritis,” *J. Immunol.*, vol. 197, no. 5, pp. 1708–1719, Sep. 2016, doi: 10.4049/jimmunol.1502124.
- [231] Y. Zhou, Y. Ji, H. Wang, H. Zhang, and H. Zhou, “Il-33 promotes the development of colorectal cancer through inducing tumor-infiltrating ST2L+ regulatory T cells in mice,” *Technol. Cancer Res. Treat.*, vol. 1, no. 17, p. 1533033818780091, Jan. 2018, doi: 10.1177/1533033818780091.
- [232] B. M. Matta *et al.*, “IL-33 Is an Unconventional Alarmin That Stimulates IL-2 Secretion by Dendritic Cells To Selectively Expand IL-33R/ST2 + Regulatory T Cells,” *J. Immunol.*, vol. 193, no. 8, pp. 4010–4020, Oct. 2014, doi: 10.4049/jimmunol.1400481.
- [233] Y. Liang *et al.*, “IL-33 activates mTORC1 and modulates glycolytic metabolism in CD8+ T cells,” *Immunology*, vol. 165, no. 1, pp. 61–73, Jan. 2022, doi: 10.1111/imm.13404.
- [234] L. Chen *et al.*, “Tumor-derived IL33 Promotes tissue-resident CD8 β T cells and is required for checkpoint blockade tumor immunotherapy,” *Cancer Immunol. Res.*, vol. 8, no. 11, pp. 1381–1392, Nov. 2020, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-19-1024.
- [235] A. Jewett *et al.*, “Natural Killer Cells: Diverse Functions in Tumor Immunity and Defects in Pre-neoplastic and Neoplastic Stages of Tumorigenesis,” *Mol Ther Oncolytics.*, vol. 16, pp. 41–52, Mar. 27, 2020. doi: 10.1016/j.omto.2019.11.002.
- [236] M. J. Nayeem *et al.*, “Imatinib mesylate inhibits androgen-independent PC-3 cell viability, proliferation, migration, and tumor growth by targeting platelet-derived growth factor receptor- α ,” *Life Sci.*, vol. 288, p. 120171, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.lfs.2021.120171.
- [237] K. Klose, E. M. Packeiser, J. L. Granados-Soler, M. Hewicker-Trautwein, H. Murua Escobar, and I. Nolte, “Evaluation of the therapeutic potential of masitinib and expression of its specific targets c-Kit, PDGFR- α , PDGFR- β , and Lyn in canine prostate cancer cell lines,” *Vet. Comp. Oncol.*, pp. 1–12, 2022, doi: 10.1111/vco.12817.
- [238] I. Ahmed and M. Sozmen, “Expression of PDGF-A, PDGFRA, integrin subunit alpha V and selectin E is increased in canine cutaneous fibrosarcomas,” *Biotech. Histochem.*, vol. 96, no. 7, pp. 546–554, 2021, doi: 10.1080/10520295.2020.1832256.
- [239] W. Zhang *et al.*, “Comparative Study of Subcutaneous and Orthotopic Mouse Models of Prostate Cancer: Vascular Perfusion, Vasculature Density, Hypoxic Burden and BB2r-Targeting Efficacy,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, p. 11117, Jul. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-47308-z.

BIBLIOGRAFIA

- [240] Z. Melegh and S. Oltean, "Targeting angiogenesis in prostate cancer," *Int J Mol Sci.*, vol. 20, no. 11. Jun. 01, 2019. doi: 10.3390/ijms20112676.
- [241] C. Sarkar, S. Goswami, S. Basu, and D. Chakroborty, "Angiogenesis inhibition in prostate cancer: An update," *Cancers*, vol. 12, no. 9. pp. 1–21, Sep. 01, 2020. doi: 10.3390/cancers12092382.
- [242] A. Torres Crigna, B. Link, M. Samec, F. A. Giordano, P. Kubatka, and O. Golubnitschaja, "Endothelin-1 axes in the framework of predictive, preventive and personalised (3P) medicine," *EPMA J.*, vol. 12, no. 3. pp. 265–305, 2021. doi: 10.1007/s13167-021-00248-z.
- [243] P. Tocci, G. Blandino, and A. Bagnato, "YAP and endothelin-1 signaling: an emerging alliance in cancer," *J Exp Clin Cancer Res.*, vol. 40, no. 1. pp. 1–12, Jan. 09, 2021. doi: 10.1186/s13046-021-01827-8.
- [244] E. Vancauwenberghe *et al.*, "Involvement of Ion Channels in Endothelin-1-induced Signalling in Human Prostate Cancer Cells," *J. Cell Signal.*, vol. 1, no. 4, 2016, doi: 10.4172/2576-1471.1000126.
- [245] M. J. Torres *et al.*, "Endothelin-1 induces changes in the expression levels of steroidogenic enzymes and increases androgen receptor and testosterone production in the PC3 prostate cancer cell line," *Oncol. Rep.*, vol. 46, no. 2, p. 171, Aug. 2021, doi: 10.3892/OR.2021.8122.
- [246] Y. Lu *et al.*, "CXCL1-LCN2 paracrine axis promotes progression of prostate cancer via the Src activation and epithelial-mesenchymal transition," *Cell Commun. Signal.*, vol. 17, no. 1, p. 118, Dec. 2019, doi: 10.1186/s12964-019-0434-3.
- [247] Y. Su *et al.*, "FOXA1 promotes prostate cancer angiogenesis by inducing multiple pro-angiogenic factors expression," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 147, no. 11, pp. 3225–3243, Nov. 2021, doi: 10.1007/s00432-021-03730-3.
- [248] M. Kiss, A. A. Caro, G. Raes, and D. Laoui, "Systemic Reprogramming of Monocytes in Cancer," *Front Oncol.*, vol. 10. p. 1399, Sep. 17, 2020. doi: 10.3389/fonc.2020.01399.
- [249] C. E. Olingy, H. Q. Dinh, and C. C. Hedrick, "Monocyte heterogeneity and functions in cancer," *J J Leukoc Biol.*, vol. 106, no. 2. pp. 309–322, Aug. 01, 2019. doi: 10.1002/JLB.4RI0818-311R.
- [250] N. V. Serbina and E. G. Pamer, "Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2," *Nat. Immunol.*, vol. 7, no. 3, pp. 311–317, Mar. 2006, doi: 10.1038/ni1309.
- [251] C. V. Jakubzick, G. J. Randolph, and P. M. Henson, "Monocyte differentiation and antigen-presenting functions," *Nat Rev Immunol.*, vol. 17, no. 6. pp. 349–362, Jun. 01, 2017. doi: 10.1038/nri.2017.28.
- [252] C. E. Olingy *et al.*, "Non-classical monocytes are biased progenitors of wound healing macrophages during soft tissue injury," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 447, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-00477-1.
- [253] J. W. Zhou *et al.*, "A novel robust nomogram based on peripheral monocyte counts for predicting lymph node metastasis of prostate cancer," *Asian J. Androl.*, vol. 23, no. 4, pp. 409–414, Jul. 2021, doi: 10.4103/aja.aja_89_20.
- [254] A. P. Martin, S. Rankin, S. Pitchford, I. F. Charo, G. C. Furtado, and S. A. Lira, "Increased expression of CCL2 in insulin-producing cells of transgenic mice promotes mobilization of myeloid cells from the bone marrow, marked insulinitis, and diabetes," *Diabetes*, vol. 57, no. 11, pp. 3025–3033, Nov. 2008, doi: 10.2337/db08-0625.
- [255] A. N. Orekhov *et al.*, "Monocyte differentiation and macrophage polarization,"

BIBLIOGRAFIA

- Vessel Plus*, vol. 3. OAE Publishing Inc., p. 10, Mar. 21, 2019. doi: 10.20517/2574-1209.2019.04.
- [256] G. Rizzo, R. Di Maggio, A. Benedetti, J. Morroni, M. Bouche, and B. Lozanoska-Ochser, “Splenic Ly6Chi monocytes are critical players in dystrophic muscle injury and repair,” *JCI Insight*, vol. 5, no. 2, p. e130807, Jan. 2020, doi: 10.1172/jci.insight.130807.
- [257] M. Becerra-Díaz *et al.*, “STAT1-dependent recruitment of Ly6ChiCCR2+ inflammatory monocytes and M2 macrophages in a helminth infection,” *Pathogens*, vol. 10, no. 10, p. 1287, Oct. 2021, doi: 10.3390/pathogens10101287.
- [258] P. J. Wermuth and S. A. Jimenez, “The significance of macrophage polarization subtypes for animal models of tissue fibrosis and human fibrotic diseases,” *Clin. Transl. Med.*, vol. 4, no. 1, Dec. 2015, doi: 10.1186/s40169-015-0047-4.
- [259] Y. B. Cihan, A. Arslan, and M. A. Ergul, “Subtypes of white blood cells in patients with prostate cancer or benign prostatic hyperplasia and healthy individuals,” *Asian Pac J Cancer Prev*, vol. 14, no. 8, pp. 4779–4783, 2013, doi: 10.7314/APJCP.2013.14.8.4779.
- [260] A. C. McDonald, M. A. Vira, A. C. Vidal, W. Gan, S. J. Freedland, and E. Taioli, “Association between systemic inflammatory markers and serum prostate-specific antigen in men without prostatic disease - The 2001-2008 National Health and Nutrition examination survey,” *Prostate*, vol. 74, no. 5, pp. 561–567, May 2014, doi: 10.1002/pros.22782.
- [261] A. M. Miller *et al.*, “CD4 + CD25 high T Cells Are Enriched in the Tumor and Peripheral Blood of Prostate Cancer Patients,” *J. Immunol.*, vol. 177, no. 10, pp. 7398–7405, Nov. 2006, doi: 10.4049/jimmunol.177.10.7398.
- [262] H. Gonzalez, C. Hagerling, and Z. Werb, “Roles of the immune system in cancer: From tumor initiation to metastatic progression,” *Genes Dev.*, vol. 32, no. 19–20, pp. 1267–1284, 2018. doi: 10.1101/GAD.314617.118.
- [263] M. Vučetić, Y. Cormerais, S. K. Parks, and J. Pouysségur, “The central role of amino acids in cancer redox homeostasis: Vulnerability points of the cancer redox code,” *Front Oncol.*, vol. 7, no. DEC. p. 319, Dec. 21, 2017. doi: 10.3389/fonc.2017.00319.
- [264] X. Li, H. Zhu, W. Sun, X. Yang, Q. Nie, and X. Fang, “Role of glutamine and its metabolite ammonia in crosstalk of cancer-associated fibroblasts and cancer cells,” *Cancer Cell Int.*, vol. 21, no. 1. pp. 1–13, Sep. 09, 2021. doi: 10.1186/s12935-021-02121-5.
- [265] Z. Wei, X. Liu, C. Cheng, W. Yu, and P. Yi, “Metabolism of Amino Acids in Cancer,” *Front Cell Dev Biol.*, vol. 8. p. 1628, Jan. 12, 2021. doi: 10.3389/fcell.2020.603837.
- [266] P. Dereziński, A. Klupczynska, W. Sawicki, J. A. Pałka, and Z. J. Kokot, “Amino acid profiles of serum and urine in search for prostate cancer biomarkers: A pilot study,” *Int. J. Med. Sci.*, vol. 14, no. 1, pp. 1–12, Jan. 2017, doi: 10.7150/ijms.15783.
- [267] L. Angka *et al.*, “Perioperative arginine prevents metastases by accelerating natural killer cell recovery after surgery,” *Mol Ther.*, vol. 22, pp. 00322–7, May 2022, doi: 10.1016/j.ymthe.2022.05.024.
- [268] Y. Bian *et al.*, “Cancer SLC43A2 alters T cell methionine metabolism and histone methylation,” *Nature*, vol. 585, no. 7824, pp. 277–282, Sep. 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2682-1.
- [269] Y. Satoh, H. Kotani, Y. Iida, T. Taniura, Y. Notsu, and M. Harada, “Supplementation of l-arginine boosts the therapeutic efficacy of anticancer

BIBLIOGRAFIA

- chemoimmunotherapy,” *Cancer Sci.*, vol. 111, no. 7, pp. 2248–2258, Jul. 2020, doi: 10.1111/cas.14490.
- [270] M. Jiang *et al.*, “Phenylalanine enhances innate immune response to clear ceftazidime-resistant *Vibrio alginolyticus* in *Danio rerio*,” *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 84, pp. 912–919, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.fsi.2018.10.071.
- [271] T. Sartori *et al.*, “Branched chain amino acids improve mesenchymal stem cell proliferation, reducing nuclear factor kappa B expression and modulating some inflammatory properties,” *Nutrition*, vol. 78, p. 110935, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.nut.2020.110935.
- [272] U. Yadav, P. Kumar, and V. Rai, “Interleukin-10 (IL-10) gene polymorphisms and prostate cancer susceptibility: Evidence from a meta-analysis,” *Gene Reports*, vol. 25, p. 101377, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.genrep.2021.101377.
- [273] V. Carrière *et al.*, “Endogenous IL-33 Deficiency Exacerbates Liver Injury and Increases Hepatic Influx of Neutrophils in Acute Murine Viral Hepatitis,” *Mediat. Inflamm.*, vol. 2017, 2017, doi: 10.1155/2017/1359064.
- [274] M. R. Choi, J. A. Sosman, and B. Zhang, “The janus face of il-33 signaling in tumor development and immune escape,” *Cancers*, vol. 13, no. 13. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, p. 3281, Jun. 30, 2021. doi: 10.3390/cancers13133281.
- [275] J. F. Zhang *et al.*, “IL-33 enhances glioma cell migration and invasion by upregulation of MMP2 and MMP9 via the ST2-NF- κ B pathway,” *Oncol. Rep.*, vol. 38, no. 4, pp. 2033–2042, Oct. 2017, doi: 10.3892/or.2017.5926.
- [276] X. H. Wang *et al.*, “IL-33 restricts invasion and adhesion of trophoblast cell line JEG3 by downregulation of integrin $\alpha 4\beta 1$ and CD62L,” *Mol. Med. Rep.*, vol. 16, no. 4, pp. 3887–3893, Oct. 2017, doi: 10.3892/mmr.2017.7085.
- [277] M. A. Bawazeer and T. C. Theoharides, “IL-33 stimulates human mast cell release of CCL5 and CCL2 via MAPK and NF- κ B, inhibited by methoxyluteolin,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 865, p. 172760, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.ejphar.2019.172760.
- [278] Y. Lu *et al.*, “Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) acts as a paracrine and autocrine factor for prostate cancer growth and invasion,” *Prostate*, vol. 66, no. 12, pp. 1311–1318, Sep. 2006, doi: 10.1002/pros.20464.
- [279] M. Lund *et al.*, “Plasma Chemokine C-C Motif Ligand 2 as a Potential Biomarker for Prostate Cancer,” *Res. Reports Urol.*, vol. 14, pp. 33–38, Feb. 2022, doi: 10.2147/RRU.S346978.
- [280] R. D. Loberg *et al.*, “CCL2 is a potent regulator of prostate cancer cell migration and proliferation,” *Neoplasia*, vol. 8, no. 7, pp. 578–586, 2006, doi: 10.1593/neo.06280.
- [281] E. Gobin *et al.*, “A pan-cancer perspective of matrix metalloproteases (MMP) gene expression profile and their diagnostic/prognostic potential,” *BMC Cancer*, vol. 19, no. 1, pp. 1–10, Jun. 2019, doi: 10.1186/s12885-019-5768-0.
- [282] J. S. Frieling, T. Li, M. Tauro, and C. C. Lynch, “Prostate cancer-derived MMP-3 controls intrinsic cell growth and extrinsic angiogenesis,” *Neoplasia (United States)*, vol. 22, no. 10, pp. 511–521, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.neo.2020.08.004.
- [283] F. Ma, Z. Wang, A. Abdularab, L. Dai, Y. Niu, and N. Jiang, “Matrix metalloproteinase 9 and prostate cancer risk: A meta-analysis of 1059 participants,” *Minerva Urol Nefrol.*, vol. 69, no. 4, pp. 324–329, Aug. 01, 2017. doi: 10.23736/S0393-2249.16.02623-0.
- [284] A. Ok Atılgan, B. H. Özdemir, E. Yılmaz Akçay, M. Tepeoğlu, P. Börcek, and A. Dirim, “Association between focal adhesion kinase and matrix

BIBLIOGRAFIA

- metalloproteinase-9 expression in prostate adenocarcinoma and their influence on the progression of prostatic adenocarcinoma,” *Ann. Diagn. Pathol.*, vol. 45, p. 151480, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.anndiagpath.2020.151480.
- [285] R. Aalinkeel *et al.*, “Overexpression of MMP-9 contributes to invasiveness of prostate cancer cell line LNCaP,” *Immunol. Invest.*, vol. 40, no. 5, pp. 447–464, 2011, doi: 10.3109/08820139.2011.557795.
- [286] M. S. Molla, D. R. Katti, J. Iswara, R. Venkatesan, R. Paulmurugan, and K. S. Katti, “Prostate Cancer Phenotype Influences Bone Mineralization at Metastasis: A Study Using an In Vitro Prostate Cancer Metastasis Testbed,” *JBMR Plus*, vol. 4, no. 2, p. e10256, Feb. 2020, doi: 10.1002/jbm4.10256.
- [287] P. Andersson *et al.*, “Molecular mechanisms of IL-33-mediated stromal interactions in cancer metastasis,” *JCI insight*, vol. 3, no. 20, p. e122375, Oct. 2018, doi: 10.1172/jci.insight.122375.

SPIS RYCIN I TABEL

Rycina 1.1 Rozkład nowych przypadków oraz zgonów dla najczęstszych nowotworów na świecie w roku 2020 wśród (A) kobiet i (B) mężczyzn.....	16
Rycina 1.2 Rozkład nowych przypadków oraz zgonów dla najczęstszych nowotworów w Polsce w roku 2019 wśród (A) kobiet i (B) mężczyzn.	16
Rycina 1.3 Mechanizm działania IL-33.....	30
Rycina 3.1 Schemat eksperymentu z ortotopowym wszczepieniem komórek mysiego raka gruczołu krokowego.....	48
Rycina 3.2 Zdjęcie obrazowanie ultrasonograficzne	49
Rycina 3.3 Schemat zastosowanego programu podczas reakcji PCR	63
Rycina 4.1 Kinetyka wzrostu mysich raków gruczołu krokowego wraz z potencjałem przerzutowym oraz wpływem na przyrost masy ciała zwierząt	71
Rycina 4.2 Potencjał przerzutowy komórek mysich linii gruczołu krokowego po dożylnym podaniu komórek	72
Rycina 4.3 Analiza wybranych parametrów krwi u myszy zaszczipionych ortotopowo komórkami mysiego raka gruczołu krokowego TRAMP-C1 lub TRAMP-C2;.....	74
Rycina 4.4 Analiza wybranych parametrów krwi u myszy po dożylnym podaniu komórek mysiego raka gruczołu krokowego TRAMP-C1 lub TRAMP-C2	75
Rycina 4.5 Analiza przepływu krwi w guzie w stosunku do otaczającej tkanki wykonana w 65 dniu eksperymentu)	75
Rycina 4.6 Odsetek subpopulacji limfocytów we krwi myszy poddanych operacji pozorowanej (SHAM) oraz obarczonych nowotworem TRAMP-C1 i TRAMP-C2	76
Rycina 4.7 Analiza populacji Tregs we krwi obwodowej	77
Rycina 4.8 Odsetek subpopulacji limfocytów w śledzionie myszy poddanych operacji pozorowanej (SHAM) oraz obarczonych nowotworem TRAMP-C1 i TRAMP-C2	78
Rycina 4.9 Analiza populacji Tregs w śledzionie. A. Odsetek Tregs w śledzionie myszy poddanych operacji pozorowanej (SHAM) oraz obarczonych nowotworem TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2. Analizy dokonano za pomocą cytometrii przepływowej, przy użyciu specyficznych dla populacji Tregs markerów (CD4, Cd25, FOXP3). B. Przykładowe dot-ploty analizy cytometrycznej populacji Treg oraz Treg ST2 ⁺ dla badanych grup. ...	79
Rycina 4.10 Analiza subpopulacji monocytów we krwi myszy poddanych operacji pozorowanej (SHAM) oraz obarczonych nowotworem TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2	80

SPIS RYCIN I TABEL

Rycina 4.11 Analiza subpopulacji monocytów w śledziona myszy poddanych operacji pozorowanej (SHAM) oraz obarczonych nowotworem TRAMP-C1 i TRAMP-C2	81
Rycina 4.12 Profil cytokinowy w osoczu myszy obarczonych mysim rakiem gruczołu krokowego TRAMP-C1 lub TRAMP-C2.....	84
Rycina 4.13 Profil cytokinowy w lizatach z guzów nowotworowych TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2.....	86
Rycina 4.14 Profil genowy tkanki nowotworowej myszy obarczonych nowotworem mysiego raka gruczołu krokowego TRAMP-C1 lub TRAMP-C2	88
Rycina 4.15 Profil aminokwasowy w osoczu myszy obarczonych mysim nowotworem gruczołu krokowego w 33 oraz 54 dniu eksperymentu	89
Rycina 4.16 Stężenie IL-33 w osoczu oraz lizatach z guzów nowotworowych myszy obarczonych mysim nowotworem gruczołu krokowego TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2	90
Rycina 4.17 Stężenie CCL2, CCL6 oraz CCL12 w lizatach z guzów nowotworowych myszy obarczonych mysim nowotworem gruczołu krokowego TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2.....	91
Rycina 4.18 Stężenie MMPs 3, 7 oraz 9 w lizatach z guzów nowotworowych myszy obarczonych mysim nowotworem gruczołu krokowego TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2	92
Rycina 4.19 Stężenie endoteliny-1 w osoczu oraz lizatach z guzów nowotworowych myszy obarczonych mysim nowotworem gruczołu krokowego TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2.....	93
Rycina 4.20 Wrażliwość linii TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 na cytostatyki.....	94
Rycina 4.21 Ekspresja E-kadheryny, N-kadheryny, B-keniny, VEGFR, PDGFR- α i PDGFR- β w komórkach linii TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2.. ..	95
Rycina 4.22 Wpływ IL-33 w stężeniach 0,1 ng/ml oraz 1 ng/ml na migrację komórek mysiego raka gruczołu krokowego TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2.....	96
Rycina 4.23 Wpływ IL-33 w stężeniach 0,1 ng/ml oraz 1 ng/ml na adhezję komórek mysiego raka gruczołu krokowego TRAMP-C1 oraz TRAMP-C2 do fibronektyny oraz kolagenu.....	97
Tabela 1.1 Ocena stadium zaawansowania nowotworu prostaty wg. Systemu TNM, klasyfikacji Gleasona oraz poziomu PSA.....	21
Tabela 1.2. Modele in vivo raka prostaty z wykorzystaniem myszy.....	26

SPIS RYCIN I TABEL

Tabela 3.1 Składy użytych w badaniach buforów	45
Tabela 3.2 Opis grup w eksperymencie in vivo.....	47
Tabela 3.3 Przeciwciała użyte do barwienia markerów zewnątrzkomórkowych na powierzchni monocytów oraz limfocytów	52
Tabela 3.4 Zestawienie przeciwciał do barwienia wewnątrzkomórkowego limfocytów Treg.....	53
Tabela 3.5 Zestawienie cytokin badanych za pomocą macierzy cytokinowych.	56
Tabela 3.6 Zestawienie białek badanych za pomocą testu ELISA na materiale pobranym od zwierząt.....	59
Tabela 3.7 Zestawienie genów badanych za pomocą macierzy PCR.....	60
Tabela 3.8 Zestawienie przeciwciał wykorzystanych w analizie western blot.....	66
Tabela 5.1 Profil cytokinowy w osoczu myszy obarczonych mysim rakiem gruczołu krokowego TRAMP-C1 lub TRAMP-C2.....	136
Tabela 5.2 Profil cytokinowy w lizatach z guzów myszy obarczonych mysim rakiem gruczołu krokowego TRAMP-C1 lub TRAMP-C2.....	139
Tabela 5.3 Profil genowy tkanki nowotworowej myszy obarczonych nowotworem mysiego raka gruczołu krokowego TRAMP-C1 lub TRAMP-C2.	142

SUPLEMENT

Tabela 0.1 Profil cytokin w osoczu myszy obarczonych mysim rakiem gruczołu krokowego TRAMP-C1 lub TRAMP-C2. Grupami kontrolnymi w eksperymencie były myszy poddane operacji SHAM. W tabeli przedstawiono współczynnik intensywności chemiluminescencji danej cytokiny w stosunku do chemiluminescencji pól referencyjnych znajdujących się na membranie macierzy, z uwzględnieniem wartości t_{la}.

	SHAM			TRAMP-C1			TRAMP-C2		
	D36	D59	D74	D36	D59	D74	D36	D59	D74
CHEMOKINY I INTERLEUKINY									
CX3CL1/Fractalkine	0,154	0,154	0,158	0,155	0,174	0,154	0,162	0,168	0,113
CXCL1/KC	0,050	0,067	0,096	0,078	0,112	0,102	0,084	0,122	0,060
CXCL2/MIP-2	0,061	0,045	0,062	0,049	0,050	0,066	0,058	0,051	0,039
CXCL9/MIG	0,054	0,075	0,074	0,076	0,053	0,080	0,051	0,059	0,059
CXCL10/IP-10	0,069	0,071	0,071	0,082	0,055	0,075	0,064	0,060	0,061
CXCL11/I-TAC	0,089	0,077	0,090	0,094	0,073	0,091	0,068	0,055	0,058
CXCL13/BLC/BCA-1	0,187	0,436	0,192	0,206	0,272	0,209	0,239	0,316	0,243
CXCL16	0,235	0,283	0,222	0,251	0,356	0,245	0,262	0,438	0,297
IL-1α/IL-1F1	0,142	0,130	0,136	0,170	0,156	0,137	0,119	0,117	0,116
IL-1B/IL-1F2	0,095	0,062	0,080	0,107	0,061	0,064	0,068	0,048	0,065
IL-1ra/IL-1F3	0,156	0,131	0,115	0,172	0,143	0,103	0,130	0,123	0,095
IL-2	0,049	0,025	0,046	0,055	0,023	0,056	0,025	0,011	0,032
IL-3	0,065	0,048	0,063	0,068	0,048	0,070	0,042	0,038	0,048
IL-4	0,203	0,126	0,163	0,148	0,188	0,151	0,195	0,179	0,134
IL-5	0,074	0,048	0,066	0,065	0,061	0,075	0,055	0,058	0,043
IL-6	0,045	0,046	0,054	0,043	0,067	0,062	0,051	0,077	0,038
IL-7	0,078	0,116	0,108	0,077	0,133	0,117	0,103	0,105	0,074
IL-10	0,087	0,089	0,064	0,081	0,140	0,076	0,067	0,058	0,062
IL-11	0,090	0,119	0,091	0,110	0,101	0,108	0,094	0,090	0,088
IL-12 p40	0,134	0,174	0,143	0,191	0,219	0,168	0,149	0,185	0,174
IL-13	0,074	0,063	0,073	0,095	0,070	0,088	0,059	0,045	0,067
IL-15	0,099	0,082	0,090	0,107	0,086	0,076	0,074	0,063	0,082
IL-17A	0,054	0,032	0,046	0,054	0,029	0,024	0,034	0,022	0,042
IL-22	0,072	0,048	0,062	0,072	0,052	0,073	0,044	0,035	0,052
IL-23	0,072	0,057	0,068	0,075	0,061	0,077	0,052	0,045	0,053
IL-27 p28	0,118	0,060	0,083	0,099	0,112	0,091	0,085	0,097	0,080
IL-28A/B	0,065	0,040	0,054	0,059	0,058	0,066	0,047	0,052	0,046
IL-33	0,061	0,058	0,064	0,065	0,091	0,070	0,051	0,072	0,041
LIF	0,112	0,132	0,098	0,135	0,104	0,102	0,087	0,107	0,089

SUPLEMENT

LIX	0,765	0,860	0,812	0,858	0,810	0,799	0,617	0,830	0,761
CZYNNIKI WZROSTOWE									
Amphiregulin	0,097	0,076	0,085	0,081	0,066	0,095	0,083	0,068	0,062
Angiopoietin-1	0,446	0,404	0,385	0,535	0,461	0,411	0,446	0,474	0,308
Angiopoietin-2	0,603	0,668	0,552	0,668	0,781	0,592	0,707	0,740	0,594
Angiopoietin-like 3	0,604	0,698	0,601	0,705	0,751	0,664	0,749	0,643	0,576
Endostatin	0,476	0,436	0,607	0,497	0,700	0,720	0,693	0,676	0,521
Endoglin/CD105	0,123	0,086	0,107	0,098	0,092	0,112	0,108	0,123	0,088
EGF	0,465	0,260	0,133	0,377	0,150	0,131	0,491	0,387	0,075
FGF acidic	0,075	0,079	0,073	0,076	0,047	0,081	0,068	0,053	0,065
FGF-21	0,111	0,114	0,108	0,116	0,106	0,111	0,116	0,122	0,105
PD-ECGF/Thymidine	0,047	0,056	0,052	0,050	0,071	0,105	0,046	0,063	0,050
PDGF-BB	0,278	0,336	0,210	0,364	0,341	0,212	0,223	0,255	0,169
VEGF	0,085	0,077	0,090	0,083	0,130	0,125	0,079	0,108	0,077
CZYNNIKI ZAPALNE I AKTYWATORY KOMÓREK									
BAFF/BLyS/TNFSF13B	0,480	0,531	0,444	0,472	0,606	0,442	0,543	0,622	0,457
C1q R1/CD93	0,457	0,664	0,529	0,548	0,717	0,593	0,693	0,682	0,505
CD14	0,111	0,078	0,107	0,102	0,097	0,104	0,110	0,108	0,072
CD160	0,094	0,120	0,103	0,106	0,107	0,136	0,116	0,102	0,088
CD40/TNFRSF5	0,090	0,065	0,081	0,075	0,088	0,084	0,095	0,094	0,064
C-Reactive Protein	0,458	0,592	0,557	0,466	0,658	0,544	0,617	0,644	0,527
DPPIV/CD26	0,298	0,418	0,414	0,336	0,465	0,390	0,407	0,409	0,335
GDF-15	0,092	0,102	0,099	0,104	0,092	0,097	0,080	0,083	0,080
IFN-gamma	0,083	0,057	0,077	0,072	0,073	0,084	0,068	0,069	0,046
Osteoprotegerin/TNF RSF11B	0,161	0,213	0,164	0,185	0,349	0,198	0,185	0,399	0,214
Thrombopoietin	0,202	0,219	0,127	0,222	0,225	0,167	0,182	0,246	0,149
TNF-a	0,061	0,062	0,054	0,061	0,052	0,074	0,059	0,061	0,058
CZYNNIKI CHEMOTAKTYCZNE									
CCL2/JE/MCP-1	0,085	0,076	0,090	0,085	0,081	0,089	0,086	0,074	0,049
CCL3/CCL4/MIP- 1α/B	0,076	0,055	0,077	0,068	0,049	0,079	0,059	0,045	0,038
CCL5/RANTES	0,125	0,108	0,151	0,113	0,177	0,153	0,174	0,169	0,122
CCL6/C10	1,049	0,973	0,858	0,922	0,873	0,923	0,933	1,023	0,975
CCL12/MCP-5	0,160	0,127	0,136	0,154	0,145	0,156	0,143	0,150	0,124
CCL11/Eotaxin	0,612	0,812	0,787	0,683	0,788	0,858	0,804	0,769	0,735
CCL17/TARC	0,178	0,170	0,147	0,184	0,187	0,163	0,168	0,183	0,137
CCL19/MIP-3β	0,131	0,109	0,106	0,118	0,111	0,114	0,115	0,103	0,077
CCL20/MIP-3a	0,117	0,105	0,108	0,098	0,116	0,116	0,127	0,094	0,065

SUPLEMENT

CCL21/6Ckine	0,469	0,578	0,594	0,517	0,924	0,596	0,749	0,937	0,760
CCL22/MDC	0,239	0,359	0,311	0,248	0,384	0,307	0,361	0,382	0,270
G-CSF	0,115	0,123	0,115	0,127	0,107	0,123	0,094	0,108	0,103
GM-CSF	0,078	0,062	0,076	0,080	0,064	0,084	0,052	0,053	0,055
M-CSF	0,294	0,307	0,239	0,331	0,307	0,306	0,236	0,323	0,272
CZĄSTECZKI MACIERZY ZEWNATRZKOMÓRKOWEJ I ADHEZYJNE									
E-Selectin/CD62E	0,456	0,654	0,603	0,614	0,718	0,586	0,464	0,660	0,674
P-Selectin/CD62P	0,473	0,695	0,642	0,601	0,733	0,627	0,531	0,755	0,712
ICAM-1/CD54	0,445	0,537	0,518	0,424	0,666	0,490	0,618	0,648	0,475
Periostin/OSF-2	0,322	0,447	0,398	0,438	0,438	0,398	0,318	0,428	0,387
MMP-2	0,521	0,550	0,510	0,560	0,589	0,557	0,432	0,578	0,475
MMP-3	0,560	0,813	0,620	0,575	0,859	0,765	0,554	0,899	0,775
MMP-9	0,265	0,297	0,146	0,189	0,275	0,173	0,158	0,455	0,181
VCAM-1/CD106	0,380	0,392	0,491	0,366	0,658	0,556	0,402	0,569	0,427
Serpin E1/PAI-1	0,094	0,130	0,108	0,117	0,142	0,137	0,109	0,247	0,183
Serpin F/PEDF	0,209	0,229	0,148	0,216	0,192	0,161	0,180	0,182	0,147
POZOSTAŁE CYTOKINY									
Adiponectin/Acrp30	0,535	0,565	0,452	0,511	0,434	0,493	0,506	0,475	0,539
Fetuin A/AHSG	0,385	0,397	0,487	0,383	0,566	0,459	0,550	0,525	0,410
IGFBP-1	0,444	0,400	0,450	0,547	0,822	0,511	0,733	0,802	0,520
IGFBP-2	0,498	0,787	0,750	0,574	0,872	0,766	0,808	0,812	0,671
Chemerin	0,564	0,619	0,578	0,559	0,667	0,616	0,608	0,644	0,690
Chitinase 3-like 1	0,457	0,468	0,401	0,450	0,503	0,452	0,496	0,524	0,439
Coagulation Factor III/Tissue Factor	0,136	0,112	0,122	0,137	0,121	0,120	0,115	0,114	0,091
Complement Factor D	0,583	0,643	0,609	0,547	0,789	0,597	0,679	0,691	0,622
Cystatin C	0,470	0,459	0,444	0,400	0,490	0,450	0,489	0,443	0,400
DKK-1	0,181	0,198	0,151	0,186	0,204	0,156	0,191	0,170	0,107
Flt-3 Ligand	0,203	0,250	0,197	0,217	0,202	0,193	0,187	0,182	0,183
Gas 6	0,282	0,386	0,334	0,346	0,425	0,359	0,337	0,409	0,379
HGF	0,118	0,122	0,100	0,117	0,138	0,113	0,116	0,120	0,084
LDL R	0,239	0,349	0,305	0,258	0,465	0,324	0,303	0,438	0,301
Leptin	0,159	0,144	0,157	0,129	0,098	0,122	0,078	0,069	0,085
Lipocalin-2/NGAL	0,270	0,295	0,233	0,295	0,293	0,245	0,219	0,318	0,269
IGFBP-3	0,452	0,708	0,557	0,625	0,620	0,733	0,608	0,579	0,640
IGFBP-5	0,679	0,852	0,797	0,798	0,856	0,829	0,798	0,804	0,819
IGFBP-6	0,706	0,895	0,883	0,909	0,997	0,928	0,787	0,900	0,843
RBP4	0,295	0,286	0,346	0,283	0,481	0,368	0,298	0,420	0,290
Myeloperoxidase	0,323	0,330	0,419	0,319	0,543	0,426	0,317	0,556	0,408

SUPLEMENT

Osteopontin	0,598	0,553	0,828	0,543	0,920	0,737	0,578	0,818	0,639
Pentraxin 2/SAP	0,222	0,318	0,206	0,313	0,369	0,267	0,263	0,374	0,332
Pentraxin 3/TSG-14	0,279	0,398	0,345	0,371	0,463	0,373	0,301	0,482	0,398
Pref-1/DLK-1/FA1	0,123	0,119	0,096	0,133	0,130	0,125	0,117	0,249	0,176
Proliferin	0,087	0,086	0,073	0,097	0,105	0,106	0,080	0,184	0,120
Proprotein Convertase 9/PCDK9	0,605	0,749	0,618	0,528	0,762	0,659	0,533	0,775	0,623
RAGE	0,142	0,172	0,111	0,128	0,136	0,130	0,142	0,138	0,107
Resistin	0,317	0,422	0,435	0,400	0,484	0,406	0,325	0,419	0,340
TIM-1/KIM-1/HAVCR	0,088	0,115	0,080	0,085	0,102	0,109	0,092	0,142	0,094
WISP-1/CCN4	0,167	0,224	0,159	0,260	0,644	0,325	0,279	0,728	0,452
Complement Component C5/C5a	0,237	0,221	0,180	0,203	0,238	0,190	0,202	0,222	0,162

Tabela 0.2 Profil cytokin w lizatach z guzów myszy obciążonych mysim rakiem gruczołu krokowego TRAMP-C1 lub TRAMP-C2. W tabeli przedstawiono współczynnik intensywności chemiluminescencji danej cytokiny w stosunku do chemiluminescencji pól referencyjnych znajdujących się na membranie macierzy, z uwzględnieniem wartości tła.

	TRAMP-C1		TRAMP-C2	
	D59	D74	D36	D59
CHEMOKINY I INTERLEUKINY				
CX3CL1/Fractalkine	0,031	0,036	0,037	0,026
CXCL1/KC	0,038	0,037	0,047	0,033
CXCL2/MIP-2	0,036	0,028	0,032	0,027
CXCL9/MIG	0,061	0,059	0,075	0,052
CXCL10/IP-10	0,040	0,039	0,049	0,037
CXCL11/I-TAC	0,034	0,034	0,034	0,029
CXCL13/BLC/BCA-1	0,031	0,035	0,032	0,027
CXCL16	0,047	0,041	0,051	0,054
IL-1β/IL-1F1	0,048	0,041	0,039	0,034
IL-1B/IL-1F2	0,027	0,028	0,029	0,025
IL-1ra/IL-1F3	0,071	0,072	0,066	0,099
IL-2	0,015	0,015	0,017	0,012
IL-3	0,022	0,022	0,022	0,018
IL-4	0,053	0,048	0,048	0,047
IL-5	0,040	0,036	0,037	0,036
IL-6	0,018	0,017	0,017	0,012
IL-7	0,037	0,042	0,037	0,030
IL-10	0,030	0,028	0,035	0,031

SUPPLEMENT

IL-11	0,038	0,038	0,045	0,039
IL-12 p40	0,031	0,037	0,033	0,031
IL-13	0,026	0,031	0,030	0,025
IL-15	0,029	0,032	0,034	0,029
IL-17A	0,015	0,013	0,015	0,014
IL-22	0,028	0,028	0,031	0,027
IL-23	0,031	0,032	0,035	0,029
IL-27 p28	0,041	0,039	0,037	0,038
IL-28A/B	0,032	0,027	0,030	0,026
IL-33	0,188	0,095	0,082	0,050
LIF	0,043	0,045	0,052	0,047
LIX	0,061	0,056	0,073	0,072
CZYNNIKI WZROSTOWE				
Amphiregulin	0,038	0,032	0,031	0,022
Angiopoietin-1	0,040	0,031	0,030	0,025
Angiopoietin-2	0,064	0,053	0,056	0,073
Angiopoietin-like 3	0,048	0,048	0,047	0,043
Endostatin	0,159	0,248	0,155	0,185
Endoglin/CD105	0,054	0,049	0,052	0,057
EGF	0,044	0,107	0,048	0,053
FGF acidic	0,084	0,111	0,101	0,089
FGF-21	0,039	0,034	0,042	0,035
PD-ECGF/Thymidine	0,028	0,034	0,031	0,030
PDGF-BB	0,039	0,042	0,054	0,043
VEGF	0,036	0,045	0,046	0,044
CZYNNIKI ZAPALNE I AKTYWATORY KOMÓREK				
BAFF/BLyS/TNFSF13B	0,035	0,028	0,036	0,026
C1q R1/CD93	0,079	0,081	0,106	0,113
CD14	0,049	0,046	0,047	0,037
CD160	0,041	0,036	0,042	0,029
CD40/TNFRSF5	0,236	0,184	0,180	0,193
C-Reactive Protein	0,081	0,071	0,084	0,107
DPPIV/CD26	0,062	0,094	0,070	0,058
GDF-15	0,034	0,037	0,037	0,031
IFN-?	0,044	0,032	0,035	0,030
Osteoprotegerin/TNFRSF11B	0,041	0,047	0,058	0,062
Thrombopoietin	0,019	0,028	0,029	0,026
TNF-α	0,026	0,029	0,031	0,030
CZYNNIKI CHEMOTAKTYCZNE				

SUPPLEMENT

CCL2/JE/MCP-1	0,037	0,043	0,043	0,025
CCL3/CCL4/MIP-1?/B	0,039	0,040	0,040	0,026
CCL5/RANTES	0,064	0,081	0,067	0,068
CCL6/C10	0,175	0,175	0,229	0,382
CCL12/MCP-5	0,146	0,137	0,121	0,213
CCL11/Eotaxin	0,050	0,048	0,042	0,038
CCL17/TARC	0,054	0,050	0,046	0,051
CCL19/MIP-3B	0,042	0,042	0,038	0,036
CCL20/MIP-3?	0,026	0,020	0,027	0,017
CCL21/6Ckine	0,683	0,734	0,682	0,691
CCL22/MDC	0,052	0,051	0,047	0,040
G-CSF	0,033	0,034	0,033	0,031
GM-CSF	0,028	0,027	0,026	0,023
M-CSF	0,028	0,034	0,035	0,034
CZĄSTECZKI MACIERZY ZEWNATRZKOMÓRKOWEJ I ADHEZYJNE				
E-Selectin/CD62E	0,024	0,019	0,025	0,025
P-Selectin/CD62P	0,033	0,041	0,044	0,043
ICAM-1/CD54	0,142	0,122	0,122	0,103
Periostin/OSF-2	0,059	0,097	0,098	0,119
MMP-2	0,086	0,093	0,101	0,100
MMP-3	0,148	0,264	0,351	0,494
MMP-9	0,050	0,053	0,076	0,095
VCAM-1/CD106	0,128	0,125	0,136	0,155
Serpin E1/PAI-1	0,053	0,080	0,088	0,152
Serpin F/PEDF	0,036	0,053	0,042	0,041
POZOSTALE CYTOKINY				
Adiponectin/Acrp30	0,194	0,221	0,151	0,165
Fetuin A/AHSG	0,109	0,132	0,115	0,108
IGFBP-1	0,031	0,034	0,032	0,024
IGFBP-2	0,055	0,080	0,057	0,068
Chemerin	0,051	0,042	0,040	0,042
Chitinase 3-like 1	0,072	0,048	0,052	0,079
Coagulation Factor III/Tissue Factor	0,071	0,068	0,073	0,096
Complement Factor D	0,060	0,045	0,058	0,050
Cystatin C	0,119	0,147	0,134	0,140
DKK-1	0,034	0,037	0,035	0,029
Flt-3 Ligand	0,034	0,035	0,035	0,031
Gas 6	0,044	0,049	0,047	0,041
HGF	0,077	0,081	0,087	0,087

SUPLEMENT

LDL R	0,081	0,076	0,085	0,068
Leptin	0,027	0,028	0,033	0,030
Lipocalin-2/NGAL	0,046	0,056	0,054	0,069
IGFBP-3	0,106	0,085	0,139	0,148
IGFBP-5	0,055	0,046	0,056	0,050
IGFBP-6	0,116	0,156	0,189	0,206
RBP4	0,100	0,111	0,105	0,109
Myeloperoxidase	0,164	0,155	0,185	0,204
Osteopontin	0,210	0,306	0,279	0,356
Pentraxin 2/SAP	0,029	0,032	0,042	0,036
Pentraxin 3/TSG-14	0,063	0,073	0,074	0,068
Pref-1/DLK-1/FA1	0,028	0,040	0,042	0,043
Proliferin	0,027	0,039	0,043	0,039
Proprotein Convetsase 9/PCDK9	0,042	0,048	0,052	0,050
RAGE	0,039	0,037	0,045	0,038
Resistin	0,045	0,049	0,047	0,039
TIM-1/KIM-1/HAVCR	0,028	0,033	0,035	0,036
WISP-1/CCN4	0,134	0,135	0,153	0,189
Complement Component C5/C5a	0,030	0,036	0,036	0,037

Tabela 0.3 Profil genowy tkanki nowotworowej myszy obciążonych nowotworem mysiego raka gruczołu krokowego TRAMP-C1 lub TRAMP-C2. Wyniki przedstawiono w postaci wartości średnich ΔCt uzyskanych dla poszczególnych genów w badanych grupach. Genem kontrolnym w analizie był Hsp90ab1.

	TRAMP-C1			TRAMP-C2		
	D36	D59	D74	D36	D59	D74
CZYNNIKI WZROSTU						
<i>Cd44</i>	3,27	2,06	3,36	2,37	1,83	2
<i>Cd82</i>	3,42	4,6	3,57	3	4,46	4,42
<i>Csfl</i>	5,57	4,27	5,01	4,82	3,91	4,51
<i>Ephb2</i>	7,38	6,3	6,67	6,6	5,84	6,24
<i>Fgfr4</i>	9,95	11,19	10,35	8,45	11,78	12,76
<i>Flt4</i>	6,05	4,32	6,24	5,36	5,34	5,39
<i>Hgf</i>	5,96	4,98	6,5	4,84	4,3	4,63
<i>Igf1</i>	3,84	3,55	3,81	3,11	3,54	3,81
<i>Itga7</i>	12,91	10,54	10,91	11,58	11,21	11,08
<i>Itgb3</i>	6,25	5,29	6,11	5,9	5,43	5,27
<i>Kiss1r</i>	12,46	13,31	11,05	11,44	13,42	12,71
<i>Lpar6</i>	5,13	4,55	6,17	4,4	4,32	4,45
<i>Met</i>	6,62	5,6	6,8	5,79	4,42	4,46
<i>Nr4a3</i>	7,28	9,53	6,49	6,82	10,62	9,37
<i>Plaur</i>	5,59	3,59	5,57	4,88	3,82	3,71
<i>Rorb</i>	7,17	9,69	5,37	6,57	9,54	9,19
<i>Rpsa</i>	1,03	0,66	1,26	0,56	0,36	-0,17

SUPLEMENT

<i>Sstr2</i>	11,09	10,87	10,52	10,89	9,81	11,53
<i>Tgfb1</i>	3,8	2,42	4,13	3,16	2,85	2,81
<i>Tshr</i>	10,45	11,7	11,04	9,21	12,81	10,55
<i>Vegfa</i>	4,06	3,78	3,66	3,67	3,45	3,34
CYTOKINY						
<i>Ccl7</i>	4,43	1,91	4,96	3,43	2,45	1,86
<i>Cxcl12</i>	2,51	1,08	2,78	1,89	1,14	1,07
<i>Cxcr2</i>	11,59	10,14	9,95	10,62	10,48	9,97
<i>Cxcr4</i>	7,28	5,46	7,48	6,2	5,22	5
<i>Il18</i>	6,93	5,24	7,56	6,1	5,49	5,68
<i>Il1b</i>	7,12	6,42	7,44	6,63	6,75	5,81
<i>Tnfsf10</i>	8,58	8,35	8,4	7,04	9,25	7,14
ENZYMY I INHIBITORY						
<i>Cdkn2a</i>	5,9	2,65	6,07	4,76	1,7	1,91
<i>Chd4</i>	2,87	2,68	3,56	2,67	2,09	2,64
<i>Ctsk</i>	5,14	3,33	5,68	3,88	2,11	3,65
<i>Ctsl</i>	1,87	0,68	1,64	1,15	0,29	0,31
<i>Elane</i>	12,48	13,22	11,76	11,68	12,59	13,78
<i>Hpse</i>	7,93	6,73	7,9	6,98	7,54	6,32
<i>Hras</i>	4,48	4,28	4,61	4,1	4,29	4,39
<i>Htatip2</i>	5,1	6,37	4,43	4,79	7	5,85
<i>Kras</i>	3,15	2,21	3,6	2,72	1,9	2,35
<i>Mdm2</i>	4,46	4,03	4,8	4,39	3,8	4,13
<i>Mmp10</i>	9,26	7,35	8,04	9,26	4,75	4,75
<i>Mmp11</i>	7,07	5,94	7,24	6,38	5,3	5,88
<i>Mmp13</i>	5,21	1,89	6,82	5,64	2,15	3,41
<i>Mmp2</i>	3,61	2,56	3,91	2,73	2,81	3,03
<i>Mmp3</i>	4,06	2,23	3,79	3,78	1,42	0,47
<i>Mmp7</i>	3,63	11,03	4,17	5,7	8,98	8,79
<i>Mmp9</i>	6,15	6,18	4,88	5,95	3,94	4,88
<i>Nme1</i>	1,93	0,78	1,59	1,47	0,73	1,06
<i>Nme2</i>	1,01	-0,06	0,96	0,64	0	0,16
<i>Nme4</i>	8,62	6,89	8,71	8,08	6,16	6,76
<i>Pten</i>	3,56	2,93	3,95	3,05	2,69	2,54
<i>Src</i>	5,86	6,48	5,42	5,51	5,95	5,62
<i>Syk</i>	10,62	9,76	9,21	9,08	10,01	8,8
<i>Timp2</i>	2,73	1,27	2,48	2,03	1,21	1,39
<i>Timp3</i>	2,37	0,88	2,47	2,16	1,66	1,62
<i>Timp4</i>	10,81	10,51	10,63	5,57	12,34	10,94
CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE						
<i>Etv4</i>	6,66	5,61	5,8	6,08	5,26	5,42
<i>Myc</i>	5,44	4,72	5,58	5,43	4,32	4,16
<i>Mycl</i>	6,15	10,2	7,6	7,02	11,14	8,56
<i>Smad2</i>	4,26	3,7	4,32	3,68	3,68	3,82
<i>Smad4</i>	3,47	3,04	3,75	2,92	2,82	2,84
<i>Tcf20</i>	3,73	3,63	3,59	3,44	3,27	3,41
<i>Trp53</i>	6,68	6,32	6,42	6,21	6,43	6,55

SUPLEMENT

ADHEZJA KOMOREK						
<i>Cdh1</i>	4,21	9,02	3,75	4,83	9,32	6,89
<i>Cdh11</i>	5,6	2,61	5,77	3,81	1,3	2,79
<i>Cdh6</i>	12,28	13,85	11,33	12,06	14,13	13,25
<i>Cdh8</i>	12,73	13,85	11,79	11,95	14,36	14,5
<i>Ctnna1</i>	3,05	2,43	3,36	2,56	1,89	2,42
<i>Col4a2</i>	5,63	4,3	5,77	4,48	4	3,98
<i>Fat1</i>	3,67	2,91	3,44	3,4	3,03	3,73
<i>Fn1</i>	2,25	0,21	2,14	1,75	-0,6	-0,2
<i>Mcam</i>	5,47	4,69	5,08	4,58	4,56	4,29
<i>Nf2</i>	4,62	4,47	4,65	4,27	4,26	4,31
<i>Pnn</i>	3,19	2,77	3,62	2,86	2,59	3,01
POZOSTALE GENY						
<i>Apc</i>	6,02	5,8	5,54	5,56	4,94	5,69
<i>Brms1</i>	5,82	5,26	6,38	5,58	4,67	5,2
<i>Ctbp1</i>	3,69	3,46	3,35	3,26	3,33	3,68
<i>Denr</i>	3,74	3,04	4,19	3,31	2,26	2,69
<i>Ewsr1</i>	2,3	2,34	2,01	1,99	2,09	2,39
<i>Fxyd5</i>	3,62	2,26	3,8	2,65	2,41	2,18
<i>Gpnb</i>	5,57	6,89	5,7	5,28	7,2	5,96
<i>Kiss1</i>	7,88	13,81	8,11	9,96	13,51	14,04
<i>Mta1</i>	5,46	5	5,72	4,97	4,29	4,12
<i>Mtss1</i>	7,71	7	7,92	7,31	6,91	6,15
<i>Rb1</i>	6,26	5,47	6,77	5,64	5,74	5,61
<i>Set</i>	7,95	6,55	7,83	7,2	5,86	5,62