

Patrycja Sosińska

**Wpływ procesu starzenia się ludzkiego
mezotelium otrzewnowego na wykładniki
progresji raka jajnika w modelu komórkowym
i zwierzęcym**

Rozprawa doktorska

z Katedry i Zakładu Patofizjologii

Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Kierownik: prof. dr hab. med. Andrzej Bręborowicz

Promotor: dr hab. n. med. Krzysztof Książek, prof. UM

Poznań 2014 r.

Szczególne podziękowania składam

*Panu **dr hab. Krzysztofowi Książkowi, prof. UM***

za wprowadzenie w niezwykle ciekawą tematykę badań

oraz za życzliwość i cenne uwagi merytoryczne

w trakcie realizacji niniejszej pracy doktorskiej.

Składam również podziękowania:

*Panu **prof. dr hab. Andrzejowi Bręborowiczowi**, Kierownikowi Katedry i Zakładu
Patofizjologii Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
za umożliwienie mi wykonania pracy doktorskiej w kierowanej przez Niego jednostce.*

Ponadto, za cenne konsultacje i pomoc w przeprowadzeniu części badań, dziękuję:

***dr Justynie Mikule-Pietrasik** z Katedry i Zakładu Patofizjologii Uniwersytetu*

Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

a także

***dr hab. Katarzynie Piwockiej, prof. PAN** z Pracowni Cytometrii Instytutu Biologii*

Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN w Warszawie,

dr hab. Markowi Muriasowi, prof. UM, dr Hannie Piotrowskiej, dr Małgorzacie

***Kucińskiej i Panu Bronisławowi Holewińskiemu** z Katedry i Zakładu Toksykologii*

Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

oraz

***lek. med. Konstantinowi Maksinowi i dr hab. Aldonie Woźniak, prof. UM** z*

Pracowni Diagnostyki Biopsyjnej Katedry Patomorfologii Klinicznej Uniwersytetu

Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu.

Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki, przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2011/03/B/NZ3/01214.

Autorka jest laureatką programu „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki.



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



SAMORZĄD WOJEWÓDZTWA
WIELKOPOLSKIEGO
WOJEWÓDZKI URZĄD PRACY
W POZNANIU

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



SPIS TREŚCI

| | |
|---|----|
| WYKAZ SKRÓTÓW..... | 9 |
| STRESZCZENIE..... | 12 |
| SUMMARY..... | 15 |
| 1. WSTĘP..... | 18 |
| 1.1. Wprowadzenie..... | 18 |
| 1.2. Komórkowy model starzenia..... | 19 |
| 1.3. Mechanizmy starzenia się komórek somatycznych..... | 20 |
| 1.3.1. Starzenie replikacyjne zależne od zmian długości i budowy telomerów..... | 20 |
| 1.3.2. Stres oksydacyjny a starzenie zależne od zmian długości telomerów..... | 22 |
| 1.3.3. Efektory starzenia zależnego od zmian długości telomerów..... | 23 |
| 1.3.4. Starzenie replikacyjne niezależne od zmian długości telomerów..... | 24 |
| 1.3.5. Rola białka p16 ^{Ink4A} w starzeniu telomeroniezależnym..... | 25 |
| 1.3.6. Starzenie przedwczesne indukowane stresem..... | 26 |
| 1.4. Fenotyp komórek starych..... | 27 |
| 1.4.1. Fenotyp sekrecyjny związany ze starzeniem..... | 28 |
| 1.5. Znaczenie starzenia się komórek dla starzenia się organizmu..... | 31 |
| 1.6. Starzenie a rozwój choroby nowotworowej..... | 32 |
| 1.7. Rak jajnika..... | 34 |
| 1.7.1. Klasyfikacja histologiczna nowotworów jajnika..... | 34 |
| 1.7.2. Obraz kliniczny choroby..... | 35 |
| 1.7.3. Etiopatogeneza raka jajnika..... | 36 |
| 1.7.4. Czynniki determinujące występowanie raka jajnika..... | 39 |
| 1.7.4.1. Wiek pacjentki..... | 39 |
| 1.7.4.2. Czynniki związane z rozrodczością..... | 40 |
| 1.7.4.3. Tło genetyczne..... | 41 |
| 1.7.4.4. Czynniki związane z dietą..... | 41 |
| 1.7.5. Przerzuty raka jajnika..... | 42 |
| 1.7.6. Leczenie raka jajnika..... | 44 |
| 1.8. Ludzkie komórki mezotelium otrzewnowego..... | 45 |
| 1.8.1. Budowa i funkcje biologiczne komórek mezotelialnych..... | 45 |
| 1.8.2. Starzenie się komórek mezotelium otrzewnowego..... | 46 |

| | |
|---|----|
| 2. CEL PRACY | 48 |
| 3. METODYKA BADAŃ | 49 |
| 3.1. Materiały | 49 |
| 3.2. Hodowle komórkowe..... | 49 |
| 3.2.1. Ludzkie komórki mezotelium otrzewnowego..... | 49 |
| 3.2.2. Komórki raka jajnika..... | 51 |
| 3.3. Wywoływanie replikacyjnego starzenia się LKMO | 53 |
| 3.4. Zbiórka medium kondycjonowanego | 53 |
| 3.5. Ocena proliferacji komórek nowotworowych | 54 |
| 3.5.1. Ocena syntezy DNA w komórkach metodą radioizotopową | 54 |
| 3.5.2. Ocena dystrybucji w cyklu komórkowym metodą cytometrii przepływowej | 55 |
| 3.5.3. Ocena fluorescencji GFP..... | 55 |
| 3.6. Ocena migracji komórek nowotworowych..... | 56 |
| 3.7. Ocena inwazyjności komórek nowotworowych | 56 |
| 3.8. Ocena ekspresji genów | 57 |
| 3.8.1. Badania globalnej ekspresji genów metodą mikromacierzy | 57 |
| 3.8.2. Badania ekspresji genów ilościową metodą PCR | 58 |
| 3.9. Ocena właściwości wydzielniczych komórek nowotworowych | 60 |
| 3.10. Badania immunoenzymatyczne | 60 |
| 3.10.1. Oznaczanie stężenia fibronektyny..... | 62 |
| 3.11. Badania interwencyjne..... | 62 |
| 3.12. Ocena ekspresji antygenu proliferacyjnego PCNA | 63 |
| 3.13. Ocena ekspresji SA-β-Gal | 64 |
| 3.14. Ocena obecności ognisk histonu γ-H2A.X..... | 64 |
| 3.15. Doświadczenia na modelu zwierzęcym <i>in vivo</i> | 65 |
| 3.15.1. Transfekcja komórek nowotworowych genem dla lucyferazy | 65 |
| 3.15.2. Przygotowywanie mysich ksenograftów..... | 66 |
| 3.15.3. Monitoring rozwoju guzów w otrzewnej metodą bioluminescencyjną | 67 |
| 3.15.4. Eutanazja zwierząt i usuwanie zmian nowotworowych z jamy otrzewnej .. | 67 |
| 3.15.5. Identyfikacja histopatologiczna usuniętych guzów nowotworowych..... | 67 |
| 3.15.5.1. Utrwalanie preparatów i zatapianie w kostkach parafinowych | 67 |
| 3.15.5.2. Barwienie preparatów hematoksyliną i eozyną | 68 |

| | |
|---|-----|
| 3.16. Analiza statystyczna | 68 |
| 4. WYNIKI | 69 |
| 4.1. Wpływ starzenia się LKMO na proliferację komórek raka jajnika <i>in vitro</i> – ocena działania czynników rozpuszczonych w medium | 69 |
| 4.2. Wpływ medium kondycjonowanego z hodowli komórek mezotelialnych na dystrybucję komórek raka jajnika w cyklu mitotycznym | 71 |
| 4.3. Wpływ starzenia się LKMO na migrację komórek raka jajnika <i>in vitro</i> | 71 |
| 4.4. Wpływ starzenia się LKMO na proliferację komórek raka jajnika <i>in vitro</i> – ocena bezpośrednich oddziaływań komórka-komórka..... | 75 |
| 4.5. Wpływ starzenia się LKMO na inwazyjność komórek raka jajnika <i>in vitro</i> | 77 |
| 4.6. Wpływ starzenia się LKMO na ekspresję genów związanych z postępowaniem procesu nowotworowego w komórkach raka jajnika – analiza metodą mikromacierzy..... | 78 |
| 4.7. Wpływ starzenia się LKMO na ekspresję genów związanych z postępowaniem procesu nowotworowego w komórkach raka jajnika – analiza ilościową metodą PCR..... | 82 |
| 4.8. Wpływ replikacyjnego starzenia się LKMO na właściwości wydzielnicze komórek raka jajnika | 84 |
| 4.9. Wpływ replikacyjnego starzenia na zmiany ekspresji genów w LKMO – analiza metodą mikromacierzy | 85 |
| 4.10. Wpływ replikacyjnego starzenia na zmiany ekspresji genów w LKMO – analiza ilościową metodą PCR | 86 |
| 4.11. Wpływ replikacyjnego starzenia na właściwości wydzielnicze LKMO | 88 |
| 4.12. Wpływ egzogennych form czynników wydzielanych w zwiększonych stężeniach przez stare LKMO na proliferację i migrację komórek raka jajnika ... | 89 |
| 4.12.1. Działanie egzogennej, rekombinowanej formy CCL2/MCP-1 | 89 |
| 4.12.2. Działanie egzogennej, rekombinowanej formy CXCL1/GRO-1 | 91 |
| 4.12.3. Działanie egzogennej, rekombinowanej formy CXCL8/IL-8..... | 93 |
| 4.12.4. Działanie egzogennej, rekombinowanej formy IL-6..... | 95 |
| 4.12.5. Działanie egzogennej, rekombinowanej formy MMP-3 | 97 |
| 4.12.6. Działanie egzogennej, rekombinowanej formy PAI-1 | 97 |
| 4.12.7. Działanie egzogennej, rekombinowanej formy TGF- β 1 | 100 |
| 4.12.8. Działanie egzogennej, rekombinowanej formy TSP-1 | 102 |
| 4.12.9. Działanie egzogennej, rekombinowanej formy sICAM-1 | 102 |
| 4.12.10. Działanie egzogennej, rekombinowanej formy u-PA | 105 |

| | |
|--|-----|
| 4.12.11. Działanie egzogennej, rekombinowanej formy VEGF | 107 |
| 4.12.12. Działanie egzogennej, rekombinowanej formy fibronektyny | 107 |
| 4.13. Identyfikacja rozpuszczalnych mediatorów pobudzającego proliferację i migrację wpływu starych LKMO za pomocą badań interwencyjnych | 109 |
| 4.13.1. Identyfikacja mediatorów nasilonej proliferacji | 111 |
| 4.13.2. Identyfikacja mediatorów nasilonej migracji..... | 115 |
| 4.14. Wpływ czynników, wydzielanych przez stare LKMO na wykładniki proliferacji i starzenia się komórek prawidłowych | 115 |
| 4.15. Wpływ starzenia się LKMO na wewnątrztrzewnowy rozwój raka jajnika w modelu zwierzęcym..... | 120 |
| 4.15.1. Bioluminescencyjna ocena rozwoju zmian nowotworowych w otrzewnej po wszczepieniu komórek A2780 z młodymi lub starymi LKMO..... | 121 |
| 4.15.2. Histopatologiczna ocena zmian nowotworowych, wytworzonych w otrzewnej po wszczepieniu komórek A2780 z młodymi lub starymi LKMO..... | 124 |
| 4.15.3. Bioluminescencyjna ocena rozwoju zmian nowotworowych w otrzewnej po wszczepieniu komórek OVCAR-3 z młodymi lub starymi LKMO | 128 |
| 4.15.4. Histopatologiczna ocena zmian nowotworowych, wytworzonych w otrzewnej po wszczepieniu komórek OVCAR-3 z młodymi lub starymi LKMO | 131 |
| 4.15.5. Bioluminescencyjna ocena rozwoju zmian nowotworowych w otrzewnej po wszczepieniu komórek SKOV-3 z młodymi lub starymi LKMO..... | 134 |
| 4.15.6. Histopatologiczna ocena zmian nowotworowych, wytworzonych w otrzewnej po wszczepieniu komórek SKOV-3 z młodymi lub starymi LKMO | 137 |
| 5. DYSKUSJA..... | 140 |
| 6. WNIOSKI..... | 151 |
| 7. PIŚMIENNICTWO | 153 |

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

| | |
|--------------------|---|
| 8-OH-dG | (ang. <i>8-hydroxy-2'-deoxyguanosine</i>) – 8-hydroksy-2' deoksyguanozyna |
| BMI | (ang. <i>body mass index</i>) – wskaźnik masy ciała |
| BSA | (ang. <i>bovine serum albumin</i>) – albumina surowicy bydłowej |
| CCL2/MCP-1 | (ang. <i>chemokine C-C motif ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1</i>) – ligand 2 chemokiny o motywie C-C/białko chemotaktyczne monocytów 1 |
| CDK | (ang. <i>cyclin-dependent kinase</i>) – kinaza zależna od cyklin |
| CPD | (ang. <i>cumulative population doublings</i>) – skumulowana liczba podwojeń populacji |
| CXCL1/GRO-1 | (ang. <i>chemokine C-X-C motif ligand 1/growth related oncogene 1</i>) – ligand 1 chemokiny o motywie C-C/onkogen związany ze wzrostem 1 |
| CXCL8/IL-8 | (ang. <i>chemokine C-X-C motif ligand 8/interleukin 8</i>) – ligand 8 chemokiny o motywie C-C/ interleukina 8 |
| CTGF | (ang. <i>connective tissue growth factor</i>) – czynnik wzrostu tkanki łącznej |
| DAPI | (ang. <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>) – 4',6'-diamidyno-2-fenylindol |
| DDR | (ang. <i>DNA damage response</i>) – odpowiedź inicjowana uszkodzeniami DNA |
| ECM | (ang. <i>extracellular matrix</i>) – macierz pozakomórkowa |
| EDTA | (ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>) – kwas etylenodiaminotetraoctowy |
| EGF | (ang. <i>epidermal growth factor</i>) – epidermalny czynnik wzrostu |
| ELISA | (ang. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>) – płytkowy test immunoenzymatyczny fazy stałej |
| EMT | (ang. <i>epithelial-mesenchymal transition</i>) – przemiana epitelialno-mezenchymalna |
| FACS | (ang. <i>fluorescence activated cell sorting</i>) – sortowanie komórek aktywowane fluorescencyjnie |
| FBS | (ang. <i>fetal bovine serum</i>) – płodowa surowica bydłowa |
| FIGO | (ang. <i>International Federation of Gynecology and Obstetrics</i>) – Międzynarodowe Stowarzyszenie Ginekologii i Położnictwa |

| | |
|---------------|--|
| FISH | (ang. <i>fluorescence in situ hybridization</i>) – hybrydyzacja fluorescencyjna <i>in situ</i> |
| GFP | (ang. <i>green fluorescent protein</i>) – białko zielonej fluorescencji |
| HA | (ang. <i>hyaluronic acid</i>) – kwas hialuronowy |
| HBOC | (ang. <i>hereditary breast-ovarian cancer syndrome</i>) – zespół rodzinnego raka piersi i raka jajnika |
| HBSS | (ang. <i>Hank's balanced salt solution</i>) – buforowany roztwór soli Hanksa |
| HGF | (ang. <i>hepatocyte growth factor</i>) – czynnik wzrostu hepatocytów |
| HNPCC | (ang. <i>hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i>) – dziedziczny rak jelita grubego niezwiązany z polipowatością |
| HOC | (ang. <i>hereditary ovarian syndrome</i>) – zespół rodzinnego raka jajnika |
| HRP | (ang. <i>horseradish peroxidase</i>) – peroksydaza chrzanowa |
| ICAM-1 | (ang. <i>intercellular adhesion molecule 1</i>) – cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1 |
| IL | (ang. <i>interleukin</i>) – interleukina |
| LKMO | ludzkie komórki mezotelium otrzewnowego |
| LPA | (ang. <i>lysophosphatidic acid</i>) – kwas lizofosfatydowy |
| MAPK | (ang. <i>mitogen-activated protein kinase</i>) – kinaza białkowa aktywowana mitogenami |
| Mdm2 | (ang. <i>murine double minute 2</i>) – białko onkogenne |
| MK | medium kondycjonowane |
| MMP | (ang. <i>matrix metalloproteinase</i>) – metaloproteinaza macierzy |
| NF-κB | (ang. <i>nuclear factor kappa B</i>) – jądrowy czynnik transkrypcyjny κB |
| NRP-1 | (ang. <i>neuropilin 1</i>) – neuropilina 1 |
| PAI | (ang. <i>plasminogen activator inhibitor</i>) – inhibitor aktywatora plazminogenu |
| PBS | (ang. <i>phosphate buffered saline</i>) – sól fizjologiczna buforowana fosforanami |
| PCNA | (ang. <i>proliferating cell nuclear antigen</i>) – jądrowy antygen komórek proliferujących |
| PDGF | (ang. <i>platelet-derived growth factor</i>) – płytkopochodny czynnik wzrostu |

| | |
|----------------------------------|--|
| PI | (ang. <i>iodium propide</i>) – jodek propidyny |
| POT | (ang. <i>protection of telomeres factor</i>) – czynnik ochraniający telomery |
| pRb | (ang. <i>retinoblastoma protein</i>) – białko retinoblastoma |
| RFT | reaktywne formy tlenu |
| RFU | (ang. <i>relative fluorescence units</i>) – względne jednostki fluorescencji |
| RLU | (ang. <i>relative light units</i>) – względne jednostki świetlne |
| SA-β-Gal | (ang. <i>senescence-associated β-galactosidase</i>) – β -galaktozydaza związana ze starzeniem |
| SAHF | (ang. <i>senescence-associated heterochromatic foci</i>) – ogniska heterochromatyny związane ze starzeniem |
| SAPK | (ang. <i>stress-activated protein kinase</i>) – kinaza białkowa aktywowana stresem |
| SDF | (ang. <i>senescence-associated DNA damage foci</i>) – ogniska uszkodzeń DNA związane ze starzeniem |
| SFM | (ang. <i>serum free medium</i>) – medium bez surowicy |
| SIPS | (ang. <i>stress-induced premature senescence</i>) – starzenie przedwczesne indukowane stresem |
| TGF-β1 | (ang. <i>transforming growth factor β1</i>) – transformujący czynnik wzrostu β 1 |
| TP53 | (ang. <i>tumor protein 53</i>) – białko supresorowe nowotworu p53 |
| t-PA | (ang. <i>tissue plasminogen activator</i>) – tkankowy aktywator plazminogenu |
| TRF | (ang. <i>telomeric repeat binding factor</i>) – czynnik wiążący się do powtórzeń telomerowych |
| TSP-1 | (ang. <i>thrombospondin 1</i>) – trombospondyna 1 |
| u-PA | (ang. <i>urokinase plasminogen activator</i>) – urokinazowy aktywator plazminogenu |
| VCAM-1 | (ang. <i>vascular cell adhesion molecule 1</i>) – cząsteczka adhezyjna komórek naczyń 1 |
| VEGF | (ang. <i>vascular endothelial growth factor</i>) – czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego |
| γ-H2A.X | ufosforylowany wariant histonu H2A.X |

STRESZCZENIE

Choć częstość zachorowania na raka jajnika, jak również stopień wewnątrztrzewnowej agresywności tego nowotworu rosną znacząco wraz z wiekiem, przyczyna takiego stanu rzeczy jest nadal niejasna. Istnieją jednak przesłanki by sądzić, że pewne znaczenie dla tego zjawiska może mieć gromadzenie się w jamie otrzewnej starych komórek mezotelium otrzewnowego (LKMO), które, jak wykazały wcześniejsze badania, mogą pobudzać adhezję komórek raka jajnika w większym stopniu niż komórki młode. Aby odnieść się do kwestii wpływu starzenia się LKMO na wewnątrztrzewnową progresję raka jajnika w sposób kompleksowy, przeprowadzono badania, których celem było porównanie wpływu młodych i starych LKMO na proliferację, migrację i inwazyjność komórek raka jajnika *in vitro* oraz na rozwój guzów nowotworowych w jamie otrzewnej zwierząt doświadczalnych *in vivo*. Fenomenologiczną ocenę zjawisk modelowanych w warunkach hodowlanych uzupełniono o badania mechanistyczne, których celem była identyfikacja mediatorów działania starych LKMO.

W doświadczeniach wykorzystano pierwotne hodowle LKMO, wyizolowane z pobranych śródoperacyjnie fragmentów sieci większej, jak również trzy komercyjnie dostępne linie komórek raka jajnika: A2780, OVCAR-3 i SKOV-3. Proliferację komórek nowotworowych zbadano metodą radioizotopową, cytometryczną i fluorescencyjną, natomiast ich migrację i inwazyjność, za pomocą komercyjnie dostępnych zestawów do analizy tych zjawisk. Zmiany ekspresji genów w komórkach oceniono metodą mikromacierzy, potwierdzoną ilościową metodą PCR, natomiast zmiany właściwości wydzielniczych, metodą immunoenzymatyczną. Badania interwencyjne wykonano z użyciem egzogennych, rekombinowanych mediatorów progresji komórek nowotworowych oraz z wykorzystaniem specyficznych, skierowanych przeciwko nim przeciwciał neutralizujących. Badania *in vivo* przeprowadzono na szczepach immunoniekompetentnych myszy Scid, którym implantowano dootrzewnowo mieszaniny komórek nowotworowych z młodymi lub starymi LKMO. Monitoring guzów rozwijających się w jamie otrzewnej, w czasie 21 dni eksperymentu, prowadzono za pomocą systemu obrazowania IVIS Spectrum. Po eutanazji zwierząt, guzy usuwano i poddawano ocenie histopatologicznej.

Przeprowadzone badania wykazały, że medium kondycjonowane (MK) z hodowli starych LKMO pobudza proliferację i migrację wszystkich badanych linii komórek nowotworowych w stopniu większym niż MK, pochodzące z komórek młodych. Ponadto, doświadczenia z

wykorzystaniem hodowli mieszanych dowiodły, że stare LKMO powodują wzrost proliferacji i inwazyjności badanych komórek rakowych także w wyniku bezpośrednich oddziaływań typu komórka-komórka. Co ciekawe, gdy działaniu MK z hodowli starych LKMO poddano młode LKMO i młode fibroblasty otrzewnowe, w obu przypadkach stwierdzono zahamowanie ich proliferacji oraz nasilenie fenotypowych oznak starzenia. Badania skierowane na identyfikację zmian zachodzących w komórkach nowotworowych, poddawanych działaniu MK ze starych LKMO wykazały, że efektem takiej ekspozycji jest wzrost ekspresji genów, kodujących białka zaangażowane w progresję cyklu komórkowego, adhezję, chemotaksję, migrację, reakcję zapalną, angiogenezę oraz syntezę i przebudowę struktur macierzy pozakomórkowej (ECM). Co więcej, wiele z tych czynników, w tym chemokiny CXCL1/GRO-1 i CXCL8/IL-8 oraz mitogeny HGF oraz VEGF, jest następnie wydzielanych w zwiększonych stężeniach do środowiska przez komórki nowotworowe.

W dalszym toku badań stwierdzono, że pronowotworowy wpływ starych LKMO może być związany ze wzrostem ekspresji w tych komórkach wielu genów, kodujących czynniki mogące nasilać postęp choroby nowotworowej, w tym mediatory adhezji z grupy integryn, czynniki proangiogenne (np. CXCL8/IL-8, VEGF) i prozapalne (np. CCL2/MCP-1, ICAM-1, IL-6), jak również białka zaangażowane w syntezę i przebudowę struktur ECM (np. MMP-3, TGF- β 1, t-PA). Ponadto, stare LKMO wydzielają do środowiska zwiększone ilości mediatorów progresji komórek rakowych, w tym: CCL2/MCP-1, CXCL1/GRO-1, CXCL8/IL-8, fibronektyny, IL-6, MMP-3, PAI-1, TGF- β 1, TSP-1, ICAM-1, u-PA i VEGF. Badania z wykorzystaniem egzogennych form tych czynników dowiodły, że wiele z nich ma zdolność pobudzania proliferacji i migracji komórek raka jajnika, przy czym kompozycja mediatorów obu zjawisk jest uwarunkowana typem badanej linii komórek nowotworowych. W przypadku komórek A2780, proliferacja wzrosła pod wpływem: CXCL1/GRO-1, CXCL8/IL-8, fibronektyny, IL-6 i u-PA, natomiast migracja, pod wpływem: CXCL1/GRO-1 i TGF- β 1. Proliferację komórek OVCAR-3 pobudzały: CXCL1/GRO-1, CXCL8/IL-8, fibronektyna, IL-6, sICAM-1 i VEGF, natomiast migrację: CCL2/MCP-1, CXCL1/GRO-1, CXCL8/IL-8 i fibronektyna. W odniesieniu do komórek SKOV-3, wzrost proliferacji wywoływały: CCL2/MCP-1, CXCL1/GRO-1, CXCL8/IL-8, fibronektyna, PAI-1, TGF- β 1 i u-PA, natomiast wzrost migracji: CCL2/MCP-1, CXCL8/IL-8, IL-6, TGF- β 1 i u-PA. Aby ostatecznie zidentyfikować mediatory pobudzającego wpływu starych LKMO na progresję komórek raka jajnika, media generowane przez komórki stare wzbogacono w specyficzne przeciwciała neutralizujące, skierowane przeciwko w.w. czynnikom, a następnie oceniono

wpływ tej interwencji na efektywność proliferacji i migracji. Doświadczenia te pokazały, że nasilenie proliferacji komórek nowotworowych było związane z działaniem, odpowiednio, CXCL1/GRO-1, CXCL-8/IL-8, IL-6 i fibronektyny (dla komórek A2780); CXCL8/IL-8, IL-6 i fibronektyny (dla komórek OVCAR-3) i CXCL1/GRO-1, CXCL8/IL-8 i fibronektyny (dla komórek SKOV-3). W odniesieniu do procesu migracji, wpływ starych LKMO odbywał się poprzez CXCL1/GRO-1 i TGF- β 1 (dla komórek A2780); CXCL1/GRO-1, CXCL8/IL-8 i fibronektynę (dla komórek OVCAR-3) oraz CXCL8/IL-8 i IL-6 (dla komórek SKOV-3).

Przeprowadzone w ostatniej części badań doświadczenia *in vivo* wykazały, że dynamika rozwoju guzów (w przypadku komórek A2780, SKOV-3), jak również liczba rozwiniętych zmian nowotworowych (w przypadku komórek SKOV-3) pod wpływem starych LKMO były istotnie wyższe w porównaniu z działaniem komórek młodych. W odniesieniu do komórek OVCAR-3 zaobserwowano podobną tendencję, jednak mniejsza liczebność zwierząt w tej grupie doświadczalnej uniemożliwiła stwierdzenie różnic istotnych statystycznie.

Podsumowując przeprowadzone badania można stwierdzić, że spójne wyniki doświadczeń opartych na modelach *in vitro* i *in vivo* dostarczyły dowodów wskazujących, że proces starzenia się komórek mezotelium otrzewnowego nasila progresję komórek raka jajnika. To, z kolei, może świadczyć o przyczynowym udziale gromadzących się w jamie otrzewnej wraz z wiekiem starych komórek mezotelialnych we wzroście częstości powstawania wewnątrzotrzewnowych przerzutów nowotworu u osób starszych.

SUMMARY

Although the incidence of ovarian cancer, as well as the degree of the intraperitoneal aggressiveness of this malignancy rise remarkably with age, the reason of this situation remains unclear. On the other hand, there are circumstances to believe that this phenomenon may be to some extent related to the accumulation in the peritoneum of senescent human peritoneal mesothelial cells (HPMCs), which were recently recognized to stimulate the adhesion of ovarian cancer cells more efficiently than their young counterparts. In order to comprehensively address the issue of the impact of replicative senescence of HPMCs on the intraperitoneal progression of ovarian cancer, the experiments were performed, in which young and senescent HPMCs were compared in terms of their effect on proliferation, migration and invasion of ovarian cancer cells *in vitro*, and on the development of solid tumors in the peritoneum of laboratory animals *in vivo*. The phenomenological assessment of the processes modeled in the culture conditions was enriched in mechanistic studies aimed at identifying mediators of senescent HPMCs activity.

The experiments were performed using primary cultures of HPMCs established from omental tissues, obtained during abdominal surgery, as well as with three commercially available ovarian carcinoma cell lines: A2780, OVCAR-3, and SKOV-3. Cancer cell proliferation was investigated using the radioisotope, fluorescent, and flow cytometric methods, while their migration and invasion were studied with commercially available kits for the analysis of these phenomena. Changes in gene expression were assessed using the microarray analysis, confirmed with the quantitative PCR, whereas changes in cell secretory properties were examined with specific enzyme-linked immunoassays. Intervention studies were performed using exogenous, recombinant mediators of cancer cell progression as well as using specific, neutralizing antibodies directed against those agents. The *in vivo* studies were carried out on the strains of the immunocompromised Scid mice, which were intraperitoneally injected with a mixture of cancer cells with young or senescent HPMCs. The development of tumors in the peritoneal cavity was monitored during 21 days of the experiment using the imaging system IVIS Spectrum. Following the euthanasia of the animals, the tumors were removed and subjected to a histopathological evaluation.

The study showed that the conditioned medium (CM) from senescent HPMCs stimulates proliferation and migration of all cancer cell lines tested to a greater extent than CM derived from young cells. Furthermore, the co-culture experiments showed that the senescent

HPMCs promote an increase in proliferation and invasion of cancer cells as a result of direct cell-cell interactions. Interestingly, when CM from senescent HPMCs was applied to young HPMCs or to young peritoneal fibroblasts, it inhibited the proliferative capacity and accelerated the development of senescence phenotype in those cells. Studies focused on the identification of molecular changes in cancer cells subjected to CM from senescent HPMCs revealed that this exposure resulted in the up-regulated expression of genes, encoding proteins involved in cell cycle progression, adhesion, chemotaxis, migration, inflammation, angiogenesis, and synthesis and remodeling of the extracellular matrix (ECM) constituents. In addition, many of these factors, including chemokines CXCL8/IL-8 and CXCL1/GRO-1, mitogens HGF and VEGF, were then secreted at increased amounts to the environment by cancer cells.

Further experiments showed that the pro-oncogenic activity of senescent HPMCs may be associated with increased expression of numerous genes coding for factors that may potentiate cancer cell progression, including the mediators of adhesion, pro-angiogenic (e.g., CXCL8/IL-8, VEGF) and pro-inflammatory agents (e.g., CCL2/MCP-1, ICAM-1, IL-6), as well as the proteins involved in the synthesis and remodeling of the ECM (e.g. MMP-3, TGF- β 1, t-PA). Moreover, senescent HPMCs have been found to secrete increased amounts of variety of agents that facilitate cancer spread, such as: CCL2/MCP-1, CXCL1/GRO-1, CXCL8/IL-8, fibronectin, IL-6, MMP-3, PAI-1, TGF- β 1, TSP-1, ICAM-1, u-PA, and VEGF. The experiments employing the exogenous, recombinant forms of these factors have shown that many of them have the ability to stimulate the proliferation and migration of ovarian cancer cells, albeit the composition of mediators of these phenomena depends on a type of cancer cell line tested. In the case of A2780 cells, their proliferation was stimulated by: CXCL1/GRO-1, CXCL8/IL-8, fibronectin, IL-6, and u-PA, while the migration by: CXCL1/GRO-1 and TGF- β 1. The proliferation of OVCAR-3 cells was, in turn, stimulated by: CXCL1/GRO-1, CXCL8/IL-8, fibronectin, IL-6, ICAM-1, and VEGF, while the migration by: CCL2/MCP-1, CXCL1/GRO-1, CXCL8/IL-8, and fibronectin. With respect to SKOV-3 cells, the proliferation appeared to be induced by: CCL2/MCP-1, CXCL1/GRO-1, CXCL8/IL-8, fibronectin, PAI-1, TGF- β 1, and u-PA, while the migration by: CCL2/MCP-1, CXCL8/IL-8, IL-6, TGF- β 1, and u-PA. To finally identify the stimuli by which senescent HPMCs fueled ovarian cancer cell progression, the samples of CM generated by those cells were supplemented with the specific neutralizing antibodies directed against the above-mentioned factors, and then the effect of this intervention on the effectiveness of

proliferation and migration was evaluated. These experiments showed that the increase in cancer cell proliferation in response to CM from senescent HPMCs was related to the activity of, respectively, CXCL1/GRO-1, CXCL-8/IL-8, IL-6 and fibronectin (for A2780 cells); CXCL8/IL-8, IL-6 and fibronectin (for OVCAR-3 cells), and CXCL1/GRO-1, CXCL8/IL-8 and fibronectin (for SKOV-3 cells). With regard to the migration process, senescent HPMCs acted via CXCL1/GRO-1 and TGF- β 1 (for A2780 cells); CXCL1/GRO-1, CXCL8/IL-8 and fibronectin (for OVCAR-3 cells) and CXCL8/IL-8 and IL-6 (for SKOV-3 cells).

The *in vivo* experiments showed that the dynamics of the tumor growth (in the case of A2780 and SKOV-3 cells), as well as the number of developed tumors (for SKOV-3 cells) were higher when the cancer cells were co-injected into mice peritoneum with senescent HPMCs. With respect to the OVCAR-3 cells, a similar trend was observed, however a smaller number of animals in the experimental group precluded the statistical analysis of the obtained results.

Altogether, it can be concluded that the consistent results of the *in vitro* and *in vivo* experiments provided strong evidence that senescence of peritoneal mesothelium promotes the progression of ovarian cancer. This, in turn, may suggest that senescent mesothelial cells, which accumulate in the peritoneal cavity during ageing, may potentiate the intraperitoneal development of ovarian cancer metastasis in elderly individuals.

1. WSTĘP

1.1. Wprowadzenie

Współczesna literatura oferuje wiele definicji procesu starzenia, a dobór odpowiedniej jest zwykle podyktowany konkretnym aspektem życia jednostki, której ten proces dotyczy. Pod względem biologicznym, zjawisko to można określić jako zespół dynamicznych zmian, zależnych od upływu czasu oraz czynników środowiskowych, działających na poziomie strukturalnym i czynnościowym danego organizmu [1]. Tak wyrażona definicja podkreśla uniwersalizm oraz fizjologiczną rolę tego zjawiska. W aspekcie medycznym, starzenie oceniane jest raczej pejoratywnie, co wynika z towarzyszącego mu wzrostu częstości występowania szeregu chorób związanych z wiekiem (ang. *age-related diseases*), znacząco pogarszających jakość i limitujących długość życia osób starszych [2]. Z kolei podejście socjologiczne przedstawia proces starzenia jako stopniową utratę sprawności psychicznej i fizycznej, prowadzącą w konsekwencji do postępującego wycofania się z życia społecznego.

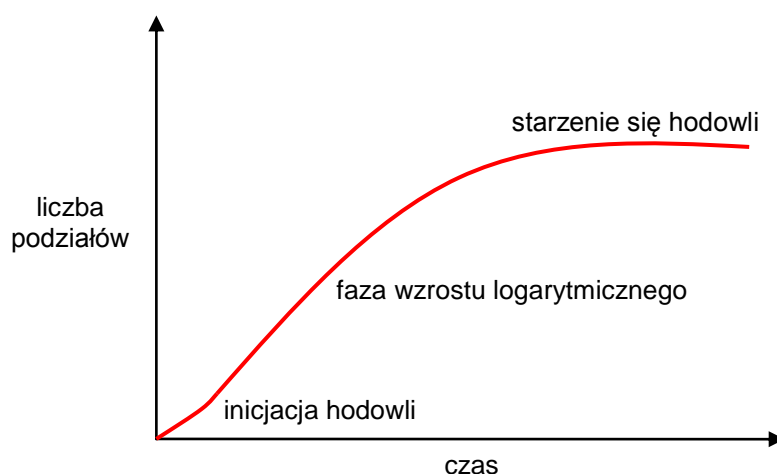
Pomimo mnogości określeń oraz sposobu przedstawienia zjawiska starzenia, przebiegający na przestrzeni ostatnich dekad, intensywny rozwój naukowo-technologiczny sprawił, że liczba osób w wieku podeszłym (powyżej 65 r. ż.) znacząco wzrosła. Trend ten zaowocował stopniowym przeobrażaniem się aglomeracji społecznych w „społeczeństwa starzejące się” [3]. Obecnie, dużym wyzwaniem jest konieczność dostosowania możliwości ekonomicznych, socjalnych i medycznych do potrzeb wzrastającego odsetka osób w wieku podeszłym. Rosnące nakłady finansowe, ponoszone na opiekę medyczną osób starszych oraz wysoki odsetek śmiertelności wśród tej grupy wiekowej przyczyniają się do poszukiwania nowych rozwiązań, umożliwiających zachowanie korelacji pomiędzy trwającym wzrostem średniej długości życia przy zachowaniu wysokiego poziomu jego jakości.

Najbardziej dotkliwą grupą chorób, których częstość występowania znacząco wzrasta u osób starszych są choroby nowotworowe. Jedną z tych chorób jest rak jajnika, którego związki ze starzeniem dotyczą zarówno wzrostu częstości występowania, jak również wzrostu agresywności choroby [4;5]. Pomimo jednak dużego zasobu wiedzy, którą dysponujemy w zakresie patomechanizmu rozwoju choroby nowotworowej oraz przyczyn i mechanizmów starzenia, podstawa współzależności między tymi dwoma zjawiskami jest nadal bardzo słabo poznana. Temu właśnie zagadnieniu, a w szczególności określeniu sprawczej roli starzenia komórkowego w wewnątrztrzewnowej inwazyjności raka jajnika poświęcona jest niniejsza rozprawa.

1.2. Komórkowy model starzenia

Starzenie należy do procesów złożonych i jest kumulatywną formą zjawisk biochemicznych i fizjologicznych, przebiegających na różnych poziomach organizacji ustroju, od pojedynczej komórki, do tkanek i narządów włącznie. W zgodnej opinii, proces starzenia, przebiegający na poziomie komórkowym, jest jednym z najlepszych modeli badań tego zjawiska, co wynika z możliwości dogłębnego wniknięcia w zdarzenia molekularne, zachodzące na poziomie makrocząsteczek, jak również poddawania komórek odpowiednim manipulacjom (np. wpływowi czynników środowiskowych, interwencjom genetycznym), pozwalającym na identyfikację w metabolizmie komórek tych zmian, które mogą stanowić, odpowiednio, bezpośrednią przyczynę lub skutek procesu starzenia.

Jednym z pionierów badań nad starzeniem się komórek *in vitro* był francuski chirurg, Alexis Carrel [6], którego prace wniosły do ówczesnej wiedzy o starzeniu nie tyle treści merytoryczne (patrz: słynny „błąd Carrela” [7]), co raczej powszechne zainteresowanie tym zjawiskiem. Właściwe podwaliny współczesnej biogerontologii stworzyli dopiero jednak w latach sześćdziesiątych XX wieku Leonard Hayflick i Paul Moorhead, którzy jako pierwsi dowiedli, że prawidłowe ludzkie komórki somatyczne posiadają ograniczone możliwości podziałowe *in vitro*, których kulminacją jest ich wejście w fazę replikacyjnego starzenia (ang. *replicative senescence*) (Rycina 1) [8;9].



Rycina 1. Przebieg typowej krzywej wzrostu prawidłowych komórek somatycznych, utrzymywanych w warunkach hodowli *in vitro* (na podstawie [10]). Na cześć odkrywcy zjawiska replikacyjnego starzenia, maksymalną liczbę podziałów, możliwą do osiągnięcia przez dany typ komórek określa się mianem „limitu Hayflicka”.

1.3. Mechanizmy starzenia się komórek somatycznych

1.3.1. Starzenie replikacyjne, zależne od zmian długości i budowy telomerów

Unikatową cechą komórek eukariotycznych jest obecność tandemowych, specyficznych gatunkowo powtórzeń na końcach chromosomów, zwanych telomerami. Struktury te nie zawierają sekwencji kodujących, a ich funkcja polega na stabilizacji i ochronie dystalnych odcinków chromosomów przed spontanicznym łączeniem się i degradacją wskutek działania nukleaz [11]. Rolę tę telomery pełnią dzięki zdolności do przyjmowania zdefiniowanej przestrzennie struktury dwuniciowej pętli t (ang. *t-loop*), stabilizowanej białkami POT (ang. *protection of telomeres*), TRF1/2 (ang. *telomeric repeat binding factor 1/2*) i TIN2 (ang. *TRF1-interacting protein 2*), tworzących tzw. kompleks szelteryń, którego zadaniem jest osłanianie niesparowanego końca 3' chromosomu (ang. *3' overhang*) [12].

Próby określenia biologicznego znaczenia telomerów zostały zapoczątkowane w latach trzydziestych ubiegłego wieku przez Hansa Mullera. Po trwających ponad pięćdziesiąt lat badaniach, w 1988 roku ustalono sekwencję, charakterystyczną dla odcinków telomerowych człowieka (5'-TTAGGG-3') [13]. Niespełna dwa lata później, Calvin Harley, Bruce Futcher oraz Carol Greider wykazali, że oprócz funkcji ochronnej, telomery można uznać za swoisty dla komórki „licznik podziałów”. Tezę tę oparto na obserwacjach podziałów mitotycznych fibroblastów, którym towarzyszyło sukcesywne skracanie telomerowego DNA, oszacowane na około 50-200 par zasad (bp) na podział [14]. Uzyskane wyniki badań, były bezpośrednim potwierdzeniem zasugerowanego już w latach 70-tych, niezależnie od siebie, przez Aleksieja Olovnikova [15] i Jamesa Watsona [16] tzw. problemu końca replikacji, którego istotą jest niezdolność polimerazy DNA do całkowitej replikacji dystalnych odcinków chromosomów. W jego efekcie, po osiągnięciu pewnej krytycznej długości telomeru [17], niezapewniającej już dalszej ochrony kodujących sekwencji DNA, komórka nieodwracalnie opuszcza cykl podziałowy i wchodzi w fazę starzenia [18;19].

W niektórych typach komórek, postępującej erozji telomerów przeciwdziała aktywność enzymu z rodziny odwrotnych transkryptaz, telomerazy [20]. Enzym ten występuje w postaci kompleksu rybonukleoproteinowego, który katalizuje przyłączanie powtórzeń TTAGGG w obrębie końcowych fragmentów liniowych chromosomów [21]. Aktywna forma enzymu składa się z kompleksu podjednostki hTR, złożonej z cząsteczki RNA, komplementarnej do telomerowej sekwencji genomu oraz z jednostki katalitycznej hTERT [22]. W większości ludzkich komórek somatycznych ekspresja genu kodującego hTERT jest zahamowana, co uniemożliwia tworzenie aktywnego kompleksu z hTR i jest przyczyną

osiągania przez komórkę fazy replikacyjnego starzenia. Wyjątek stanowią komórki germinalne i embrionalne komórki macierzyste [23]. Niewielką aktywnością tego enzymu cechują się też keratynocyty [24], komórki mezotelium otrzewnowego [25] oraz komórki nabłonka prostaty [26].

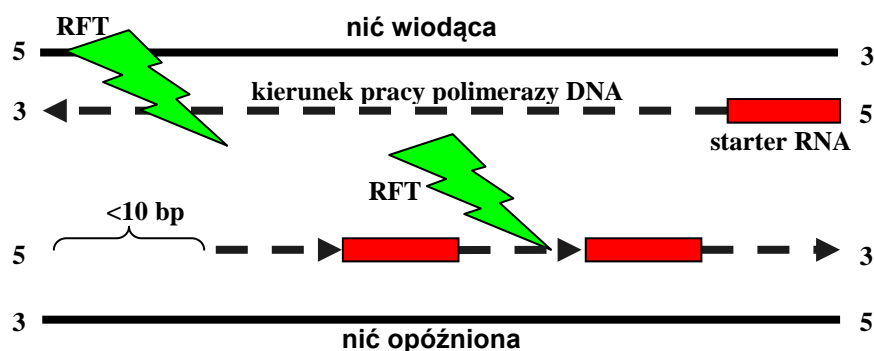
Szczególną grupą komórek, cechujących się z kolei wysoką aktywnością telomerazy są komórki nowotworowe, w których przypadku odbudowa telomerów i związane z tym unikanie procesu starzenia jest jednym z najważniejszych czynników warunkujących ich niekontrolowaną ekspansję [27;28]. Wykazano, że mechanizm zależnej od telomerazy rekonstrukcji telomerów dotyczy około 90% nowotworów [29]. Pozostała część komórek złośliwych, w tym nowotwory pochodzenia mezenchymalnego, podlegają alternatywnemu procesowi wydłużania telomerów (ang. *alternative lengthening of telomeres*; ALT), w którym odbudowa końcowych odcinków chromosomów zachodzi na skutek rekombinacji homologicznej [30].

Ostatnie badania wskazują, że elementem decydującym o wejściu komórki w stadium starzenia, poza sukcesywną utratą telomerowego DNA, mogą być zmiany strukturalne w obrębie pętli telomeru, na jego końcu 3' [31;32]. Mechanizm tych zmian obejmuje stopniową utratę stabilności pętli, która prowadzi do niekontrolowanej ekspozycji bogatego w reszty guaniny końca telomeru na składniki nukleoplazmy, czego efektem jest zainicjowanie starzenia się komórek niewykazujących ekspresji aktywnej formy telomerazy [31;33]. Istotną rolę dystalnych odcinków telomerów w indukcji starzenia potwierdzają obserwacje wskazujące na indukcyjną rolę jednoniciowego fragmentu guanozynowego w aktywacji ścieżki sygnalizacyjnej starzenia, zależnej od białka p53 [34].

W aspekcie określenia roli oraz mechanizmu aktywacji procesu starzenia, zależnego od zmian struktury telomerów, istotne okazały się także badania Li i wsp., którzy przeanalizowali starzenie się fibroblastów w obecności sekwencji homologicznej do sekwencji końca 3' telomerów. Badania te dowiodły, że ekspozycja komórek na wysokie stężenia oligonukleotydu prowadzi do jego gromadzenia się wewnątrz komórek, czego następstwem było gwałtowne rozwinięcie się w nich szeregu fenotypowych oznak starzenia [32]. Dodatkowego potwierdzenia roli zaburzenia struktury końca 3' telomeru w indukcji starzenia dostarczyły badania z wykorzystaniem wektora adenowirusowego, zawierającego sekwencję TRF2^{AD}, której ekspresja wywołała dekompozycję struktury przestrzennej fragmentu 3', prowadzącą w efekcie do trwałej blokady cyklu komórkowego, związanej z nadekspresją białka p16^{Ink4A} oraz hipofosforylacją białka retinoblastoma (pRb) [32].

1.3.2. Stres oksydacyjny a starzenie zależne od zmian długości telomerów

Liczne obserwacje wskazują, że poza problemem końca replikacji, postępująca destrukcja telomerowego DNA może również zachodzić w efekcie długotrwałej ekspozycji komórek na czynniki stresogenne, szczególnie na stres oksydacyjny [35;36]. Jednym z bezpośrednich następstw ekspozycji DNA na reaktywne formy tlenu (RFT) są uszkodzenia w obrębie, szczególnie wrażliwej na utlenianie, sekwencji bogatej w guaniny na końcach 3' telomerów [37]. W efekcie dochodzi do akumulacji jedno- oraz dwuniciowych pęknięć DNA w regionach telomerowych, stanowiących bezpośrednią przeszkodę dla kontynuacji syntezy nici potomnej i przesłankę do natychmiastowego przerwania replikacji [38]. Potwierdzenia wpływu stresu oksydacyjnego na skracanie się telomerów dostarczyły eksperymenty wykonane na fibroblastach, hodowanych w warunkach hiperoksji (40% tlenu), w przebiegu których stwierdzono znamieny wzrost tempa osiągania przez komórki fazy replikacyjnego starzenia, które następowało zwykle po zaledwie kilku rundach replikacji. Na poziomie molekularnym, wymiernym efektem zastosowanych warunków hodowlanych było nasilenie tempa skracania się telomerów, które osiągały długość krytyczną, porównywalną z komórkami utrzymywanymi w warunkach prawidłowego ciśnienia parcjalnego tlenu, przy znacząco niższej liczbie przebytych podziałów [39].



Rycina 2. Znaczenie stresu oksydacyjnego i problemu końca replikacji w skracaniu się telomerów podczas semikonserwatywnej replikacji DNA. Luka powstała na fizycznym końcu telomeru wskutek braku możliwości przyłączenia kolejnego startera RNA, celem dokończenia syntezy nici potomnej jest zbyt mała, aby wytłumaczyć ubytek rzędu 50-200 bp. Tego rozmiaru ubytki są efektem działania RFT, czemu sprzyja bardzo niska efektywność mechanizmów naprawy DNA w obrębie telomerów [37-39].

1.3.3. Efektory starzenia zależnego od zmian długości telomerów

Kluczowym mediatorem, odpowiedzialnym za reakcję komórki na rozległe uszkodzenia telomerowego DNA (rozpoznawanego jako pęknięcia dwuniciowe) jest białko p53 [40]. Białko to należy do głównych supresorów kancerogenezy i stanowi jeden z najbardziej znanych czynników mediujących replikacyjne starzenie się komórki [40]. Bierze ono udział w regulacji licznych procesów komórkowych, w tym aktywacji mechanizmów naprawczych i indukcji apoptozy w odpowiedzi na uszkodzenia DNA [41]. Bezpośredni proces aktywacji białka p53 może przebiegać na drodze przyłączania reszt acetylowych do jego końca karboksylowego, modulowanego przez czynnik związany z białkiem p300/CBP oraz w wyniku fosforylacji N-końca cząsteczki, w której kluczową rolę odgrywają kinazy AMT i DNA-PK [42;43]. W ostatnim z mechanizmów indukcji p53, istotną funkcję pełni białko onkogenne Mdm2 (ang. *murine double minute 2*), które posiada zdolność do wiązania się z jego domeną transaktywacyjną i blokowania jego zdolności do hamowania cyklu komórkowego oraz indukcji apoptozy [43]. Dzięki aktywności ligazy ubikwitynylowej, białko Mdm2 bierze udział w modyfikacji p53 i pośredniczy w kierowaniu go na drogę degradacji w proteosomach [44;45]. Co ciekawe, białko p53 może pośredniczyć w aktywacji białka Mdm2 na poziomie transkrypcji, co sugeruje występowanie ujemnego sprzężenia zwrotnego, kontrolującego utrzymywanie obu białek na niskim poziomie, co jest szczególnie istotne w warunkach braku obecności stresów komórkowych [43].

W komórkach starych aktywacja białka p53 indukuje powstanie w telomerach ognisk uszkodzeń DNA związanych ze starzeniem (ang. *senescence-associated DNA damage foci; SDF*), których manifestacją jest obecność ufosforylowanej formy histonu H2A.X (γ -H2A.X) oraz białek 53BP1 oraz MRE11 [46]. Powstanie licznych SDF prowadzi do rekrutacji oraz aktywacji kinaz ATM, które bezpośrednio, lub z udziałem kinaz Chk2, katalizują przyłączenie reszty fosforanowej do białka p53, co doprowadza do rozpadu kompleksu p53-Mdm2 i aktywacji p53 [47].

Efektorem działania białka p53 jest regulator cyklu komórkowego p21^{Cip1}, który poprzez wiązanie z cyklinozależnymi kinazami CDK4 i CDK6 oraz kompleksem CDK2-cyklina E, prowadzi do ich dezaktywacji, czego następstwem jest zahamowanie fosforylacji białka pRb [48]. Hipofosforylowana forma białka pRb bierze udział w wiązaniu czynnika Mdm2, co uniemożliwia mu połączenie się z białkiem p53 i jego degradację. Dodatkowym elementem promującym zatrzymanie podziałów komórkowych jest bezpośrednie oddziaływanie białka p21^{Cip1} z jądrowym antygenem komórek proliferujących (ang. *Proliferating Cell Nuclear*

Antygen; PCNA) oraz innymi regulatorami, takimi jak kinazy MEKK5 (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 5*), SAPK (ang. *Stress-Activated Protein Kinase*) i kalmodulina [49]. Kluczowa rola białka p21^{Cip1} w indukcji starzenia została potwierdzona w badaniach przeprowadzonych na fibroblastach, w których komórki z zablokowaną ekspresją genu *p21^{Cip1}* nie były zdolne do zaprzestania podziałów. Wykazano także, że w efektywnej odpowiedzi komórki na uszkodzenia genomu, niezbędny jest udział obydwu białek (p53 i p21^{Cip1}), gdyż w warunkach braku aktywnej formy białka p53, aktywacja p21^{Cip1} może nie nastąpić [50].

Badania poświęcone roli białka p21^{Cip1} w komórce pokazały, że poza kluczową rolą efektorową w procesie generowania przez białko p53 specyficznej odpowiedzi komórkowej, wywoływanej uszkodzeniem telomerowego DNA, istnieje mechanizm alternatywnej aktywacji p21^{Cip1} w szlaku niezależnym od p53. Występowanie tego zjawiska odnotowano w warunkach ekspozycji komórek na działanie miozyny oraz transformującego czynnika wzrostu $\beta 1$ [51;52]. Wskazuje się, że występująca w tym przypadku regulacja syntezy białka p21^{Cip1} zachodzi w wyniku bezpośredniego oddziaływania aktywatorów transkrypcyjnych na jego region promotorowy lub poprzez modulację stabilności zarówno na poziomie mRNA jak i białka [53]. Warto dodać, że następujący w odpowiedzi na różnorodne czynniki stresowe wzrost ekspresji p21^{Cip1}, niezwiązany z białkiem p53, ma charakter przejściowy, a ostateczne osiągnięcie przez komórkę fazy starzenia wymaga postępującej po sobie aktywacji białek p53 i p21^{Cip1} [49]. Obecnie uważa się, że wzrost ekspresji p21^{Cip1} w mechanizmie p53-niezależnym jest specyficzny dla określonych warunków fizjologicznych i pełni istotną funkcję w tymczasowym hamowaniu cyklu komórkowego, poprzedzającym proces różnicowania się komórek [54].

1.3.4. Starzenie replikacyjne niezależne od zmian długości telomerów

Na podstawie badań *in vitro* wykazano, że w niektórych typach komórek proces starzenia zachodzi bez wykrywalnych zmian w budowie i długości telomerowego DNA [24]. Obserwację tę potwierdzono w przypadku komórek nabłonkowych gruczołu piersiowego, prostaty oraz keratynocytów, w których ektopowa ekspresja podjednostki katalitycznej hTERT okazała się niewystarczająca — w przeciwieństwie do komórek starzejących się w sposób telomerozależny — do ich unieśmiertelnienia. Efekt ten osiągnięto dopiero wówczas, gdy ekspresję hTERT połączono z zahamowaniem aktywności białka p16^{Ink4A} [55]. Cytowane badania stały się przyczynkiem do stwierdzenia, że starzenie się komórek

pochodzenia nabłonkowego przebiega zupełnie innym szlakiem niż ten, inicjowany destrukcją telomerowego DNA oraz działaniem układu białek p53-p21^{Cip1}.

Poza obecnością niezależnego od zmian długości telomerów mechanizmu kontrolującego inicjację procesu replikacyjnego starzenia, cechą charakterystyczną komórek nabłonkowych jest posiadanie znacząco niższego potencjału proliferacyjnego w porównaniu z komórkami, których replikacja determinowana jest zmianami długości i budowy końcowych odcinków chromosomów. Zazwyczaj, możliwości podziałowe komórek nabłonkowych wynoszą około 10-20 podwojeń populacji, podczas gdy średni limit Hayflicka osiągniany przez starzejące się w sposób telomerozależny fibroblasty, mieści się w granicach 40-90 podziałów [55;56].

1.3.5. Rola białka p16^{Ink4A} w starzeniu telomeroniezależnym

Badania przeprowadzone na komórkach, w których proces starzenia przebiegał bez zmian długości telomerów wykazały, że rolę głównego efektora ich starzenia na poziomie cyklu komórkowego może pełnić białko p16^{Ink4A} [55;56]. Mechanizm indukcji starzenia z udziałem białka p16^{Ink4A} zachodzi poprzez jego przyłączenie do kinaz zależnych od cyklin i blokowanie tworzenia kompleksów CDK4 i CDK6 z cykliną D, skutkujące hamowaniem fosforylacji białka pRb i zatrzymaniem cyklu komórkowego na etapie fazy G1 [57]. Do najważniejszych czynników, mających zdolność indukcji białka p16^{Ink4A} należą: kinazy białkowe aktywowane mitogenami (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinase*; MAPK) [58], ekspresja onkogenu *Ras* [59], uszkodzenia DNA wywołane działaniem leków (bleomycyny i aktynomycyny D) [60], nieoptymalne warunki hodowlane [56] oraz zmiany strukturalne w obrębie pętli telomeru [61].

W trakcie procesu starzenia, indukcja białka p16^{Ink4A} następuje później niż aktywacja białek p53 i p21^{Cip1} [62;63]. Jest to zgodne z wynikami doświadczeń wykorzystujących hybrydyzację fluorescencyjną *in situ* (FISH), które wykazały, że ekspresja tego białka narasta w sposób gwałtowny dopiero w komórkach z późnych pasażi [64]. Dużą w tym rolę odgrywa czynnik transkrypcyjny Ets1, którego ekspresja także wzrasta w komórkach starych, prowadząc do zahamowania aktywności białka Id1, będącego represorem p16^{Ink4A} [65]. Rolę inhibitora białka p16^{Ink4A} pełni również białko Bmi-1, którego udział w hamowaniu ekspresji p16^{Ink4A} wykazały badania Jacobs i wsp., w których opisano indukcję przedwczesnego starzenia się komórek z wyciszoną ekspresją Bmi-1 [66]. Guney i wsp. wykazali z kolei, że zablokowanie aktywności białka p16^{Ink4A} zależne od czynnika Bmi-1 wymaga aktywacji ścieżki sygnalizacyjnej onkoproteiny c-Myc [67].

Interesujących informacji, rzucających nowe światło na znaczenie białka p16^{Ink4A} w komórkowym starzeniu, dostarczyły także badania Beausejour i wsp., którzy wykorzystując technikę transfekcji lentiwirusowej celem regulacji poziomu ekspresji mediatorów starzenia p53 i p16^{Ink4} dowiedli, że komórki stare, cechujące się wysokim poziomem białka p16^{Ink4} pozostają niezdolne do proliferacji pomimo inaktywacji w nich białka p53. W przeciwieństwie do nich, komórki o niskiej ekspresji p16^{Ink4}, w których inaktywowano białko p53 podejmowały zaprzestaną wcześniej aktywność mitotyczną, co sugeruje, że rolą p16^{Ink4} w komórkach starych jest nie tylko blokowanie podziałów komórkowych, lecz także, a może nawet przede wszystkim, zapewnianie permanentności tego stanu [68]. Spostrzeżenie to jest szczególnie ważne ze względu na fakt, iż wzrost ekspresji białka p16^{Ink4} następuje nie tylko w komórkach starzejących się w sposób niezależny od telomerów, lecz zachodzi także, np. w fibroblastach [65], w których krótko po wejściu w fazę starzenia, ekspresja białka p21^{Cip1}, współdziałającego z p53 w blokadzie cyklu, ulega stopniowemu obniżaniu [63].

1.3.6. Starzenie przedwczesne indukowane stresem

Istnieje szereg dowodów na to, że w określonych sytuacjach proces starzenia może zostać wywołany na długo przed osiągnięciem przez komórki typowej dla nich maksymalnej liczby podziałów. Efekt ten, określane mianem starzenia przedwczesnego indukowanego stresem (ang. *stress-induced premature senescence*; *SIPS*) zachodzi najczęściej w rezultacie ekspozycji komórek na niesprzyjające warunki hodowli *in vitro* (tzw. szok hodowlany), jak również może być wynikiem zadziaływania na komórki różnego rodzaju stresorów [69-71].

Jako szok hodowlany rozumie się szereg bodźców, którym komórki podlegają po izolacji z organizmu i przeniesieniu do środowiska hodowlanego *in vitro*. Do najważniejszych z nich można zaliczyć: wzrost na powierzchniach plastikowych, brak heterogennych oddziaływań międzykomórkowych, nieoptymalny skład pożywki, jak również utrzymywanie hodowli w warunkach hiperoksji [72;73]. Badania wykonane na ludzkich komórkach nabłonkowych, wzrastających na warstwie odżywczej, utworzonej z fibroblastów traktowanych mitomycyną C wykazały, że optymalizacja podłoża wzrostowego prowadzi do dwukrotnego wzrostu potencjału replikacyjnego komórek, czemu towarzyszyło obniżenie poziomu ekspresji białka p16^{Ink4A} [56].

Odrębną grupą czynników, odpowiedzialnych za rozwój SIPS są mutacje, prowadzące do aktywacji szeregu protoonkogenów, np. *Ras*, *Raf*, *Mos*, *PTEN*, *NF1* [74]. Szczególnie interesującym induktorem SIPS jest onkogen *Ras*, odpowiedzialny za przekazywanie

mitogennych sygnałów z receptora tyrozynowego poprzez wiązanie cząsteczki GTP [75]. Badania potwierdziły, że ekspresja *Ras* w komórkach prowadzi do rozwoju przedwczesnego starzenia, którego bezpośrednim następstwem jest zwiększenie aktywności białek p16^{Ink4A} i p53 oraz trwałe zatrzymanie podziałów, w typowej dla replikacyjnego starzenia fazie G1 [59].

Wiele obserwacji wskazuje, że jednym z czynników bezpośrednio zaangażowanych w rozwój procesu SIPS jest akumulacja RFT w komórce. Potwierdzają to m.in. badania na fibroblastach, których hodowla w warunkach niskiej prężności tlenu umożliwiła komórkom skuteczne ominięcie fazy starzenia, wywoływanej działaniem onkogenu *Ras* [76]. Z kolei inaktywacja genu dla *seladyny-1*, pełniącej rolę sensora poziomu stresu oksydacyjnego, efektywnie zahamowała starzenie komórek zależne od aktywności *Ras*, prowadząc je na drogę transformacji [77]. Na podstawie tych obserwacji wysunięto tezę, że indukcja SIPS jest formą dynamicznej odpowiedzi komórki na działanie czynników, mogących prowadzić do rozwoju zmian neoplastycznych [59]. Z tego też powodu, zarówno wywołane podziałami mitotycznymi replikacyjne starzenie się komórek somatycznych, jak również indukowane działaniem różnego typu stresorów SIPS, uznawane są za utrwalony ewolucyjnie mechanizm supresji nowotworów [78].

1.4. Fenotyp komórek starych

Komórki, które osiągnęły fazę starzenia, czy to na skutek przebycia krytycznej liczby podziałów, czy też w wyniku zadziałania określonych stresorów, w sposób zasadniczy różnią się od komórek proliferujących szeregiem cech morfologicznych i czynnościowych, określanych wspólnym mianem fenotypu komórek starych [79]. Do najbardziej klasycznych cech komórek starych należą: zwiększenie rozmiarów (hipertrofia), spłaszczenie, utrata jednolitego kształtu, wielojądrzastość i wakuolizacja [8;80;81]. Prócz tego, może dochodzić do agregacji białek w retikulum endoplazmatycznym, przy jednoczesnym zmniejszeniu ekspresji białek opiekuńczych BiP, biorących udział w ich fałdowaniu [82;83]. Wzrastający poziom RFT prowadzi z kolei do zaburzenia pracy i struktury mitochondriów [84], w tym zaburzenia ciągłości grzebieni mitochondrialnych oraz błony wewnętrznej [85]. Dysfunkcja dotyczy także lizosomów, a jej głównym przejawem jest gromadzenie się fluoryzującego pigmentu, lipofuscyny [86]. Prawdopodobnym skutkiem niewydolności tych organelli jest także pojawienie się w cytoplazmie aktywności β -galaktozydazy, która w przeciwieństwie do tzw. całkowitej odmiany tego enzymu, wykrywanej przy pH 4,0, wykrywana jest przy pH

6,0, zyskując miano „związanej ze starzeniem” (ang. *senescence-associated β -galactosidase; SA- β -Gal*) [87-89]. Obecnie, mimo pewnych głosów krytyki [90], SA- β -Gal jest najczęściej wykorzystywanym markerem komórek starych w badaniach *in vitro* i *in vivo* [91]. Innymi uznawanymi markerami komórek starych są: ufosforylowana forma histonu H2A.X (γ -H2A.X) [92], wyspecjalizowane domeny fakultatywnej heterochromatyny (ang. *senescence-associated heterochromatic foci; SAHF*) [93], domeny DNA-SCARS (ang. *DNA segments with heterochromatin alterations reinforcing senescence*) [94] oraz produkt oksydacyjnych uszkodzeń DNA, 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyna (8-OH-dG) [95].

Inną, ważną cechą komórek starych jest zmiana ekspresji szeregu genów, kontrolujących kluczowe aspekty metabolizmu komórki (Tabela nr 1). Należy jednocześnie podkreślić, że pomimo morfologicznej degeneracji, trwałej niezdolności do podziałów i rozległych, nienaprawialnych uszkodzeń makrocząsteczek, szczególnie DNA, komórki stare przez długi czas pozostają żywe i aktywne metabolicznie [96], w czym dużą rolę odgrywa ich oporność na docierające sygnały proapoptotyczne [97].

1.4.1. Fenotyp sekrecyjny związany ze starzeniem

Pochodną zmiany ekspresji genów w komórkach starych, a zarazem cechą szczególnie ważną w kontekście ich roli w procesie starzenia się organizmu jako całości oraz rozwoju chorób związanych z wiekiem jest nabywanie tzw. fenotypu sekrecyjnego (ang. *senescence-associated secretory phenotype; SASP*). Istotą tego zjawiska jest wzmożone wydzielanie do środowiska szeregu czynników o zróżnicowanych funkcjach, które można zaliczyć do kilku kategorii. Są wśród nich cytokiny (IL-1, IL-6, IL-7, IL-13, IL-15) i chemokiny prozapalne (CCL2/MCP-1, CCL8/MCP-2, CCL26, CXCL8/IL-8, CXCL12/SDF-1), czynniki wzrostu (amfiredulina, EGF, hFGF, HGF, heregulina, KGF, NGF, VEGF), proteazy i ich modulatory (MMP-1, -3, -10, -12, -13, -14, TIMP-2, PAI-1, PAI-2, t-PA, u-PA, katepsyna B), rozpuszczalne lub zrzucane z powierzchni receptory i ligandy (ICAM-1, ICAM-3, OPG, sTNFR1, Fas, SGP130, EGF-R) oraz składniki ECM (fibronektyna) [98;99].

Tabela 1. Przykłady genów, których ekspresja uległa zmianie w replikacyjnie starych fibroblastach (na podstawie [100;101]).

| FUNKCJA | NAZWA | ZMIANA |
|------------------------------------|---|---------------|
| regulacja cyklu komórkowego | cyklina A2 | ↓ |
| | białkowy regulator cytokinezy-1 (PRC1) | ↓ |
| | białko związane z insulinopodobnym czynnikiem wzrostu-2 | ↓ |
| | cyklina D1 | ↑ |
| | onkogen związany ze wzrostem (CXCL1/GRO-1) | ↑ |
| | heksokinaza 2 (HK2) | ↑ |
| odpowiedź immunologiczna | czynnik specyficzny dla osteoblastów (OSF2) | ↓ |
| | neurotrymina (HNT) | ↓ |
| | nadrodzina C prokadheryn γ (PCDH) | ↓ |
| | dermatopontyna (DMP) | ↓ |
| | kadheryna-2 | ↑ |
| | antygen CD36 | ↑ |
| | białko 6 indukowane czynnikiem martwicy nowotworów | ↑ |
| przewodnictwo sygnału | receptor związany z białkiem G (RDC-1) | ↓ |
| | białko Rab3 aktywujące GTPazę (RAGP) | ↓ |
| | proenkefalina (ENK) | ↑ |
| | receptor 1 fosfolipazy A ₂ (PLA2R1) | ↑ |
| | receptor A czynnika natriuretycznego | ↑ |
| reakcja zapalna | syntaza prostaglandyny-1 | ↓ |
| | cyklooksygenaza 2 (COX2) | ↑ |
| | interleukina 1 (IL-1) | ↑ |
| | interleukina 6 (IL-6) | ↑ |
| | interleukina 15 (IL-15) | ↑ |
| | chemokina CXCL6 | ↑ |
| | białko chemotaktyczne monocytów-1 (CCL2/MCP-1) | ↑ |
| | cząsteczka adhezyjna ICAM-1 | ↑ |
| | kolagen I i III | ↓ |

| | | |
|---|---|---|
| synteza i degradacja macierzy pozakomórkowej | elastyna | ↓ |
| | laminina | ↓ |
| | kolagenaza | ↓ |
| | metaloproteaza 1 (MMP-1) | ↓ |
| | fibronektyna | ↑ |
| | inhibitor aktywatora plazminogenu-1 i -2 (PAI-1, PAI-2) | ↑ |
| | urokinazowy aktywator plazminogenu (u-PA) | ↑ |
| | metaloproteaza 3 (MMP-3) | ↑ |
| przebudowa cytoszkieletu komórki | kompleks 2/3 białek zależnych od aktyny (podjednostka 2) | ↓ |
| | keratyna 14 (KRT14) | ↑ |
| | keratyna 19 (KRT19) | ↑ |
| | tymozyna beta 10 | ↑ |
| czynniki wzrostu | heregulina (HRG) | ↑ |
| | transformujący czynnik wzrostu β 1 (TGF- β 1) | ↑ |

Uważa się, że główny udział w powstawaniu SASP mają gromadzące się w komórkach starych uszkodzenia DNA, których efektem jest mobilizacja kinaz ATM i CHK2 oraz białka adaptorowego NBS1, koniecznych dla zwiększonego wydzielania czynników prozapalnych [102]. Istotne dla rozwoju tej cechy są także zmiany zachodzące w architekturze chromatyny jądrowej [103]. Elementem tych zmian jest m.in. gromadzenie się podjednostki p65 czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, który może pełnić funkcję nadrzędnego regulatora rozwoju omawianej cechy [104]. Potwierdzeniem tej tezy były obserwacje, w których zablokowanie podjednostki p65/NF- κ B spowodowało znamienne ograniczenie zdolności wydzielniczych komórek starych [105]. W tym kontekście, na szczególną uwagę zasługuje pobudzenie aktywności transkrypcyjnej NF- κ B pod wpływem działania kinazy p38 MAPK, która wydaje się mieć zdolność wzbudzania właściwości sekrecyjnych komórek w sposób niezależny od aktywacji szlaków odpowiedzi na uszkodzone DNA [105].

Integralnym elementem rozwoju SASP mogą być także kompleksy receptorów i białek efektorowych, kontrolujących przebieg reakcji zapalnej, zwane inflammasomami [106], a szczególnie związana z ich aktywnością ścieżka sygnałowa IL-1 [107]. Co ciekawe, jeden z receptorów wchodzących w skład inflammasomów, RIG-1 (ang. *retinoic acid inducible*

gene-1), zaangażowany w indukcję czynników prozapalnych, w tym IL-6 i CXCL8/IL-8, jest także silnym aktywatorem NF-κB [108].

1.5. Znaczenie starzenia się komórek dla starzenia się organizmu

Pierwszym, który zasugerował, że starzenie się komórek może odzwierciedlać określone aspekty starzenia się organizmu jako całości był Leonard Hayflick. Podstawą tej tezy była obserwacja, że komórki pobrane od dojrzałych dawców cechują się niższymi możliwościami proliferacyjnymi niż te, pobrane od płodów [9]. Podobną korelację między wiekiem dawcy a osiąganą przez komórki liczbą podziałów odnotowano w przypadku komórek mezotelium otrzewnowego [109], komórek śródbłonna naczyniowego [110] oraz keratynocytów [111]. Innym dowodem na istnienie współzależności między starzeniem się komórek *in vitro* a starzeniem się organizmu jako całości *in vivo* było stwierdzenie zwiększonego odsetka komórek starych w tkankach osób w wieku podeszłym [89;112].

Jak dotychczas, obecność komórek o fenotypowych oznakach starzenia wykazano w jamie otrzewnej [109], w naczyniach krwionośnych, w obrębie blaszek miażdżycowych [113;114], w skórze [89], w rogówce [115] oraz w krążkach międzykręgowych [116]. Gromadzenie się w tkankach komórek starych, które poprzez specyficzny profil wydzielniczy wpływają na kształtowanie lokalnego mikrośrodowiska, może stanowić przyczynę powstawania tzw. fenotypu degeneracyjnego związanego z wiekiem (ang. *age-associated degenerative phenotype*) [117], czego skutkiem jest wzrost podatności organizmu na rozwój określonych patologii, w tym chorób układu sercowo-naczyniowego, neurodegeneracyjnych oraz schorzeń układu ruchu. Scenariusz ten jest możliwy w obliczu danych statystycznych, które pokazują, że do uniwersalnych, lecz nie obligatoryjnych skutków starzenia należą m.in.: postępująca atrofia mięśni, spadek elastyczności skóry, wydłużenie średniego czasu gojenia się ran, postępujący zanik siatkówki oraz zmniejszenie przejrzystości soczewki oka [2].

Jednym z bezpośrednich efektów wywoływanych obecnością komórek starych *in vivo* jest zaburzenie prawidłowej struktury tkanek [118]. Dowodzą tego m.in. badania Parrinello i wsp., którzy analizując proces różnicowania się komórek nabłonka gruczołu piersiowego wykazali, że obecność starych fibroblastów działa destrukcyjnie (poprzez wzrost wydzielania metaloproteaz) na właściwe kształtowanie się rozgałęzionych struktur pęcherzykowych, zaangażowanych w wytwarzanie mleka [119]. Z kolei gromadzenie się starych komórek mięśni gładkich tętnicy płucnej u pacjentów z przewlekłą obturacyjną

chorobą płuc okazało się dodatnio korelować z rozwojem hipertrofii ściany naczyń. Co więcej, komórki te pobudzały proliferację i migrację swych młodych odpowiedników, co według autorów przywołanej pracy może leżeć u podstaw rozwoju nadciśnienia płucnego u tych chorych [120]. Komórki stare mogą także przyczyniać się do rozwoju lub zaostrzenia przebiegu miażdżycy. Spekuluje się, że jednym ze skutków SASP, generowanego przez komórki stare w obrębie blaszki miażdżycowej może być nasilenie prozapalnego charakteru środowiska, kreowanego pierwotnie przez makrofagi w przestrzeni podśródbłonkowej [121]. Dodatkowo, indukowana procesem starzenia i postępująca dysfunkcja tkanki tłuszczowej może zaburzać prawidłowy metabolizm kwasów tłuszczowych, w tym ich magazynowanie, przyczyniając się do gromadzenia i odkładania aterogennych lipidów w ścianach naczyń krwionośnych [122].

1.6. Starzenie a rozwój choroby nowotworowej

Najpoważniejszą jednak patologią, pozostającą w nierozzerwalnym związku z procesem starzenia jest choroba nowotworowa [123]. Dowody potwierdzające istnienie związku między tymi dwoma procesami pochodzą zarówno z doświadczeń na zwierzętach, jak również z obserwacji pacjentów onkologicznych. Już w latach 80-tych ubiegłego stulecia, Zimmerman i wsp., analizując wpływ wieku na rozwój nowotworów trzustki u myszy stwierdzili, że ekspozycja zwierząt na działanie kancerogennej pochodnej nitrozomocznika indukuje rozwój nowotworów wyłącznie u osobników starszych [124]. Z kolei badania na modelu szczurzym wykazały, że syngeniczny przeszczep transformowanych hepatocytów skutkowało rozwojem zmian nowotworowych przede wszystkim w wątrobie osobników starszych [125]. U ludzi, częstość występowania nowotworów wzrasta wykładniczo wraz z wiekiem i obejmuje ponad 60% osób po 65 roku życia [126]. Co ważne, szczególne przyspieszenie tempa rozwoju nowotworów obserwuje się dopiero w wieku dojrzałym (około połowy średniej długości życia człowieka) [127;128], co prawdopodobnie wynika z czasu, niezbędnego do nagromadzenia się w komórkach krytycznej liczby onkogennych mutacji [118]. Z drugiej jednak strony, aberracje genetyczne obecne w komórkach pre-neoplastycznych, a często także w przylegających do nich komórkach prawidłowych, nie zawsze przekładają się na rozwinięcie fenotypu nowotworowego *in vivo* [129-131]. Oznacza to, że w przypadku wielu typów nowotworów, nagromadzenie się dużej liczby mutacji nie jest warunkiem wystarczającym do zainicjowania procesu rozrostowego, co sugeruje, że zasadnicze znaczenie dla progresji nowotworu ma także odpowiednie mikrośrodowisko

tkankowe, przyzwalające na przekształcenie się komórek preneoplastycznych w komórki o w pełni wyrażonych cechach złośliwości [132;133].

W kontekście wiedzy, którą dysponujemy na temat gromadzenia się wraz z wiekiem komórek starych, powstała koncepcja, zgodnie z którą to właśnie komórki stare, szczególnie fibroblasty, mogą kreować pronowotworowe warunki środowiska tkankowego. Teoria ta zakłada pewien dualizm biologicznego znaczenia procesu starzenia komórkowego, które z jednej strony, szczególnie w organizmach młodych, może stanowić formę mechanizmu supresorowego nowotworów (komórki które się nie dzielą, nie mogą ulec transformacji nowotworowej), a z drugiej, w miarę ich gromadzenia się w tkankach wraz z wiekiem, może promować różnorakie elementy progresji nowotworów, szczególnie w oparciu o SASP [134;135]. Bezpośrednich dowodów na potwierdzenie pronowotworowego działania komórek starych dostarczyły badania Krtolicy i wsp., którzy dowiedli, że stare fibroblasty promują w znacznie większym stopniu niż komórki młode proliferację pre-neoplastycznych komórek nabłonkowych oraz wysoce agresywnych komórek raka piersi MDA-231 *in vitro*. Efekt ten był także obecny *in vivo*, kiedy to rozwój guzów nowotworowych po wszczepieniu myszom mieszanin komórek raka piersi ze starymi fibroblastami był bardziej nasilony w porównaniu z osobnikami, którym komórki rakowe implantowano w obecności fibroblastów młodych [136]. Jako główny mechanizm, leżący u podłoża pronowotworowego działania starych fibroblastów, autorzy cytowanej pracy zidentyfikowali bezpośrednie oddziaływanie typu komórka prawidłowa-komórka nowotworowa. Idący ich śladem Liu i wsp. wykazali natomiast, że stare fibroblasty mogą stymulować progresję komórek raka piersi *in vitro* i *in vivo* także poprzez czynniki wydzielane do środowiska, w tym metaloproteazy oraz czynnik wzrostu hepatocytów (HGF) [137]. Połączony udział oddziaływań komórka-komórka oraz czynników wydzielanych do środowiska (szczególnie amfireguliny) wykazali natomiast Bavik i wsp., obserwując pobudzający wpływ starych fibroblastów na proliferację transformowanych komórek nabłonka prostaty [138].

Komórki stare mogą wpływać na progresję nowotworów także w sposób pośredni, np. w wyniku pobudzania, kluczowego dla rozwoju guza, zjawiska angiogenezy [139]. Silnym źródłem czynników proangiogennych okazały się być bowiem stare fibroblasty, które wydzielając zwiększone ilości VEGF efektywnie nasilały stopień inwazyjności komórek śródbłonka naczyniowego przez błony podstawne. Potwierdzeniem proangiogennego wpływu komórek starych były doświadczenia na zwierzętach, u których stwierdzono

nasiloną waskularyzację zmian nowotworowych po wszczepieniu transformowanych komórek nabłonkowych wraz ze starymi fibroblastami [140].

1.7. Rak jajnika

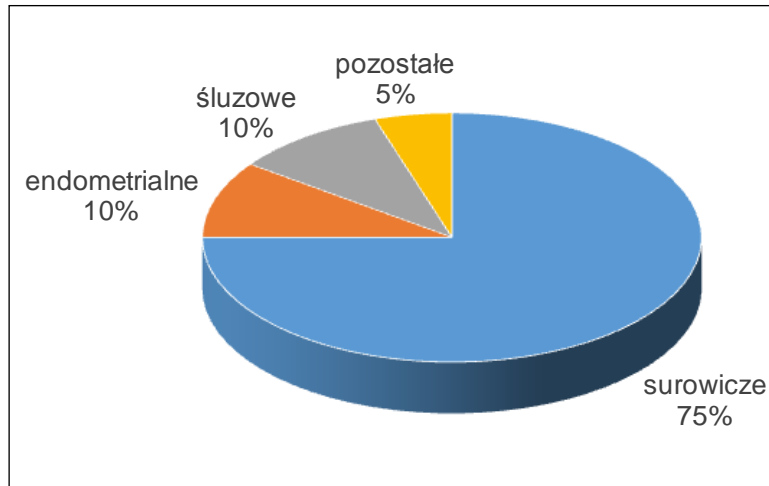
Rak jajnika stanowi czwartą pod względem częstości występowania przyczynę śmierci wśród kobiet zamieszkujących Amerykę Północną oraz regiony północnej oraz zachodniej Europy. Według statystyk, liczba zachorowań na raka jajnika wykazuje stałą tendencję wzrostową, uzależnioną w dużej mierze od regionu geograficznego [126]. Obecnie szacuje się, że wiodącym obszarem geograficznym pod kątem występowania tego nowotworu jest rejon północnoeuropejski, w którym liczba zachorowań w roku 2012 wyniosła ponad 65 tysięcy przypadków, wśród których blisko 70% stanowiły przypadki śmiertelne [141]. Na podstawie danych z 2001 roku szacuje się, że w Polsce wskaźnik zachorowań na raka jajnika dotyczy średnio trzech na sto tysięcy przebadanych kobiet przed trzydziestym rokiem życia oraz trzydziestu siedmiu kobiet na sto tysięcy badanych w wieku powyżej pięćdziesiątego roku życia. Największą częstość występowania tego nowotworu, wynoszącą blisko sześćdziesiąt przypadków na sto tysięcy kobiet, obserwuje się u pacjentek w wieku około- i pomenopauzalnym, który obejmuje przedział pomiędzy czterdziestym a siedemdziesiątym rokiem życia [141].

Pomimo stałego rozwoju technik diagnostycznych, rak jajnika wykrywany jest bardzo późno, zazwyczaj w zaawansowanym stadium choroby. Sytuacja ta wynika z faktu, że w początkowych fazach, chorobie tej towarzyszą subtelne, mało specyficzne objawy. Innym czynnikiem jest brak wartościowych, specyficznych markerów wczesnej diagnozy [142]. Dane epidemiologiczne wskazują, że w momencie postawienia diagnozy, ponad 62% wykrytych nowotworów jajnika znajduje się już w zaawansowanym stadium choroby, w 17% przypadków nowotwór zajmuje lokalne tkanki, a tylko w 15% przypadków choroba jest ograniczona do samego jajnika [143].

1.7.1. Klasyfikacja histologiczna nowotworów jajnika

Nowotwory jajnika należą do nowotworów cechujących się dużą heterogennością, a stosowany w praktyce klinicznej podział na podtypy histologiczne oparty jest głównie na ocenie cech architektonicznych komórek, zdolności do podziałów mitotycznych oraz zmian strukturalnych na terenie jądra komórkowego. Analizy histopatologiczne dowodzą, że około 90% nowotworów złośliwych jajnika wykazuje pochodzenie nabłonkowe (łac. *carcinoma*).

Pod względem klinicznym, największe znaczenie mają guzy surowicze, endometrialne i śluzowe. Pozostałą część stanowią guzy jasnokomórkowe, niezróżnicowane i niesklasyfikowane (Rycina 3) [144].



Rycina 3. Częstość występowania poszczególnych histologicznych typów raka jajnika (na podstawie [144]).

1.7.2. Obraz kliniczny choroby

Do najważniejszych objawów raka jajnika, towarzyszących szerzeniu się procesu nowotworowego w miednicy i jamie brzusznej, należą dolegliwości bólowe o nietypowej lokalizacji, wzdęcia brzucha, zaparcia, dyspepsja oraz uczucie sytości. Często, pierwotnym objawem jest zwiększony obwód brzucha, będący wynikiem gromadzenia się dużych ilości płynu puchlinowego w jamie otrzewnej. Innymi, równie niespecyficznymi objawami są krwawienia oraz nagłe parcie na mocz. Gdy guz rozprzestrzenia się poza miednicę mniejszą, pojawiają się bóle podczas odbywania stosunków płciowych [145].

Pod względem rokowniczym, jak również pod kątem oceny możliwych do podjęcia sposobów leczenia, kluczowym parametrem jest ocena stopnia złośliwości nowotworu. W praktyce opiera się ona na czterostopniowej skali zaawansowania wg Międzynarodowego Stowarzyszenia Ginekologii i Położnictwa (ang. *The International Federation of Gynecologists and Obstetricians; FIGO*), określającej stopień rozprzestrzenienia się komórek złośliwych w obrębie jajnika, tkanek sąsiadujących i narządów odległych (Tabela nr 2) [146].

Tabela 2. Klasyfikacja kliniczna nowotworów jajnika według FIGO [146].

| STOPIEŃ | CHARAKTERYSTYKA |
|---------|--|
| I | guz zlokalizowany w obrębie jajnika |
| IA | guz zlokalizowany w obrębie jednego jajnika, brak wodobrzusza, powierzchnia guza zwarta, brak obecności komórek neoplastycznych w tkankach otaczających |
| IB | guzy zlokalizowane w obu jajnikach, brak wodobrzusza, powierzchnia guza zwarta, brak obecności komórek neoplastycznych w tkankach otaczających |
| IC | cechy guzów IA i IB, z towarzyszącym wodobrzuszem, obecnością komórek nowotworowych na powierzchni guzów lub w płynie otrzewnowym |
| II | guz zlokalizowany w obrębie jednego lub obu jajników, przerzuty komórek nowotworowych do miednicy mniejszej |
| IIA | naciekanie i przerzuty komórek nowotworowych do jajowodów i/ lub macicy |
| IIB | obecność komórek nowotworowych w pozostałych tkankach miednicy mniejszej |
| IIC | cechy guzów IIA i IIB, z towarzyszącym wodobrzuszem, obecnością komórek nowotworowych na powierzchni guza lub w płynie otrzewnowym |
| III | guzy zlokalizowane w obrębie jednego lub dwóch jajników, potwierdzone histologicznie przerzuty w obrębie otrzewnej poza miednicą mniejszą, zajęcie pozaotrzewnowych węzłów chłonnych |
| IIIA | wzrost guza ograniczony do miednicy mniejszej, potwierdzona obecność komórek nowotworowych w obrębie otrzewnej |
| IIIB | guzy do 2 cm, na powierzchni jednego lub obu jajników, liczne przerzuty wewnątrzotrzewnowe |
| IIIC | guzy powyżej 2 cm, przerzuty wewnątrzotrzewnowe poza miednicę, zajęcie węzłów chłonnych |
| IV | obecność guzów na jednym lub obu jajnikach, przerzuty do tkanek odległych |

1.7.3. Etiopatogeneza raka jajnika

Próby określenia podłoża rozwoju raka jajnika sięgają drugiej połowy osiemnastego wieku, kiedy to Sir Spencer Wells zasugerował, iż nowotwór ten wywodzi się z mało zróżnicowanych komórek nabłonka powierzchniowego jajnika [147]. Zgodnie z tą teorią, do głównych czynników inicjujących zjawiska neoplastyczne należą, związane z wiekiem zmiany degeneracyjne w obrębie jajników, stymulacja hormonami gonadotropowymi oraz wysoka częstotliwość owulacji [148;149]. Czynniki te są odpowiedzialne za powstawanie

mikrouszkodzeń nabłonka pokrywającego jajnik, którego regeneracja stanowi przyczynę ich spontanicznego odróżnicowywania się w kierunku komórek o odmiennych cechach morfologicznych i czynnościowych, odpowiadających histologicznie komórkom zlokalizowanym w jajowodzie, endometrium, szyjce macicy, pęcherzu moczowym oraz przewodzie pokarmowym [148-150]. W zgodzie z tą teorią są m.in. badania przeprowadzone na mysich komórkach nabłonka powierzchniowego jajnika (MOSEC), które wykazały, że komórki te posiadają wysoką zdolność do podlegania spontanicznym mutacjom, prowadzącym do transformacji nowotworowej [151].

Pomimo, że wspomniana koncepcja liczy wiele dziesięcioleci i nadal znajduje swoich zwolenników, jest ona także źródłem pewnych kontrowersji. Jednym z bezpośrednich dowodów świadczących przeciwko jej słuszności są badania przeprowadzone przez Sharma i wsp., którzy monitorując grupę 48 tysięcy kobiet w wieku pomenopauzalnym wykazali, że występowanie cyst inkluzyjnych w obrębie komórek nabłonka pokrywającego jajnik nie wpływa na wzrost częstości rozwoju procesów neoplastycznych [152;153]. Zgodne z tym są także obserwacje dokonane przez Louisa Dubeau, który wykazał, że komórki w stadium poprzedzającym proces nowotworzenia są rzadko zlokalizowane w obrębie cyst, tworzonych przez komórki nabłonka pokrywającego jajnik, częściej natomiast występują w innych, przylegających narządach [154].

Ten sam autor, w 1999 roku zasugerował, że właściwym źródłem raka jajnika mogą być komórki nabłonkowe, wyściełające jego powierzchnię, a wywodzące się w embriogenezie z nabłonka mezodermalnego (*mesothelium*), pokrywającego pierwotną jamę ciała (*coelomic mesothelium*) [154]. Koncepcja ta, opisująca powstawanie raka jajnika w wyniku metaplastyki komórek mezotelium odpowiada tzw. hipotezie „drugiego systemu Mullerowskiego”, która odnosi się do powstawania nowotworów, których źródłem są wszystkie typy nabłonka, wywodzące się z pierwotnych przewodów Mullera [155]. Zgodnie z tą teorią, mezotelium i komórki nabłonka powierzchniowego jajnika są elementami tzw. drugiego systemu Mullerowskiego, a ich cechą charakterystyczną jest posiadanie wysokiej zdolności do różnicowania się oraz potencjalnych przemian metaplastycznych, szczególnie w kierunku surowiczego, endometrialnego oraz jasnokomórkowego podtypu raka jajnika [155;156]. Badania poświęcone określeniu przyczyn wspomnianej metaplastyki wykazały, że konwersję komórek mezotelium do nabłonka Mullerowskiego może inicjować miejscowa ekspozycja na czynniki hormonalne, poprzedzona wytworzeniem lokalnych cyst inkluzyjnych [153]. Cysty te, wykształcając fenotyp nabłonka Mullerowskiego, nabywają zdolności do

transformacji neoplastycznej, która prowadzi do ich przeobrażania w komórki nowotworowe o określonych cechach histologicznych [152;153]. Potwierdzeniem słuszności teorii Mullerowskiej były przeprowadzone w 2005 roku badania ekspresji genów w komórkach raka jajnika, które wykazały, że komórki te wykazują, w przeciwieństwie do prawidłowych komórek nabłonka jajnika, wysoką ekspresję genów z rodziny *HOX*, których aktywność jest cechą charakterystyczną nabłonków pochodzenia Mullerowskiego, odpowiedzialną za ich zdolność do różnicowania się [151].

Alternatywną koncepcję stworzyli Piek i wsp., którzy zasugerowali, że potencjalnym źródłem komórek nowotworowych, odpowiedzialnym za rozwój surowiczego raka jajnika są strzępki jajowodu, które na skutek oderwania podlegają implantacji na powierzchni jajnika [157]. W zgodzie z tą teorią są badania Stevena Naroda, wskazujące na występowanie obniżonego wskaźnika rozwoju raka jajnika u pacjentek ze stwierdzoną mutacją w genach *BRCA*, które poddane zostały zabiegowi podwiązania jajowodów [158]. Było to także zgodne z doniesieniami, mówiącymi, że profilaktycznie usunięte jajowody u nosicielek tej samej mutacji wykazują obecność wewnątrz nabłonkowych raków jajowodu przy braku ognisk nowotworu w nabłonku pokrywającym jajnik [159].

Badania mutacji w komórkach nowotworowych raków surowicznych i endometrialnych jajnika wykazały występowanie wspólnych zaburzeń w przebiegu szlaków molekularnych kontrolowanych przez produkty ekspresji zmutowanych genów *KRAS* i *BRAF* [153]. Obecność tych samych zaburzeń genetycznych częściowo potwierdza teorię wskazującą na możliwość wywodzenia się wskazanych typów nowotworów od niezłośliwych nowotworów jajnika, które w wyniku nasilenia procesów neoplastycznych ostatecznie warunkują rozwój surowiczego i endometrialnego raka jajnika [153]. Co więcej, również badania poświęcone mechanizmom prowadzącym do rozwoju śluzowego raka jajnika, posiadającego również mutację w obrębie genu *KRAS*, potwierdziły, że wskazany typ nowotworu bardzo często rozwija się na podłożu guza łagodnego [160].

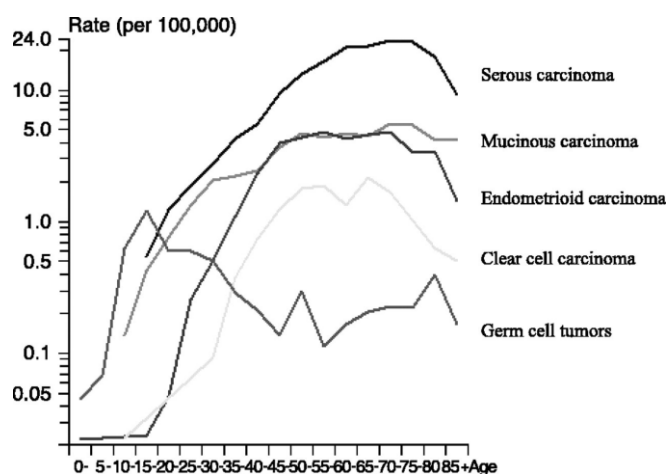
W odniesieniu do endometrialnego raka jajnika istnieją badania wskazujące, że źródło komórek nowotworowych, charakteryzujących się obecnością mutacji genu supresorowego *PTEN* oraz *CTNNB1* może powstać zarówno w następstwie endometriozy, jak też obecności pojedynczych komórek endometrium [153;160]. Podobnie, z ognisk endometriozy lub komórek gruczołowych kanału szyjki macicy może pochodzić jasnokomórkowy rak jajnika [149].

1.7.4. Czynniki determinujące występowanie raka jajnika

Rak jajnika należy do chorób cechujących się szczególnie wysoką agresywnością oraz heterogennością w odniesieniu do czynników go inicjujących oraz do tempa rozwoju zmian w obrębie tkanek i narządów [153]. Częstość występowania tego nowotworu cechuje się dużym zróżnicowaniem i jest uzależniona od szeregu czynników, spośród których najważniejszymi wydają się: wiek, status hormonalny pacjentek, czynniki związane z rozrodnością, predyspozycje genetyczne oraz rodzaj stosowanej diety.

1.7.4.1. Wiek pacjentki

Częstość występowania raka jajnika rośnie wraz z wiekiem (Rycina 4), a zachorowanie dotyczy najczęściej kobiet w wieku około- i pomenopauzalnym, z których ponad połowę stanowią pacjentki, które przekroczyły 65 rok życia [161]. W głównej mierze, efekt ten jest związany z towarzyszącymi menopauzie zmianami gospodarki hormonalnej, w tym obniżeniem stężenia estrogenów i wzrostem stężenia, pobudzających proliferację komórek złośliwych, hormonów gonadotropowych [162].



Rycina 4. Wzrost częstości występowania poszczególnych typów histologicznych raka jajnika wraz z wiekiem (według [4]).

Prócz zwiększonej częstości występowania raka jajnika, proces starzenia wpływa także na stopień inwazyjności komórek nowotworowych. Stwierdzono, że u kobiet w wieku $75,4 \pm 10,9$ lat, choroba okazała się mieć agresywniejszy przebieg niż u pacjentek w wieku $67,9 \pm 10,9$ lat. Także średni wiek zachorowania kobiet z guzem o wysokim stopniu inwazyjności okazał się być wyższy ($59,1$ lat) w porównaniu z pacjentkami, z guzem ograniczonym ($48,4$

lata) [5]. Pewne różnice stwierdzono także w przeżywalności chorych, która w przypadku kobiet przed 80 rokiem życia była o średnio 1,5 roku dłuższa niż u pacjentek w wieku 80 lat i więcej [163].

1.7.4.2. Czynniki związane z rozrodczością

Istotną grupą czynników, wpływających na prawdopodobieństwo rozwoju nowotworów jajnika są aspekty związane z aktywnością rozrodczą kobiety. Przyjmuje się, że do czynników podwyższających ryzyko wystąpienia choroby należą: wczesna pierwsza miesiączka [164], późna menopauza [165], późna pierwsza ciąża [164], niepłodność [166], stosowanie leków na bezpłodność [167] oraz hormonalna terapia zastępcza [168]. Z drugiej strony, czynniki wpływające na zahamowanie owulacji, w tym przebyte ciążę, laktacja oraz stosowanie doustnych środków antykoncepcyjnych, w znacznym stopniu ograniczają rozwój zjawisk neoplastycznych w obrębie jajników [169]. U pacjentek posiadających liczne potomstwo, ryzyko zachorowania na nowotwór jajnika jest mniejsze o 30-70% [170]. Także karmienie piersią przez łączny okres 18 miesięcy, u nosicielek mutacji genu *BRCA1*, obniża ryzyko rozwoju raka o blisko 50% [171;172].

Z kolei ochronny wpływ braku owulacji na rozwój zmian nowotworowych jest związany z zapobieganiem tworzenia się struktur inkluzyjnych oraz ochronie warstwy nabłonkowej jajnika, eksponowanej na wysokie stężenia estrogenów, obecnych w otaczającym je płynie pęcherzykowym [150]. Badania poświęcone określeniu wpływu stosowania antykoncepcji na powstawanie nowotworu jajnika wykazały, że ryzyko rozwoju choroby przy stosowaniu jej powyżej 10 lat spada o połowę [173]. Zależność tę potwierdzają obserwacje przeprowadzone na grupie pacjentek z nowotworem jajnika w wywiadzie rodzinnym, u których obniżenie ryzyka rozwoju choroby korelowało dodatnio z długością stosowania antykoncepcji [174]. Obecnie wskazuje się, że istotnym czynnikiem determinującym protekcyjne względem rozwoju raka jajnika działanie środków antykoncepcyjnych jest wiek, szczególnie w przypadku pacjentek cechujących się występowaniem mutacji w genie *BRCA1*. Badania wskazują, że w tej grupie kobiet, ryzyko rozwoju nowotworu wzrasta przy stosowaniu antykoncepcji poniżej 25 roku życia, natomiast znaczące obniżenie, sięgające nawet 50%, obserwowane jest w przypadku stosowania preparatów antykoncepcyjnych u pacjentek w wieku 30 lat i starszych [174].

1.7.4.3. Tło genetyczne

Ważnym czynnikiem, predysponującym do wystąpienia raka jajnika jest tło genetyczne. Wśród najczęściej występujących w tym nowotworze mutacji wymieniane są zaburzenia w sekwencjach genów *BRCA1/2* (ang. *breast cancer 1/2, early onset*), *NOD2* (ang. *nucleotide-binding oligomerization domain containing 2*), *CHEK2* (ang. *checkpoint kinase 2*), *DHCR7* (ang. *7-dehydrocholesterol reductase*) [175]. Pod względem klinicznym, wyróżnia się trzy zespoły uwarunkowane genetycznie: zespół rodzinnego raka jajnika (ang. *hereditary ovarian syndrome*; HOC), zespół rodzinnego raka piersi i raka jajnika (ang. *hereditary breast-ovarian cancer syndrome*; HBOC) oraz zespół Lyncha (ang. *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*; HNPCC) [176;177]. Wymienione jednostki odpowiadają za wystąpienie około 5-10% wszystkich nowotworów jajnika [178]. W genetycznie uwarunkowanych odmianach choroby, kluczowym czynnikiem jest stopień obciążenia rodzinnego, w odniesieniu do którego stwierdzono, że obciążenie rzędu 4-7% i 7-15% oznacza ryzyko wystąpienia nowotworu w przypadku posiadania, odpowiednio, jednego lub dwóch/więcej krewnych w pierwszym stopniu pokrewieństwa [178]. Analiza molekularna omawianych zaburzeń wykazała, że kluczowe do ich wystąpienia są dwa typy mutacji, tj. mutacje w genach *BRCA1* i *BRCA2*, obecne w około 90% przypadków HBOC i w 65-85% wszystkich form dziedzicznych oraz mutacje w co najmniej czterech genach naprawy niedopasowania, (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* i *PMS2*), obecne w 10-15% przypadków HNPCC [177].

1.7.4.4. Czynniki związane z dietą

Czynnikiem mogącym determinować częstość występowania raka jajnika jest także otyłość [179]. Związek między tymi dwoma patologiami potwierdzają analizy statystyczne, wskazujące na ponad dwukrotny wzrost częstości rozwoju raka jajnika w okresie przedmenopauzalnym u kobiet ze wskaźnikiem masy ciała (ang. *Body Mass Index*; *BMI*) powyżej 25 [180]. Z drugiej strony, regularna aktywność fizyczna okazała się wpływać ochronnie na ryzyko rozwoju nowotworu u kobiet w tej samej grupie wiekowej [181].

Wpływ odżywiania na rozwój raka jajnika może być także pochodną rodzaju przyjmowanych składników pokarmowych. Dane literaturowe mówią m.in. o negatywnym wpływie nadużywania tłuszczu nasyconych oraz galaktozy (u pacjentek z polimorfizmem enzymu urydylotransferazy galaktozo-1-fosforanowej) [182;183]. Promujący wpływ na rozwój nowotworu może mieć także spożywanie nadmiernej ilości jaj kurzych, mleka oraz czerwonego mięsa [184], a efekt ten jest utożsamiany z pobudzającym wpływem tych

produktów na wydzielanie hormonów gonadotropowych, mających zdolność stymulowania proliferacji oraz hamowania apoptozy w komórkach nabłonkowych jajnika [184]. Ponadto, istnieją doniesienia mówiące o niekorzystnym działaniu selenu, przyjmowanego szczególnie w postaci seleninu sodu, który powodował wzrost częstości występowania raka piersi i jajnika u pacjentek z mutacją genu *BRCA1* [185]. W kontekście działania prewencyjnego, na szczególną uwagę zasługuje natomiast stosowanie tłuszczu roślinnych, a w szczególności oliwy z oliwek [186].

1.7.5. Przerzuty raka jajnika

Kluczowym mechanizmem, prowadzącym do tworzenia przerzutów raka jajnika jest przemieszczanie się komórek rakowych drogą naczyń krwionośnych i limfatycznych do węzłów chłonnych oraz zasiedlanie mięszu tkanek odległych, w tym głównie płuc, wątroby oraz mózgu [187]. Szczególną cechą tego nowotworu jest jednocześnie zdolność komórek rakowych do zasiedlania jamy otrzewnej [187]. Wykazano, że w zaawansowanych stadiach choroby (faza III i IV), problem przerzutów do jamy otrzewnej dotyczy ok. 70% chorych, w tym w 46% przypadków przerzuty lokalizują się w obrębie sieci większej [188].

W trakcie inwazji jamy otrzewnej, komórki nowotworowe są zrzucane z powierzchni pierwotnego guza jajnika, a następnie niesione przez płyn otrzewnowy sedimentują na powierzchni komórek mezotelialnych. Po trwałym przyczepieniu się do powierzchni mezotelium (*adhezja*), komórki nowotworowe rozprzestrzeniają się na większej powierzchni (*migracja*), a następnie, dzięki zdolności do wydzielania proteaz infiltrują i remodelują zrąb otrzewnej (*inwazja*), umożliwiając namnażanie się komórek (*prolifercja*) w nowej dla nich lokalizacji [189;190]. W kontekście opisanej sekwencji zdarzeń nie budzi wątpliwości fakt, że wewnątrzotrzewnowa ekspansja raka jajnika wynika z szeregu wzajemnych interakcji pomiędzy komórkami nowotworowymi a prawidłowymi komórkami mezotelium otrzewnowego. Jednocześnie jednak, dokładna rola tych drugich w progresji raka jest przedmiotem trwającej dyskusji. W literaturze istnieją bowiem dwie przeciwstawne koncepcje, definiujące rolę, jaką komórki mezotelialne pełnią w początkowych fazach powstawania przerzutu nowotworu. Według pierwszej z nich, komórki te stanowią pierwszą linię obrony, swoistą barierę dla komórek rakowych, której penetracja umożliwia osiągnięcie przez nowotwór podścieliska tkankowego (w tym fibroblastów i białek ECM) i dalszą, nieograniczoną już niczym ekspansję [191]. Teoria ta bazuje na obserwacji Iwanickiego i wsp., którzy wykorzystując mikroskopową technikę obrazowania w czasie rzeczywistym

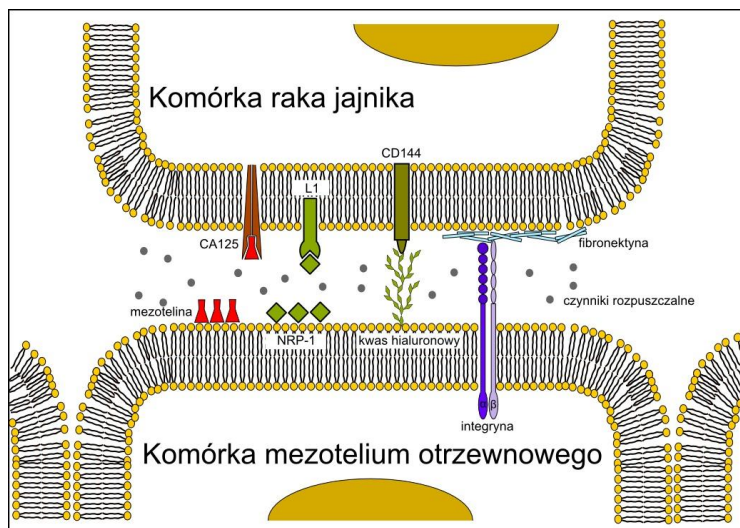
wykazali brak komórek mezotelialnych pod masą wykształconego guza, upatrując przyczyn tego zjawiska w zależnym od taliny 1 działaniu miozyny pochodzenia nowotworowego [190]. Innym sposobem retrakcji komórek mezotelialnych może być wywoływane przez komórki nowotworowe zachwianie struktury połączeń międzykomórkowych [192] lub apoptoza mezotelium, zależna od ligandu Fas (FasL) [193]. Elementem determinującym z kolei skuteczność transmezotelialnej wędrówki komórek nowotworowych może być stopień ekspresji na ich powierzchni integryn $\alpha 5\beta 1$ [194]. W następstwie przekroczenia przez komórki nowotworowe warstwy mezotelium następuje odsłonięcie zlokalizowanych głębiej fibroblastów oraz zwiększenie dostępności składników ECM, promujących rozwój guza. Za takim scenariuszem przemawiają badania Niedbały i wsp., którzy opisali, że komórki mezotelialne hamują adhezję komórek raka jajnika, podczas gdy fibroblasty otrzewnowe oraz białka ECM pobudzają ten proces [192].

Druga koncepcja, dotycząca udziału komórek mezotelialnych w rozwoju przerzutów raka jajnika stanowi, że komórki te są aktywnym elementem pobudzającym szereg wykładników inwazyjności komórek złośliwych. Bodajże najlepiej scharakteryzowany w tym kontekście jest wpływ mezotelium na adhezję komórek raka jajnika, który zależy od wzajemnych oddziaływań między cząsteczkami kwasu hialuronowego (HA) na powierzchni mezotelium a jego ligandem, CD44 na powierzchni komórek nowotworowych [195;196]. Ważność interakcji HA-CD44 potwierdziły badania przeprowadzone na modelu mysim, w przebiegu których zastosowanie specyficznych przeciwciał neutralizujących CD44 prowadziło do znaczącej redukcji liczby przerzutów w obrębie otrzewnej [197]. Oddziaływania między tymi cząsteczkami wpływają również na efektywność migracji komórek nowotworowych, co spowodowane jest aktywacją szlaku zależnego od kinazy tyrozynowej CSK, prowadzącego do ufosforylowania białka cytoszkieletu komórki, kortaktyny [198].

Prócz oddziaływań HA-CD44, adhezja komórek raka jajnika do mezotelium otrzewnowego regulowana jest także poprzez wiązanie się integryn $\alpha 5\beta 1$ pochodzenia nowotworowego z elementami ECM (fibronektyną, kolagenem, witronektyną) na powierzchni komórek prawidłowych [199-201]. Odrębny mechanizm obejmuje natomiast oddziaływania nowotworowych ligandów powierzchniowych CA125/MUC16 i L1 z ich mezotelialnymi receptorami, odpowiednio, mezoteliną i neuropiliną-1 (NRP-1) [202;203] (Rycina 5).

Dużą rolę w modulowaniu oddziaływań między komórkami mezotelium otrzewnowego a komórkami raka jajnika odgrywają także czynniki rozpuszczalne, wydzielane przez komórki

mezotelium do środowiska. Wśród nich można wymienić mediatory proliferacji (CXCL8/IL-8, IL-6 [204]), migracji (CXCL12/SDF-1 [205], HA [206]) i inwazyjności komórek nowotworowych (LPA [207]), jak również białka zaangażowane w przebudowę struktur ECM (PAI-1 [208], u-PA [209]) oraz zjawisko angiogenezy (VEGF [210]).



Rycina 5. Mediatory wzajemnych oddziaływań między komórkami raka jajnika a komórkami mezotelium otrzewnowego.

Bezpośrednich dowodów na pronowotworowe działanie czynników rozpuszczalnych pochodzenia mezotelialnego dostarczyły badania Rieppi i wsp., którzy zademonstrowali, że ekspozycja komórek raka jajnika na czynniki zawarte w mediach kondycjonowanych z hodowli komórek mezotelialnych prowadzi do wzrostu migracji i inwazyjności komórek rakowych [211].

1.7.6. Leczenie raka jajnika

Podstawową metodą leczenia kobiet z podejrzeniem raka jajnika jest zabieg chirurgiczny, ukierunkowany na cytoredukcję guza i pobranie materiału do oceny histopatologicznej [212]. Za stosowaniem tej formy terapii przemawia m.in. fakt, że zmniejszenie masy guza o każde 10% wydłuża przeżywalność pacjentek o 5,5% [213]. Co więcej, kobiety u których usunięto wszystkie widoczne ogniska choroby okazały się zdecydowanie lepiej reagować na wdrożone leczenie chemioterapeutyczne [214].

Podstawą właściwego postępowania chemioterapeutycznego jest natomiast dostosowanie wybranych leków do stopnia zaawansowania choroby. We wczesnych stadiach stosuje się

zazwyczaj 6 rund paklitakselu i pochodnych platyny [187]. W stadiach późniejszych zaleca się natomiast przeprowadzenie 6 kursów chemioterapii adjuwantowej. Popularnym algorytmem jest stosowanie co trzy tygodnie terapii dwulekowej, w skład której wchodzi karboplatyna i paklitaksel. W przypadku wystąpienia nadwrażliwości na paklitaksel, stosuje się docetaksel, topotekan, gemcytabinę lub pegylowaną lizosomalną doksorubicynę [212].

Najczęściej, leki podawane są dożylnie, przy czym coraz bardziej obiecujące wydają się wyniki testów terapii dootrzewnowej [215;216].

1.8. Ludzkie komórki mezotelium otrzewnowego

1.8.1. Budowa i funkcje biologiczne komórek mezotelialnych

Otrzewna stanowi cienką i gładką błonę surowiczą, wyściełającą wewnętrzną stronę jamy brzusznej i miednicy (otrzewna ścienna), która w części trzewnej przechodzi w warstwę pokrywającą narządy wewnętrzne (otrzewna trzewna). Składa się ona z tkanki łącznej włóknistej, zbudowanej głównie z fibroblastów, zawierającej liczne zakończenia nerwowe oraz naczynia krwionośne i limfatyczne, a także z pojedynczej warstwy komórek mezotelialnych (LKMO), stanowiących najliczniejszą grupę komórek w obrębie tej jamy ciała [217-219]. Morfologia komórek mezotelialnych jest zróżnicowana w zależności od miejsca ich występowania. Średnia wielkość komórek znajdujących się w otrzewnej ściennej, o charakterystycznym wydłużonym kształcie, wynosi 2,5-3 μm , natomiast w przypadku komórek o kształcie sześciennym, wchodzących w skład otrzewnej pokrywającej narządy wewnętrzne, wartość ta wynosi 12-15 μm [217]. W obrębie komórki wyróżnić można centralnie usytuowane jądro komórkowe, liczne mitochondria oraz lizosomy, a także siateczkę śródplazmatyczną i aparaty Golgiego. Na terenie cytoplazmy, znajdują się ponadto liczne włókna aktynowe, zbudowane z wimentyny, desminy oraz cytokeratyny [220]. Cechą charakterystyczną LKMO jest posiadanie mikrokosmków, których obecność, w przypadku otrzewnej trzewnej pozwala na zwiększenie powierzchni błony nawet 40-krotnie [221].

Podstawową funkcją komórek mezotelialnych jest funkcja ochronna, która wynika z ich zdolności do wydzielania szeregu fosfolipidów, które w wyniku oddziaływania z ujemnie naładowanymi mikrokosmkami tworzą gładką powierzchnię, warunkującą bezurazowe przesuwanie się narządów wewnętrznych względem siebie [219]. Ponadto, komórki te produkują i wydzielają do środowiska szereg czynników, regulujących takie zjawiska biologiczne, jak: reakcja zapalna (CCL2/MCP-1, ICAM-1, IL-1, IL-6, VCAM-1), angiogeneza (VEGF), synteza i przebudowa ECM (elastyna, fibronektyna, kolagen, CTGF,

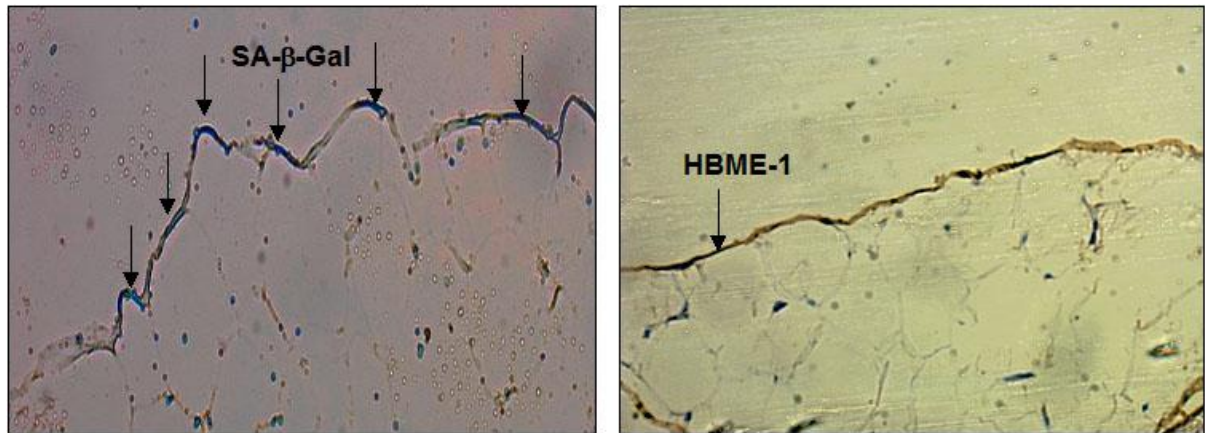
HA, MMP-1, -3, -9, TGF- β 1, TIMP-1, TIMP-2) oraz koagulacja i fibrynoliza (PAI-1, PAI-2, t-PA, u-PA). Poza funkcją wydzielniczą, komórki mezotelialne biorą również czynny udział w wymianie wody oraz substancji rozpuszczalnych pomiędzy jamą brzuszną i oplatającymi ją naczyniami krwionośnymi. W sposób szczegółowy, wszystkie wyżej wymienione funkcje komórek mezotelialnych, jak również działanie poszczególnych mediatorów tych procesów omówiono w pracach przeglądowych [218;219;222;223].

1.8.2. Starzenie się komórek mezotelium otrzewnowego

Charakterystyczną cechą LKMO są ich niewielkie możliwości proliferacyjne *in vitro* oraz niski (0,16-0,5%) indeks mitotyczny *in vivo* [223;224]. Fazę replikacyjnego starzenia w warunkach hodowlanych komórki te osiągają po przebyciu, przeciętnie, od 8 do 12 podwojeń populacji [225;226]. Starzenie LKMO przebiega w sposób niezależny od zmian długości telomerów [25], w mechanizmie mediowanym przede wszystkim działaniem białka p16^{Ink4A} [225]. Jako prawdopodobną przyczynę wczesnego wyczerpywania się aktywności proliferacyjnej LKMO uznaje się ich dużą wrażliwość na działanie środowiskowego stresu oksydacyjnego, którego efektem jest m.in. występowanie znaczącej frakcji komórek o fenotypowych oznakach starzenia w obrębie hodowli z wczesnych pasaży [226]. Odzwierciedleniem przedwczesnego starzenia się LKMO jest obecność w niemal połowie komórek młodych rozległych uszkodzeń DNA, głównie w formie pęknięć dwuniciowych, których zdecydowana większość jest zlokalizowana w nietelomerowych fragmentach genomu [25]. Duże znaczenie dla starzenia się LKMO ma także postępująca dysfunkcja mitochondriów, której przejawem jest obniżenie potencjału błony wewnętrznej oraz wzrost produkcji RFT [25]. Ochrona antyoksydacyjna komórek starych jest z kolei obniżona, czego dowodem jest spadek aktywności dysmutazy ponadtlenkowej oraz stężenia glutationu zredukowanego.

Gromadzące się w warunkach hodowlanych komórki stare posiadają zdolność indukcji programu starzenia w sąsiadujących z nimi komórkach proliferujących, także fibroblastach otrzewnowych, a głównym mediatorem tego procesu jest TGF- β 1, ulegający aktywacji dzięki aktywności trombospondyny-1 (TSP-1) [227]. Wspomniany TGF- β 1 jest także głównym mediatorem rozwoju szeregu fenotypowych oznak starzenia LKMO, w tym hipertrofii komórkowej oraz aktywności SA- β -Gal [228], a dużą rolę w tym zakresie odgrywa ścieżka sygnałowa związana z działaniem kinazy p38 MAPK [229]. TGF- β 1, którego produkcja znacząco rośnie w miarę starzenia się LKMO (podobnie jak aktywującej

go TSP-1 [227]) pozostaje w odwrotnej zależności z możliwościami proliferacyjnymi komórek *in vitro* oraz w dodatniej korelacji z kalendarzowym wiekiem ich dawcy [109].



Rycina 6. Gromadzenie się starych LKMO w sieci większej *in vivo*. Komórki cechujące się aktywnością SA-β-Gal oznaczono strzałkami (zdjęcie lewe). Wynik reakcji immunohistochemicznej w kierunku obecności antygenu HBME-1, będącego markerem komórek mezotelialnych (zdjęcie prawe) [230].

Powyższa prawidłowość sugeruje istnienie związku między replikacyjnym starzeniem się LKMO a chronologicznym starzeniem się organizmu jako całości, czego dowodem jest wzrost aktywności SA-β-Gal w preparatach tkankowych, pozyskanych z fragmentów sieci większej osób starszych (Rycina 6) [91].

2. CEL PRACY

Choć częstość występowania raka jajnika oraz skala wewnątrztrzewnowej inwazyjności tego nowotworu rosną wraz z wiekiem, znaczenie starzenia komórek mezotelialnych w tym zjawisku było jak dotąd nieznanne. Jednocześnie, gromadzenie się komórek mezotelialnych o cechach starzenia w jamie otrzewnej wraz z wiekiem *in vivo*, jak również pobudzający wpływ komórek starych na adhezję komórek raka jajnika *in vitro* mogą sugerować istnienie związku między starzeniem się mezotelium otrzewnowego a wzrostem progresji raka jajnika u osób starszych.

W związku z powyższym, celem niniejszej rozprawy było zbadanie wpływu starzenia się ludzkich komórek mezotelium otrzewnowego (LKMO) na podstawowe wykładniki progresji raka jajnika (linii A2780, OVCAR-3, SKOV-3) w modelu komórkowym i zwierzęcym. W ujęciu szczegółowym, przeprowadzone badania obejmowały:

- a) porównanie wpływu czynników rozpuszczalnych, wydzielanych do środowiska przez młode i stare LKMO na proliferację i migrację komórek nowotworowych,
- b) porównanie wpływu młodych i starych LKMO na proliferację i inwazyjność komórek nowotworowych, pod kątem roli bezpośrednich oddziaływań typu komórka prawidłowa-komórka nowotworowa,
- c) analizę ekspresji genów oraz właściwości wydzielniczych komórek nowotworowych, poddawanych działaniu czynników obecnych w medium, generowanym przez młode i stare LKMO,
- d) analizę ekspresji genów oraz właściwości wydzielniczych młodych i starych LKMO, w aspekcie zmian produkcji czynników, mogących być mediatorami progresji komórek nowotworowych,
- e) badania interwencyjne z użyciem egzogennych form potencjalnych mediatorów progresji raka jajnika oraz specyficznych przeciwciał neutralizujących, ukierunkowane na ocenę roli tych czynników w zależnym od starzenia się LKMO wzroście proliferacji i migracji komórek nowotworowych,
- f) ocenę wpływu starzenia się LKMO na dynamikę rozwoju, liczbę oraz średnicę guzów nowotworowych, rozwiniętych w jamie otrzewnej myszy doświadczalnych.

3. METODYKA BADAŃ

3.1. Materiały

Odczynniki chemiczne użyte w trakcie doświadczeń i analiz biochemicznych pochodziły z firmy Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, USA). Materiały zużywalne, wykorzystywane do prowadzenia hodowli komórkowych pochodziły z firm Becton Dickinson (Oxford, Wielka Brytania) oraz Nunc (Roskilde, Dania).

3.2. Hodowle komórkowe

3.2.1. Ludzkie komórki mezotelium otrzewnowego

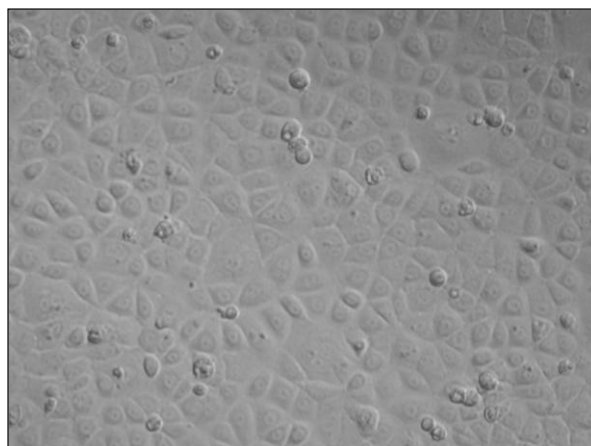
Badania przeprowadzono z wykorzystaniem pierwotnych hodowli ludzkich komórek mezotelium otrzewnowego (LKMO), które wyizolowano z pobranych śródoperacyjnie fragmentów sieci większej (Rycina 7), na co uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu (Uchwała nr 465/09 z dnia 6 maja 2009 roku oraz 754/13 z dnia 5 września 2013 roku). Przedział wiekowy pacjentów, od których pobierano tkanki wynosił od 23 do 40 lat. Wśród dawców tkanek, 44% stanowili mężczyźni, a 56% kobiety. Do najczęstszych wskazań operacyjnych, którym towarzyszyło usunięcie fragmentu sieci większej należały: przepuklina pępkowa i pachwinowa, tętniaki aorty, kamica żółciowa oraz zrosty otrzewnej. Po pobraniu, fragmenty tkanek umieszczano w płynie Hanksa (ang. *Hank's Balanced Salt Solution; HBSS*) i tak zabezpieczoną próbkę transportowano niezwłocznie do laboratorium.



Rycina 7. Przykładowy, pobrany śródoperacyjnie, fragment sieci większej, z którego izolowano komórki mezotelialne wykorzystane w trakcie doświadczeń.

Izolacja LKMO z tkanki została przeprowadzona zgodnie z metodologią opisaną przez Van Bronswijka i wsp., polegającą na enzymatycznej degradacji wycinka tkanki za pomocą roztworu trypsyny (0,05%) i EDTA (0,02%) w roztworze HBSS, przez 20 minut w temperaturze 37°C, z wytrząsaniem [231]. Po izolacji komórki odwirowano z prędkością 2000 obrotów/minutę, przez 10 minut, w temperaturze pokojowej, a następnie zawieszano w dedykowanym medium wzrostowym M199, wzbogaconym w 10% surowicę bydlęcą (FBS, Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein, RFN), L-glutaminę (2mM), penicylinę (100 U/ml), streptomycynę (100 µg/ml) i hydrokortyzon (0,4 µg/ml).

Tak przygotowaną zawiesinę komórkową przenoszono do naczyń hodowlanych o powierzchni 25 cm² i umieszczano w inkubatorze, w temperaturze 37 °C, w nawilżanym środowisku z dodatkiem 5% CO₂. Wymiany medium hodowlanego na świeże dokonywano w odstępach trzydniowych. Po uzyskaniu przez hodowlę pierwotną 80-90% zlewności, komórki rozsiewano do nowych naczyń, celem przeprowadzenia dalszych eksperymentów.



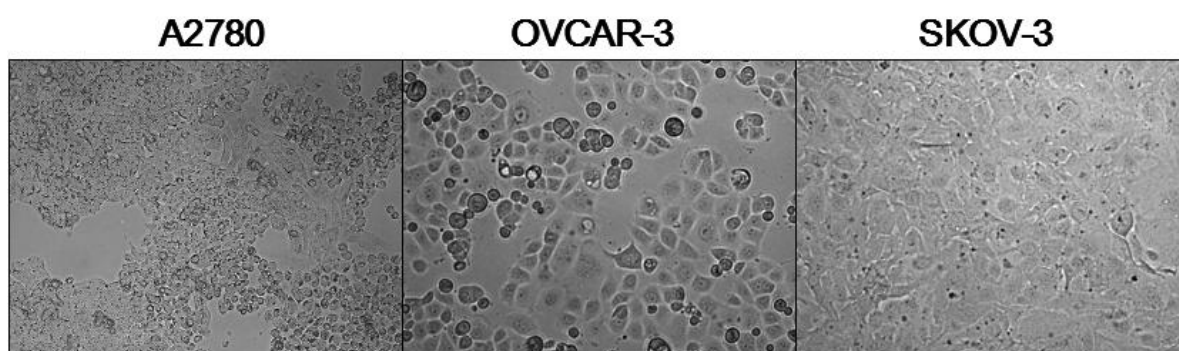
Rycina 8. Morfologia reprezentatywnej hodowli młodych LKMO w stadium pełnej zlewności (powiększenie 200x).

Komórki mezotelialne identyfikowano na podstawie cech morfologicznych (kształt „kostki brukowej” komórek w fazie konfluencji [232]) (Rycina 8), a także za pomocą reakcji immunocytochemicznej, potwierdzającej obecność antygenu HBME-1 (ang. *Hector Battifora Mesothelial Antigen-1*), obecnego w mikrokosmkach błony komórek mezotelialnych. Do oceny obecności antygenu HBME-1, komórki utrwalono w roztworze formaldehydu (3%), a następnie, po zablokowaniu aktywności endogennych peroksydaz za pomocą roztworu nadtlenu wodoru (0,3%), inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej wraz z mysim przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko HBME-1

(Dako, Glostrup, Dania). Przeciwciała rozcieńczono 1:25 w roztworze Tris-HCl (0,05 M) pH 7,6 z dodatkiem 3% FBS. Po dokładnym wypłukaniu preparatu roztworem PBS, komórki inkubowano z przeciwciałami wyznakowanymi peroksydazą chrzanową i skierowanymi przeciwko mysiej IgG (Dako EnVision™ system), przez 30 minut w temperaturze 37 °C. Po wypłukaniu drugiego przeciwciała, komórki inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej z roztworem 3,3'-diaminobenzzydyny (DAB) (0,06 mM) i nadtlenu wodoru (2 mM), po czym zakleiono wodnym medium mocującym (Dako). Komórki wykazujące obecność antygeny HBME-1 rozpoznawano na podstawie ich powierzchniowego wybarwienia na kolor brązowy. Jako kontrolę ujemną wykorzystano komórki śródbłonna naczyniowego linii HMEC-1 (Klinika im. Virchowa Uniwersytetu Humboldta, Berlin, RFN).

3.2.2. Komórki raka jajnika

Badania *in vitro* oraz *in vivo* przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych linii komórek raka jajnika A2780, OVCAR-3 i SKOV-3. Komórki A2780 oraz SKOV-3 zakupiono w European Collection of Cell Cultures (ECACC, Porton Down, Wielka Brytania), natomiast komórki OVCAR-3 w American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA).



Rycina 9. Reprezentatywne zdjęcia przedstawiające morfologię komórek raka jajnika, wykorzystanych w doświadczeniach. Komórki wykazują znaczące różnice w wielkości, tempie i sposobie wzrostu. Najmniejszymi rozmiarami, a zarazem najwyższym tempem wzrostu cechują się komórki linii A2780. Komórki OVCAR-3, w przeciwieństwie do dwóch pozostałych typów, przez najdłuższy okres pozostają w formie groniastych kolonii, które stopniowo łączą się ze sobą tworząc monowarstwę. Tempo wzrostu tej grupy komórek jest najniższe. Komórki SKOV-3, podobnie jak A2780 nie wzrastają w sposób klonalny, a tempo ich proliferacji jest nieco wyższe niż komórek OVCAR-3 (powiększenie 200x).

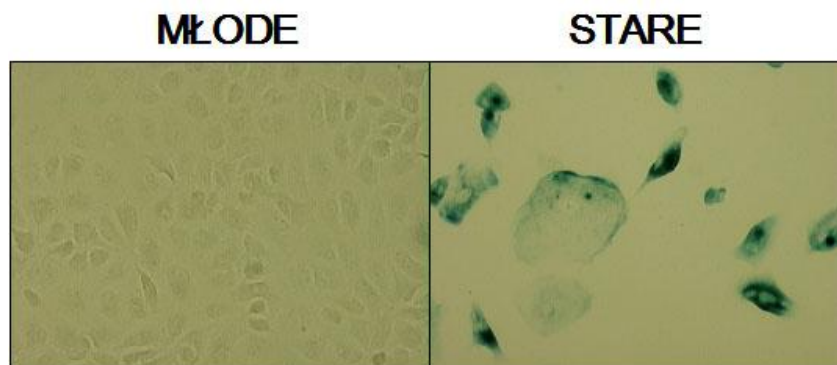
Hodowlę komórek A2780 i SKOV-3 prowadzono w obecności medium RPMI 1640, wzbogaconego w 10% FBS (Gibco) oraz antybiotyki (100 U/ml penicyliny, 100 g/ml streptomycyny). Komórki OVCAR-3 hodowano natomiast w medium RPMI 1640 z dodatkiem 20% FBS, antybiotyków (100 U/ml penicyliny, 100 g/ml streptomycyny), glukozy (4500 mg/L) i insuliny (0,01 mg/ml). Komórki nowotworowe utrzymywano w naczyniach hodowlanych o powierzchni 75 cm², w temperaturze 37 °C, w nawilżanym środowisku o 5% zawartości CO₂. Wymiana medium przeprowadzana była w trzydniowych odstępach czasu. Procedury pasażu dokonywano po uzyskaniu przez komórki 80-90% zlewności.

Tabela 3. Specyfikacja komórek raka jajnika wykorzystanych do badań. b.d. – brak danych od depozytora komórek. Symbolem * oznaczono rozbieżne dane literaturowe dotyczące oporności i wrażliwości komórek raka jajnika na dany lek.

| charakterystyka linii komórkowej | A2780 | OVCAR-3 | SKOV-3 |
|-----------------------------------|---|--|--|
| źródło pozyskania komórek | płyn puchlinowy | płyn puchlinowy | płyn puchlinowy |
| wiek pacjentki | b.d. | 60 | 64 |
| typ nowotworu | gruczolakorak | gruczolakorak | gruczolakorak |
| stosowanie chemioterapii | nie | tak | b.d. |
| stosowany lek | - | cyklofosfamid, cisplatyna, doksorubicyna | b.d. |
| lekooporność komórek | doksorubicyna [233] | cisplatyna [234], doksorubicyna [234] | cisplatyna [235], doksorubicyna [236] |
| lekowrażliwość komórek | cisplatyna [236;237], doksorubicyna [238]* | cisplatyna [235]*, doksorubicyna [239]* | doksorubicyna [240]* |
| depozytor | T.H. Ward; Cell Culture Unit, Patterson Laboratories, Christie Hospital, Manchester, UK | R. Ozols, TC Hamilton; Medicine Branch, Division of Cancer Treatment, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, USA | G. Trempe, LJ Old; Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, USA |
| rok pozyskania | 1984 | 1982 | 1973 |
| pierwsze doniesienia literaturowe | [241] | [234] | [242;243] |

3.3. Wywoływanie replikacyjnego starzenia się LKMO

Po osiągnięciu przez pierwotną hodowlę LKMO stadium 80-90% zlewności, komórki złączano przy pomocy roztworu trypsyny (0,05%) z dodatkiem EDTA (0,02%). Po krótkim okresie inkubacji, prowadzonej pod kontrolą wzroku, trypsynę neutralizowano podwójną objętością pełnego medium hodowlanego oraz odwirowywano z prędkością 2000 obrotów/minutę, przez 10 minut, w temperaturze pokojowej. Komórki następnie zawieszano w świeżej porcji pożywki, liczone w komorze hematologicznej oraz posiewano w gęstości 3×10^4 komórek/cm² na butelkę o powierzchni 25 cm². Hodowle pasażowano następnie w 7-dniowych odstępach czasu, aż do momentu, gdy komórki wyczerpały swe zdolności do podziałów. Podczas każdego pasażu komórki liczone w komorze hematologicznej celem określenia liczby przeżytych przez nie podziałów [225]. Wejście hodowli w stadium replikacyjnego starzenia potwierdzano na podstawie braku zdolności komórek do zwiększenia liczby w okresie 4 tygodni, hipertrofii komórek oraz dodatniego wybarwienia co najmniej 80% hodowli na obecność SA-β-Gal (Rycina 10) [244].



Rycina 10. Reprezentatywne zdjęcia hodowli młodych i starych LKMO. Hodowle stare cechują się zmniejszeniem gęstości komórek, zwiększeniem ich rozmiarów oraz deformacją kształtu. Większość komórek starych cechuje się także dodatnim wynikiem barwienia w kierunku aktywności SA-β-Gal (zielony precypitat w obrębie cytoplazmy). Powiększenie 400x.

3.4. Zbiórka medium kondycjonowanego

Celem pozyskania medium kondycjonowanego (MK) z hodowli komórek mezotelialnych, na 72 godziny przed planowanym pasażem hodowli, komórki starannie płukano HBSS, a następnie podawano im ustaloną objętość standardowego medium wzrostowego bez surowicy. W trakcie pasażu pobierano próbki medium, które przefiltrowywano za pomocą

filtrów strzykawkowych o średnicy porów 0,2 μm . Do czasu wykorzystania, próbki medium przechowywano w temperaturze $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. W trakcie pasażu, komórki liczono w komorze hematologicznej, aby uzyskać informację, jaka liczba komórek generowała rozpuszczalne czynniki, obecne w pozyskanym medium.

3.5. Ocena proliferacji komórek nowotworowych

Proliferację komórek nowotworowych badano z wykorzystaniem trzech metod, w zależności od testowanego kontekstu eksperymentalnego. W badaniach wpływu MK, wykorzystano metodę radioizotopową, pozwalającą na określenie efektywności replikacji DNA w komórkach oraz metodę cytometrii przepływowej, po wyznakowaniu komórek jodkiem propidyny (PI), celem określenia dystrybucji komórek w poszczególnych fazach cyklu podziałowego. Z kolei w doświadczeniach poświęconych analizie wpływu bezpośrednich oddziaływań typu komórka prawidłowa-komórka nowotworowa, proliferację tych drugich oceniono metodą fluorescencyjną po ich uprzedniej transfekcji plazmidem dla białka zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescent protein*; *GFP*).

3.5.1. Ocena syntezy DNA w komórkach metodą radioizotopową

Komórki raka jajnika posiewano w płytkach 48-studzienkowych, w gęstości $1,5 \times 10^4$ komórek/ cm^2 , a następnie inkubowano przez 24 godziny w temperaturze $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, w nawilżanym środowisku zawierającym 5% CO_2 . Po tym czasie, komórki eksponowano przez 72 godziny na działanie medium kondycjonowanego (MK) zebranego z hodowli młodych i starych LKMO, znakowanego [^3H]-tymidyną (jako metyl- ^3H -tymidyna; 1 $\mu\text{Ci/ml}$; Institute of Radioisotopes, Praga, Republika Czeska). Efektywność syntezy DNA oceniano na podstawie stopnia wbudowywania [^3H]-tymidyny do DNA komórek dzielących się. Po okresie inkubacji, komórki złuszczano za pomocą roztworu trypsyny (0.05%) i EDTA (0.02%). Następnie, dokonywano wytrącenia białka komórkowego kwasem trójchlorooctowym (20%) (Fluka, Buchs, Szwajcaria). Uzyskany w ten sposób precypitat rozpuszczano w NaOH (0.1 N), a uwolnioną radioaktywność mierzono po dodaniu płynu scyntylicyjnego w liczniku scyntylicyjnym Wallac (Perkin-Elmer, Warszawa, Polska). Wyniki wyrażono jako liczbę impulsów przypadającą na 1 minutę pomiaru (ang. *counts per minute*; *CPM*).

3.5.2. Ocena dystrybucji w cyklu komórkowym metodą cytometrii przepływowej

W trakcie pasażu, komórki nowotworowe złuszczano przy pomocy roztworu trypsyny (0,05%) i EDTA (0,02%), liczone w komorze hematologicznej, a następnie 1×10^6 komórek zawieszono w roztworze PBS i utrwalano w lodowatym etanolu (70%). Utrwalone komórki odwirowywano, płukano PBS, a następnie zawieszano w roztworze cytrynianu sodu (0,1 M) pH 7,8 przez okres jednej minuty. Po tym czasie, komórki ponownie płukano w roztworze PBS i inkubowano przez 30 minut w roztworze jodku propidyny (PI) (5 mg/ml) (Molecular Probes, Leiden, Holandia) i rybonukleaz (0,1 mg/ml) w PBS. Analizy dystrybucji komórek w cyklu komórkowym dokonano za pomocą cytometru przepływowego FACS Calibur™ (Becton-Dickinson, Plymouth, UK) wyposażonego w program ModFit LT™ (Verity Software House, Topsham, ME, USA).

3.5.3. Ocena fluorescencji GFP

Transfekcję komórek nowotworowych plazmidem dla GFP poprzedzono oceną mikroskopową morfologii komórek oraz stopniem ich zagęszczenia. Do procedury kwalifikowano hodowle, które osiągnęły 80-95% konfluencji. Do 1,5 ml probówek dodawano 2,5 µg plazmidu pEGFP-N3 (Clontech, CA, USA), 2,5 µl odczynnika PLUS™ Reagent (Invitrogen, Carlsband, CA, USA) oraz uzupełniano do objętości 250 µl pożywką Opti-MEM, zawierającą Hapes, hipoksantynę, tymidynę, pirogronian sodu, L-glutaminę (Life-Technologies, Eggenstein, RFN). W oddzielnych probówkach, do 250 µl Opti-MEM dodawano 8 µl lipofektaminy 2000 LTX (Invitrogen). Wszystkie próby następnie inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Bezpośrednio przed przystąpieniem do transfekcji komórki przemywano HBSS, następnie dodawano 2 ml pożywki dedykowanej dla danej linii komórkowej bez surowicy. W dalszej kolejności, roztwór zawierający plazmidowy DNA przenoszono do probówki z lipofektaminą, a uzyskaną mieszaninę podawano kroplami do hodowli komórek i inkubowano przez 24 godziny w 37 °C. Po tym czasie medium zawierające mieszaninę transfekcyjną wymieniano na świeże z pełną suplementacją, a efektywność transfekcji weryfikowano na podstawie ilości komórek wykazujących zieloną fluorescencję, przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego Zeiss Axio Observer D1 (Carl Zeiss, Jena, RFN).

Badanie właściwe przeprowadzono w 96-studzienkowych płytkach hodowlanych, w których posiano młode (1×10^5 komórek/studzienkę) i stare (3×10^4 komórek/studzienkę) LKMO. Wskazane gęstości komórek zapewniały osiągnięcie spójnej monowarstwy po 24

godzinach inkubacji. Po tym czasie, pożywkę usuwano, komórki płukano PBS, a do studzienek podawano na dobę medium wzrostowe dla LKMO bez surowicy. Następnie, do tak przygotowanych studzienek podawano stransfekowane komórki raka jajnika w liczbie 1×10^4 na 72 godziny, w temperaturze 37°C . Po upływie tego czasu, dokonano odczytu fluorescencji, generowanej przez komórki nowotworowe za pomocą spektrofluorymetru Wallac Victor 2 (Perkin-Elmer, Massachusetts, USA), przy długości fali wzbudzenia 435 nm i emisji 535 nm. Jednocześnie, wizualizacji zmian proliferacji komórek nowotworowych dokonano z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego Zeiss Axio Observer D1.

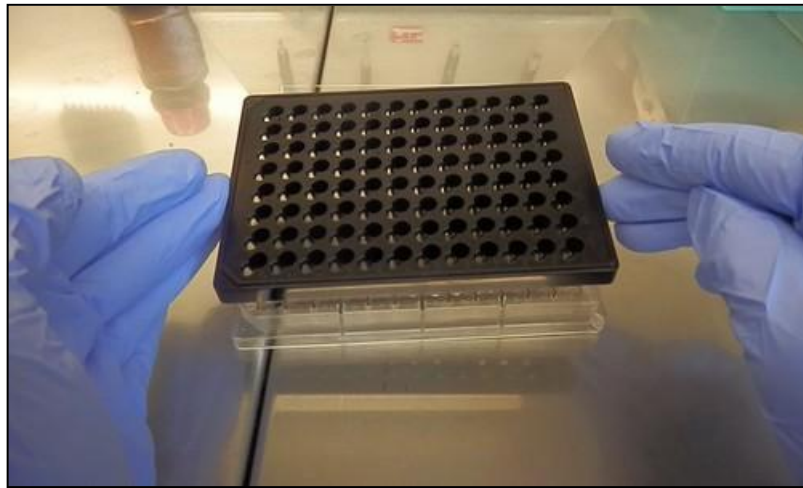
3.6. Ocena migracji komórek nowotworowych

Migracja komórek nowotworowych w kierunku czynnika chemotaktycznego, tj. medium kondycjonowanego pochodzącego z młodych i starych LKMO została zbadana za pomocą systemu komór Transwell (Costar Inc., NY, USA), wyposażonych w membrany poliwęglanowe o średnicy porów $8,0 \mu\text{m}$. Tworząc system migracyjny, komórki raka jajnika wyznakowane kalceiną-AM ($5 \mu\text{M}$) posiewano w liczbie $2,5 \times 10^4$, w medium bez surowicy do górnej komory zestawu, natomiast próbki medium kondycjonowanego dodawano do części dolnej. Ocenę migracji prowadzono w czasie 72 godzin, w temperaturze 37°C . Komórki, które po upływie tego czasu nie przemigrowały usuwano z górnej komory za pomocą bibuły. Odczytu fluorescencji komórek, które przeszły do dolnej części zestawu dokonywano za pomocą spektrofluorymetru Wallac Victor 2, przy długości fali wzbudzenia 485 nm i emisji 535 nm.

3.7. Ocena inwazyjności komórek nowotworowych

Do oceny inwazyjności komórek raka jajnika wykorzystano zestawy BioCoatTM Tumor Invasion System (Becton Dickinson) w systemie 96-studzienkowym (Rycina 11). W skład zestawu, prócz płytki mikrotitracyjnej stanowiącej miejsce podania chemoatraktanta, wchodziły inserty zbudowane z porowatej membrany o średnicy porów $8,0 \mu\text{m}$ pokryte warstwą białek macierzy pozakomórkowej, Matrigel®. Na 24 godziny przed planowaną analizą, na uprzednio uwodnioną membranę, wysiewano młode (1×10^5 komórek/studzienkę) i stare (3×10^4 komórek/studzienkę) LKMO, uzyskując spójną monowarstwę komórek po 24 godzinach inkubacji. Po tym czasie, pożywkę usuwano znad membrany, aplikując na nią następnie 25 μl zawiesiny, zawierającej $1,25 \times 10^4$ komórek nowotworowych, wyznakowanych kalceiną-AM ($5 \mu\text{M}$). Pomiaru inwazyjności komórek nowotworowych

dokonywano na podstawie oceny efektywności ich przechodzenia przez monowarstwę młodych lub starych LKMO oraz Matrigel® w czasie 24 godzin. Wędrówkę komórek stymulowano działaniem czynnika chemotaktycznego w postaci pełnego medium wzrostowego dla danej linii komórek nowotworowych. Po zakończeniu inkubacji, zawiesinę komórek, które nie pokonały warstwy mezotelialnej i Matrigelu® usuwano, po czym dokonywano odczytu fluorescencji komórek, które przeszły do dolnej części zestawu za pomocą spektrofлуorymetru Wallac Victor 2, przy długości fali wzbudzenia 485 nm i emisji 535 nm.



Rycina 11. Zestaw wykorzystany do badań inwazyjności komórek raka jajnika przez monowarstwę utworzoną przez młode lub stare LKMO oraz Matrigel®. Czarna część zestawu zawiera studzienki pokryte Matrigelem®, do których wysiewane są komórki mezotelialne. Do znajdującej się pod nią płytki mikrotitracyjnej dodawane są media wzrostowe z surowicą, wykorzystane do zastymulowania ruchu komórek nowotworowych.

3.8. Ocena ekspresji genów

3.8.1. Badania globalnej ekspresji genów metodą mikromacierzy

W trakcie pasażu pobrano 5×10^5 komórek, które następnie lizowano w 1 ml RNA Isolator™ (Genosys Biotechnologies, Cambridge, Wielka Brytania). Uzyskany lizat przechowywano do momentu oznaczenia w temperaturze -80°C . Ekstrakcji RNA dokonano za pomocą chloroformu i wytrącano je izopropanolem. Po odrzuceniu frakcji zawierających białko i DNA, RNA płukano w roztworze etanolu (75%) i rozpuszczano w wodzie. Stężenie uzyskanego RNA oceniono na podstawie pomiaru gęstości optycznej przy długościach fali

260 nm i 280 nm, przy użyciu spektrofotometru Helios β (UNICAM, Cambridge, Wielka Brytania). Integralność otrzymanego RNA potwierdzono elektroforezą 0,5 μ g RNA w 2% żelu agarozowym (Gibco BRL), w której stwierdzono obecność dwóch frakcji rozdzielonego RNA. Wyekstrahowany RNA denaturowano poprzez 3-minutową inkubację w temperaturze 95 °C. Odwrotną transkrypcję wykonano w oparciu o metodę „losowo dobranych starterów” w całkowitej objętości 20 μ l, na którą składały się: 1 μ l mieszaniny nukleotydów w postaci heksamerów (pd[N]₆, 100 μ M; Amersham Pharmacia Biotech), 5 μ l mieszaniny dezoksyrybonukleotydów (dNTP, 2,5 mM; Gibco BRL), 2 μ l 10 x stężonego buforu PCR o składzie: Tris-HCl (100 mM), KCl (500 mM), MgCl₂ (15 mM), żelatyna (0,01%) (Perkin Elmer, Beaconsfield, Wielka Brytania), 2 μ l ditiotreitolu (0,1 M; Gibco BRL), 1 μ l inhibitora rybonukleaz (20 U, rRNasin[®]; Promega, Madison, WI, USA), 1 μ l odwrotnej transkryptazy (200 U, M-MLVTM Superscript; Gibco BRL) oraz 1 μ g RNA w H₂O. Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono przez 10 minut w temperaturze 22°C, a następnie przez 40 minut w temperaturze 42°C. Reakcję zakończono poprzez 5-minutową inkubację w temperaturze 95°C. Otrzymany komplementarny DNA (cDNA) przekazywano do IFZ BioChip-Labor (Universitätsklinikum, Essen, RFN), gdzie próbki poddawano amplifikacji, hybrydyzacji i skanowaniu w oparciu o platformę mikromacierzy Affymetrix HG-U133A (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), zgodnie z wytycznymi producenta. Obróbki uzyskanych danych dokonano za pomocą oprogramowania Microarray Suite v.5.0 (Affymetrix).

3.8.2. Badania ekspresji genów ilościową metodą PCR

Ilościową reakcję PCR w czasie rzeczywistym (ang. *quantitative real-time PCR*; *qRT-PCR*) przeprowadzono z wykorzystaniem próbek cDNA, uzyskanych zgodnie z metodologią opisaną powyżej. Właściwą analizę wykonano w oparciu o system kart mikrocieczowych, umożliwiających zwielokrotnienie prowadzonych jednocześnie reakcji polimerazowych. W skład kart wchodziły pogrupowane w sektory liofilizowane startery (Assays-on-Demand, Applied Biosystems, Hong Kong) i sondy. Do każdego sektora wprowadzono mieszaninę reakcyjną, w skład której wchodziły: cDNA oraz odczynnik TaqMan Universal PCR Master Mix[®] (Applied Biosystems). Po aplikacji próbek, karty mikrocieczowe były dwukrotnie wirowane w temperaturze pokojowej, przy 2000 obrotów/minutę, przez 2 minuty, po czym studzienki reakcyjne zamykano w dedykowanym dla tej czynności aparacie firmy Applied Biosystems. Analiza obejmowała etap aktywacji AmpEraseUNG (składnika TaqMan Universal PCR Master Mix[®]) przez 2 minuty w 50°C, aktywację polimerazy AmpliTaq Gold

przez 10 minut w 94,5°C oraz 40 cykli reakcji PCR, w skład których wchodziły każdorazowo: etap denaturacji dwuniciowego cDNA trwający 30 sekund w 97°C oraz przyłączanie i wydłużanie starterów, trwające 1 minutę w 59,7°C. Reakcję polimerazową wykonano z wykorzystaniem cyklera 7900HT (Applied Biosystems). Uzyskane wyniki standaryzowano w odniesieniu do genu referencyjnego, GAPDH.

Tabela 4. Geny, których ekspresję oceniono za pomocą ilościowej reakcji PCR.

| Nazwa genu | Numer akcesyjny genu | Numer referencyjny zestawu starterów i sond |
|-----------------------|-----------------------------|--|
| angiopoetyna-1 | NM_001146.3 | Hs00375822m1 |
| CCL2/MCP-1 | NM_002982.3 | Hs00234140m1 |
| CXCL1/GRO-1 | NM_001511.3 | Hs00236937m1 |
| CXCL5 | NM_002994.4 | Hs01099660g1 |
| CXCL8/IL-8 | NM_000584.3 | Hs00174103m1 |
| CTGF | NM_001901.2 | Hs01026927g1 |
| FGF2 | NM_002006.4 | Hs00266645m1 |
| fibronektyna | NM_212474.1 | Hs00365052m1 |
| HGF | NM_001010931.1 | Hs00300159m1 |
| ICAM-1 | NM_000201.2 | Hs00164932m1 |
| IL-6 | NM_000600.3 | Hs00985641m1 |
| kolagen I | NM_000089.3 | Hs01028971m1 |
| kolagen XII | NM_004370.5 | Hs01054134m1 |
| MMP-3 | NM_002422.3 | Hs00968305m1 |
| MMP-12 | NM_002426.4 | Hs00899669m1 |
| PAI-1 | NM_000602.4 | Hs01126606m1 |
| TIMP-1 | NM_003254.2 | Hs00171558m1 |

| | | |
|--------------------------------|----------------|--------------|
| TGF-α | NM_001099691.2 | Hs00608187m1 |
| TGF-β | NM_000660.4 | Hs00998133m1 |
| TSP-1 | NM_003246.2 | Hs00962908m1 |
| u-PA | NM_001145031.1 | Hs01547054m1 |
| witronektyna | NM_000638.3 | Hs00940758g1 |
| VEGF | NM_001025366.2 | Hs00900055m1 |

3.9. Ocena właściwości wydzielniczych komórek nowotworowych

W celu dokonania oceny wpływu medium kondycjonowanego z hodowli młodych i starych LKMO na profil wydzielniczy komórek raka jajnika, komórki nowotworowe posiewano w 24-studzienkowych płytkach hodowlanych i inkubowano, aż do osiągnięcia fazy 80-90% zlewności. Po osiągnięciu właściwego zagęszczenia hodowli, pożywkę usuwano, komórki przemywano HBSS, a następnie inkubowano przez 24 godziny w obecności medium wzrostowego pozbawionego surowicy. Po tym czasie, komórki ponownie przemywano, a następnie poddawano 24-godzinnej ekspozycji na medium kondycjonowane pochodzenia mezotelialnego. Po inkubacji, uzyskane supernatanty zbierano do jałowych probówek, a następnie zamrażano w temperaturze $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do momentu wykorzystania. W następnej kolejności, komórki złuszczano za pomocą roztworu trypsyny-EDTA, a następnie liczone w komorze hematologicznej, celem uzyskania informacji, jaka liczba komórek generowała rozpuszczalne czynniki, obecne w pozyskanym medium.

3.10. Badania immunoenzymatyczne

Oceny stężenia czynników, wydzielonych do medium kondycjonowanego przez młode i stare LKMO, jak również stężenia czynników wydzielonych przez komórki nowotworowe dokonano za pomocą metody immunoenzymatycznej ELISA, z użyciem zestawów DuoSet ELISA Development Kit (R&D Systems Inc, Minnesota, USA). Analizę prowadzono w 96-studzienkowych płytkach typu MaxiSorp (Nunc), które opłaszczano specyficznym przeciwciałem „wychytującym”, zawieszonym w PBS, na 24 godziny w temperaturze pokojowej. Po inkubacji, płytkę płukano czterokrotnie buforem płuczającym, który stanowił roztwór Tween 20 (0,05%) w PBS. Pozostałe na płytce miejsca wiążące blokowano

roztworem Roti[®]-Block (10%) (Carl Roth, Karlsruhe, RFN) przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie, po czterokrotnym wypłukaniu płytki, do studzienek podawano ustaloną objętość próbek oraz szereg wzorców o znanych stężeniach. Tak przygotowaną płytkę inkubowano przez noc w temperaturze 4 °C. Po tym czasie, studzienki płukano, a następnie dodawano do nich specyficzne przeciwciała detekcyjne, wyznakowane biotyną i zawieszono w roztworze zawierającym albuminę bydlęcą (0,1 %), Tween 20 (0,05 %), NaCl (150 mM), Tris (20 mM), pH 7,3 (bufor rozcieńczający).

Tabela 5. Charakterystyka przeciwciał wykorzystanych w metodzie ELISA.

| czynnik | I przeciwciało | | II przeciwciało | | krzywa wzorcowa |
|--------------------|---------------------------|--------------|---------------------------|--------------|----------------------|
| | rodzaj | stężenie | rodzaj | stężenie | |
| CCL2/MCP-1 | mysie anty-CCL2/MCP-1 | 1 µg/ml | kozy anty- CCL2/MCP-1 | 50 ng/ml | 15,6 - 1000 pg/ml |
| CXCL1/GRO-1 | mysie anty-CXCL1/GRO-1 | 4 µg/ml | kozy anty- CXCL1/GRO-1 | 40 ng/ml | 31,25-2000 pg/ml |
| CXCL8/IL-8 | mysie anty-CXCL8/IL-8 | 4 µg/ml | kozy anty- CXCL8/IL-8 | 20 ng/ml | 31,25-2000 pg/ml |
| HGF | mysie anty-HGF | 1 µg/ml | kozy anty-HGF | 200 ng/ml | 125-8000 pg/ml |
| IL-6 | mysie anty-IL-6 | 1 µg/ml | kozy anty-IL-6 | 25 ng/ml | 15.6-1000 pg/ml |
| MMP-3 | kozy anty-MMP-3 | 0,8 µg/ml | kozy anty-MMP-3 | 150 ng/ml | 31,25-2000 pg/ml |
| PAI-1 | mysie anty-PAI-1 | 4 µg/ml | kozy anty-PAI-1 | 400 ng/ml | 0,312 - 20 ng/ml |
| sICAM-1 | mysie anty-ICAM-1 | 4 µg/ml | owcze anty-ICAM-1 | 100 ng/ml | 31,25-2000 pg/ml |
| TGF-β1 | mysie anty-TGF-β1 | 2 µg/ml | kurze anty-TGF-β1 | 300 ng/ml | 31,25-2000 pg/ml |
| TSP-1 | mysie anty-TSP-1 | 1 µg/ml | kozy anty-TSP-1 | 200 ng/ml | 1,56 - 100 ng/mL |
| u-PA | mysie anty-u-PA | 1 µg/ml | kozy anty-u-PA | 400 ng/ml | 62,5 - 4000 pg/ml |
| VEGF | mysie anty-VEGF | 1 µg/ml | kozy anty-VEGF | 100 ng/ml | 31,25-2000 pg/ml |

Po 2 godzinach inkubacji w temperaturze pokojowej i czterokrotnym wypłukaniu studzienek, dodawano do nich na 30 minut konjugat streptawidyny i peroksydazy chrzanowej (HRP) (ICN Biochemicals, Cleveland, OH, USA), rozcieńczony 1:10000 w roztworze rozcieńczającym. Po kolejnym, starannym wypłukaniu studzienek, reakcję barwną

inicjowano przez podanie stabilizowanego roztworu 3,3',5,5'-tetrametylobenzydyny (TMB) i nadtlenu wodoru (H₂O₂). Po około 20 minutach przechowywania płytki w ciemności, rozwijającą się reakcję barwną zatrzymywano za pomocą roztworu H₂SO₄ (2 N). Pomiaru gęstości optycznej dokonywano w mikroczytniku EL_X808TM (BioTek, Winooski, VT, USA) przy długości fali 450 nm, stosując jako referencyjną falę o długości 540 nm. Stężenia badanych substancji zostały automatycznie wyliczone z krzywej wzorcowej.

3.10.1. Oznaczanie stężenia fibronektyny

Stężenie fibronektyny oznaczono za pomocą zestawu Fibronectin Human ELISA Kit, zakupionego w firmie Abcam (Cambridge, Wielka Brytania). W toku analizy, do studzienek opłaszczonych przez producenta przeciwciałem wychwytyjącym fibronektynę, podano wzorce białka w ustalonych stężeniach (w zakresie od 4 ng/ml do 1000 ng/ml) oraz badane próbki. Po 120 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej, studzienki płukano pięciokrotnie dostarczonym w zestawie buforem płuczającym, po czym dodano biotynylowane przeciwciało detekcyjne na 60 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie, studzienki ponownie pięciokrotnie płukano, a następnie aplikowano do nich konjugat streptawidyna-HRP na 30 minut w temperaturze pokojowej. Po inkubacji, płytki płukano pięć razy buforem płuczającym, a następnie podawano do studzienek roztwór substratu barwnego na około 10-15 minut. Rozwijającą się reakcję barwną zatrzymywano przez dodanie do studzienek roztworu stopującego. Pomiaru gęstości optycznej dokonywano w mikroczytniku EL_X808TM przy długości fali 450 nm, stosując jako referencyjną falę o długości 540 nm. Stężenia badanych substancji zostały automatycznie wyliczone z krzywej wzorcowej.

3.11. Badania interwencyjne

W toku doświadczeń przeprowadzono badania interwencyjne, których celem była identyfikacja mediatorów proliferacji i migracji komórek raka jajnika pochodzenia mezotelialnego. W pierwszej grupie tych badań, komórki nowotworowe eksponowano na egzogenne, rekombinowane formy ludzkich: CCL2/MCP-1, CXCL1/GRO-1, CXCL8/IL-8, IL-6, MMP-3, PAI-1, TGF-β1, TSP-1, sICAM-1, u-PA, VEGF i fibronektyny, zakupione w firmie R&D Systems. W drugiej grupie doświadczeń, zachowanie komórek nowotworowych oceniono w obecności mediów kondycjonowanych z hodowli starych LKMO, które poddano 2-godzinnej preinkubacji ze specyficznymi przeciwciałami neutralizującymi potencjalne mediatory proliferacji lub migracji. Przeciwciała te oraz odpowiednie dla nich przeciwciała

kontrolne zostały zakupione w firmach: R&D Systems (przeciwno CCL2/MCP-1, CXCL1/GRO-1, CXCL8/IL-8, IL-6, PAI-1, sICAM-1, TGF- β 1, VEGF), Sigma (przeciwno fibronektynie) oraz antibodies online.com (Aachen, RFN, przeciwno u-PA). Stężenia przeciwciał, wybrane na podstawie danych literaturowych, zaleceń producenta i przeprowadzonych badań pilotażowych, były następujące: anti-CCL2/MCP-1 (100 μ g/ml), anti-CXCL1/GRO-1 (10 μ g/ml), anti-CXCL8/IL-8 (20 μ g/ml), anti-IL-6 (200 ng/ml), anti-PAI-1 (20 μ g/ml), anti-TGF- β 1 (400 ng/ml [228]), anti-sICAM-1 (25 μ g/ml), anti-u-PA (100 μ g/ml), anti-VEGF (5 μ g/ml) i anti-fibronektyna (70 μ g/ml [245]).

3.12. Ocena ekspresji antygenu proliferacyjnego PCNA

Badania przeprowadzono na komórkach, posianych w gęstości 1×10^4 komórek/cm² w komorach typu Lab-TekTM Chamber Slides (Nunc), a następnie inkubowanych przez 24 godziny. Po tym czasie komórki utrwalano z użyciem etanolu (70%). Po utrwaleniu, komórki płukano trzykrotnie PBS i inkubowano przez 30 minut z roztworem H₂O₂ (0,3%) celem zablokowania aktywności endogennych peroksydaz. Po kolejnym, trzykrotnym płukaniu z pomocą PBS, preparat inkubowano z mysim monoklonalnym przeciwciałem anti-PCNA (Dako), rozcieńczonym 1:500 w roztworze Tris-HCl (0,05 M) o pH 7,6 z dodatkiem 2% albuminy surowicy bydlęcej (BSA) przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Po inkubacji i wypłukaniu przeciwciał za pomocą PBS, preparaty inkubowano z kompleksem EnVision FLEX (Dako) przez 20 minut, po czym ponownie płukano przez 10 minut. Następnie, preparat inkubowano z roztworem DAB przez 5 minut w temperaturze pokojowej, a po upływie tego czasu wypłukano go i pozostawiono w wodzie destylowanej. Jądra komórkowe podbarwiono przy pomocy roztworu hematoksyliny Mayer'a przez 5 minut. Na koniec, preparaty zatopiono w Pertex Mounting Medium (HistoLab, Göteborg, Szwecja). Komórki cechujące się ekspresją antygenu PCNA identyfikowano na podstawie brązowego zabarwienia jądra komórkowego. Liczbę komórek dodatnich wyrażono jako odsetek 200 policzonych. Jako kontrolę ujemną traktowano preparaty, w których przeciwciałem anti-PCNA zastąpiono mysią immunoglobuliną klasy IgG w analogicznym stężeniu.

3.13. Ocena ekspresji SA- β -Gal

W celu określenia ekspresji SA- β -Gal, komórki posiewano w komorach Lab-TekTM Chamber Slides w gęstości 3×10^4 komórek/cm². Po 72 godzinach inkubacji, komórki płukano PBS, a następnie utrwalano w roztworze paraformaldehydu (4%). Oznaczenia ekspresji SA- β -Gal dokonano zgodnie z metodologią opisaną przez Dimri i wsp. [89]. W jej przebiegu, po wypłukaniu utrwalacza, komórki inkubowano przez 8 godzin w temperaturze 37 °C, w inkubatorze bez CO₂, z roztworem zawierającym substrat dla β -galaktozydazy, tj. 5-bromo-4-chloro-3-indolo- β -D-galaktopiranozyd (X-Gal) (1 mg/ml), kwas cytrynowy (40 mM), K₃Fe(CN)₆ (5 mM), K₄Fe(CN)₆ x 3H₂O (5 mM), NaCl (150 mM) oraz MgCl₂ (2 mM), przy pH 6,0. Po inkubacji i wypłukaniu preparatu wodą destylowaną, komórki zabezpieczano szkiełkiem nakrywkowym za pomocą wodnego medium mocującego (Dako), a następnie oceniano w mikroskopie Zeiss Axio Obserwer D1. Komórki dodatnie cechowały się obecnością niebieskiego precipitatu w obrębie cytoplazmy. Liczbę komórek wykazujących ekspresję SA- β -Gal wyrażono jako odsetek 200 policzonych komórek.

3.14. Ocena obecności ognisk histonu γ -H2A.X

W celu określenia obecności ognisk histonu γ -H2A.X komórki posiewano w komorach typu Lab-TekTM Chamber Slides, w gęstości 3×10^4 komórek/cm². Po 48 godzinach inkubacji komórki dwukrotnie płukano w PBS, a następnie utrwalano w roztworze paraformaldehydu (4%). Po dwukrotnym wypłukaniu preparatu za pomocą PBS, komórki permeabilizowano roztworem Tritonu X-100 (0,1%) w PBS, przez 10 minut, a następnie blokowano niespecyficzne miejsca wiązania przeciwciał za pomocą roztworu BSA (2%), surowicy koziej (1,5%) i Tritonu X-100 (0,1%) w PBS przez 10 minut. Następnie, do studzienek aplikowano poliklonalne królicze przeciwciało anti- γ -H2A.X (Ser-139, Abcam), rozcieńczone 1:1000. Po 60 minutach inkubacji komórki trzykrotnie płukano za pomocą PBS, a następnie inkubowano z poliklonalnym kozim, anti-króliczym przeciwciałem DyLight 488 (Abcam), rozcieńczonym 1:500, przez 60 minut w temperaturze pokojowej. Po trzykrotnym płukaniu preparatu z użyciem PBS podano roztwór 4',6-diamidyno-2-fenylindolu (DAPI) (1 μ g/ml) w PBS w celu wybarwienia DNA i inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Po wypłukaniu DAPI za pomocą wody destylowanej preparat zabezpieczono szkiełkiem nakrywkowym, które umocowano za pomocą wodnego medium (Dako), a następnie poddano analizie w mikroskopie fluorescencyjnym. Komórki cechujące się obecnością histonu γ -H2A.X rozpoznano na podstawie obecności zielonych

ognisk na tle jądra komórkowego, wybarwionego DAPI na kolor niebieski. Liczbę komórek wykazujących obecność ognisk histonu γ -H2A.X wyrażono jako odsetek 200 policzonych komórek.

3.15. Doświadczenia na modelu zwierzęcym *in vivo*

Badania przeprowadzono na 5-tygodniowych myszach immunoniekompetentnych SCID (CB17/Icr-Prkdc/IcrIcoCrl), zakupionych w firmie Charles River (Wilmington, MA, USA). Na wykonanie badań uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu (Uchwała 44/2011 z dnia 13 maja 2011 r. oraz nr 63/2013 z dnia 6 września 2013 r.).

3.15.1. Transfekcja komórek nowotworowych genem dla lucyferazy

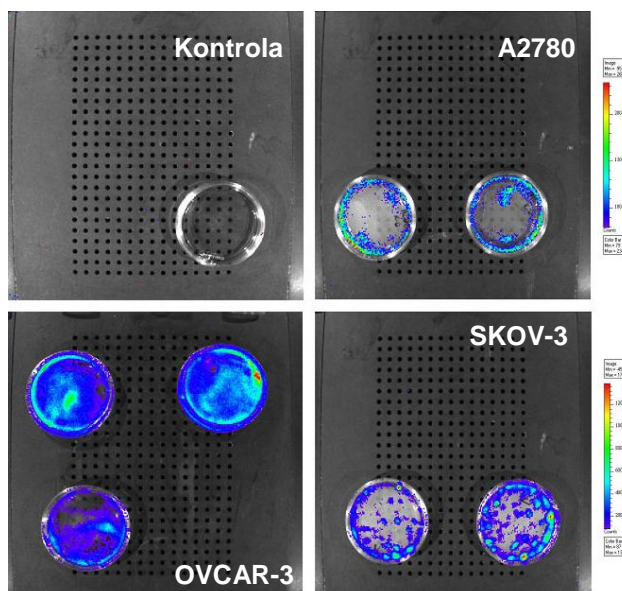
Aby określić minimalne stężenie neomycyny, niezbędnej do selekcji transfekowanych komórek, komórki nowotworowe wysiewano na płytkę 6-studzienkową i hodowano do osiągnięcia stadium 80% zlewności. Następnie medium usuwano i dodawano nowe, zawierające neomycynę (Geneticin, Life-Technologies) w zakresie stężeń: 0, 200, 400, 600, 800, 1000 $\mu\text{g/ml}$. Po 72 godzinnej inkubacji dokonywano oceny morfologicznej komórek. Przeprowadzone badania wykazały, że stężenie neomycyny powyżej 400 $\mu\text{g/ml}$ powodowało odklejanie komórek od podłoża, w związku z czym do selekcji komórek wybrano stężenie neomycyny wynoszące 300 $\mu\text{g/ml}$.

W dniu wykonania transfekcji przeprowadzono ocenę mikroskopową morfologii komórek oraz zagęszczenia hodowli. Do procedury wykorzystano hodowle, które osiągnęły 70-90% konfluencji. Do probówek o objętości 1,5 ml dodawano 2,5 μg konstrukcji genowej pGL4.51 (Promega, Madison, WI, USA) oraz 2,5 μl odczynnika PLUSTM Reagent (Invitrogen), a następnie uzupełniano pożywką Opti-MEM do objętości 250 μl . W oddzielnych probówkach przygotowywano mieszaninę zawierającą 250 μl Opti-MEM oraz 10 μl lipofektaminy LTX (Invitrogen). Do probówki zawierającej lipofektaminę dodawano roztwór plazmidowego DNA i inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Przed dodaniem mieszaniny transfekcyjnej, z płytek hodowlanych usuwano starą pożywkę, komórki przemywano starannie HBSS oraz dodawano 2 ml dedykowanej pożywki RPMI bez suplementacji. Do tak przygotowanej hodowli dodawano następnie kroplami mieszaninę DNA-lipofektamina. Po 24 godzinach inkubacji z czynnikiem transfekcyjnym, medium wymieniano na nowe, zawierające 300 $\mu\text{g/ml}$ neomycyny. Po osiągnięciu przez hodowlę stadium pełnej zlewności,

komórki poddawano pasażowaniu. Efektywność transfekcji oceniano na podstawie intensywności bioluminescencji z wykorzystaniem systemu obrazowania IVIS Spectrum (Caliper Life Sciences, Hopkington, MA, USA) (Rycina 12).

3.15.2. Przygotowywanie mysich ksenograftów

Bezpośrednio przed procedurą wszczepiania, hodowle młodych i starych LKMO oraz komórek rakowych zawierających transgen dla lucyferazy przemywano porcją jałowego PBS i poddawano złuszczeniu przy pomocy roztworu trypsyny (0,05%) z dodatkiem EDTA (0,02%). Po krótkim okresie inkubacji pod kontrolą wzroku, trypsynę neutralizowano podwójną objętością medium hodowlanego oraz odwirowywano z prędkością 1200 obrotów/minutę, przez 10 minut, w temperaturze pokojowej. Komórki następnie zawieszano w 10 ml świeżej pożywki i zliczano w komorze Bürkera. Następnie, odpowiednią objętość mieszaniny, zawierającej 2×10^6 komórek mezotelialnych (młodych lub starych LKMO) i 2×10^6 komórek nowotworowych przenoszono do świeżej probówki typu Falcon i ponownie odwirowywano z prędkością 1200 obrotów/minutę. Po przemyciu, osad komórkowy zawieszano w 100 μ l roztworu PBS. Tak przygotowane mieszaniny komórkowe wszczepiano myszom dootrzewnowo (łącznie 4×10^6 komórek na jednego osobnika) za pomocą strzykawek Tuberculin Syringe 27G 1/2 (0.40x13mm) (Becton Dickinson).



Rycina 12. Ocena efektywności transfekcji komórek raka jajnika plazmidem dla lucyferazy za pomocą systemu obrazowania IVIS Spectrum (czas ekspozycji: 5 sekund).

3.15.3. Monitoring rozwoju guzów w otrzewnej metodą bioluminescencyjną

W celu wizualizacji rozwoju zmian nowotworowych w otrzewnej mysiej za pomocą metody bioluminescencyjnej, w odpowiednich interwałach czasowych zwierzętom podawano dootrzewnowo substrat dla lucyferazy, lucyferynę (15 mg/ml, Gold Biotechnology, St. Louis, USA), a następnie usypiano je za pomocą izofluranu (Forane, Abbott, Illinois, USA), podawanego wziewnie (0,25 l/minutę). Następnie, myszy umieszczano w komorze aparatu IVIS Spectrum, a bioluminescencję emitowaną przez komórki nowotworowe oceniano w czasie 30-sekundowego naświetlania.

3.15.4. Eutanazja zwierząt i usuwanie zmian nowotworowych z jamy otrzewnej

Po 21 dniach od wszczepienia mieszanin komórkowych, zwierzęta usypiano za pomocą przedawkowania ketaminy (30-35 mg/kg masy ciała) z ksylazyną (40-90 mg/kg masy ciała), podanych domięśniowo. Następnie, jamę brzuszną zwierząt otwierano za pomocą jałowych narzędzi, a wytworzone w obrębie otrzewnowej guzy nowotworowe usuwano w całości, wraz z minimalnym marginesem zdrowej tkanki. Usunięte zmiany mierzono suwmiarką laboratoryjną, fotografowano, a następnie umieszczano w 10% roztworze formaliny buforowanej fosforanami, celem poddania ich dalszej ocenie histopatologicznej.

3.15.5. Identyfikacja histopatologiczna usuniętych guzów nowotworowych

3.15.5.1. Utrwalanie preparatów i zatapianie w kostkach parafinowych

Po utrwaleniu w formalinie (przez 24-48 godzin) materiał płukano oraz odwadniano, przeprowadzając przez szereg wodnych roztworów alkoholu etylowego o stopniowo wzrastających stężeniach: 50%, 70%, 80%, 90%. W ostatnim etapie przeprowadzono dwukrotne płukanie bezwodnym alkoholem absolutnym i umieszczano badany materiał w płynie pośrednim (ksylenie). W dalszej kolejności, celem wstępnego wprowadzenia parafiny do tkanki, materiał zanurzano w roztworze płynu pośredniego i parafiny (1:1) i inkubowano w temperaturze 37°C. Następnie materiał dwukrotnie przeprowadzono przez roztwór czystej parafiny celem usunięcia pozostałości płynu pośredniego. Po przepojeniu materiału parafiną, tkankę zatapiano w formie kostek i oziębiano w zimnej wodzie. Po zespoleniu parafiny, uzyskane bloczki skrawano na mikrotomie saneczkowym (Reicher, Nussloch, RFN) do fragmentów o grubości 3 µm, które następnie rozprostowywano na powierzchni wody o temperaturze 40°C i naklemano na szkiełka podstawowe SuperFrost (Menzel-Gläser, Ramont, Szwajcaria). Następnie preparaty poddawano barwieniu roztworem hematoksyliny i eozyny.

3.15.5.2. Barwienie preparatów hematoksyliną i eozyną

W celu wykonania barwienia roztworem hematoksyliny i eozyny (h+e), wysuszone preparaty ponownie przepłukiwano w ksylenie w celu usunięcia resztek parafiny. Następnie nawadniano tkanki stosując szereg roztworów alkoholu etylowego o malejącym stężeniu: 90%, 80%, 70%, 50%. W dalszej kolejności skrawki przepłukiwano w czystej wodzie, a następnie przez 10 minut inkubowano w roztworze hematoksyliny ałunowej (Avantor Performance Materials, Gliwice, Polska) w temperaturze pokojowej. Następnie, preparat płukano pod strumieniem bieżącej wody przez 15 minut i inkubowano w kuwecie z wodą destylowaną, po czym poddawano go barwieniu w 1% roztworze eozyny (Scharlau Chemie, Sentmanat, Hiszpania) z dodatkiem jednej kropli kwasu octowego. Po 10 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej, preparat płukano w wodzie destylowanej celem usunięcia niezwiązanego barwnika, a następnie odwadniano w szeregu alkoholi o wzrastającym stężeniu. W ostatnim etapie preparat zabezpieczano balsamem kanadyjskim i szkiełkiem nakrywkowym superfrost (Menzel-Gläser).

3.16. Analiza statystyczna

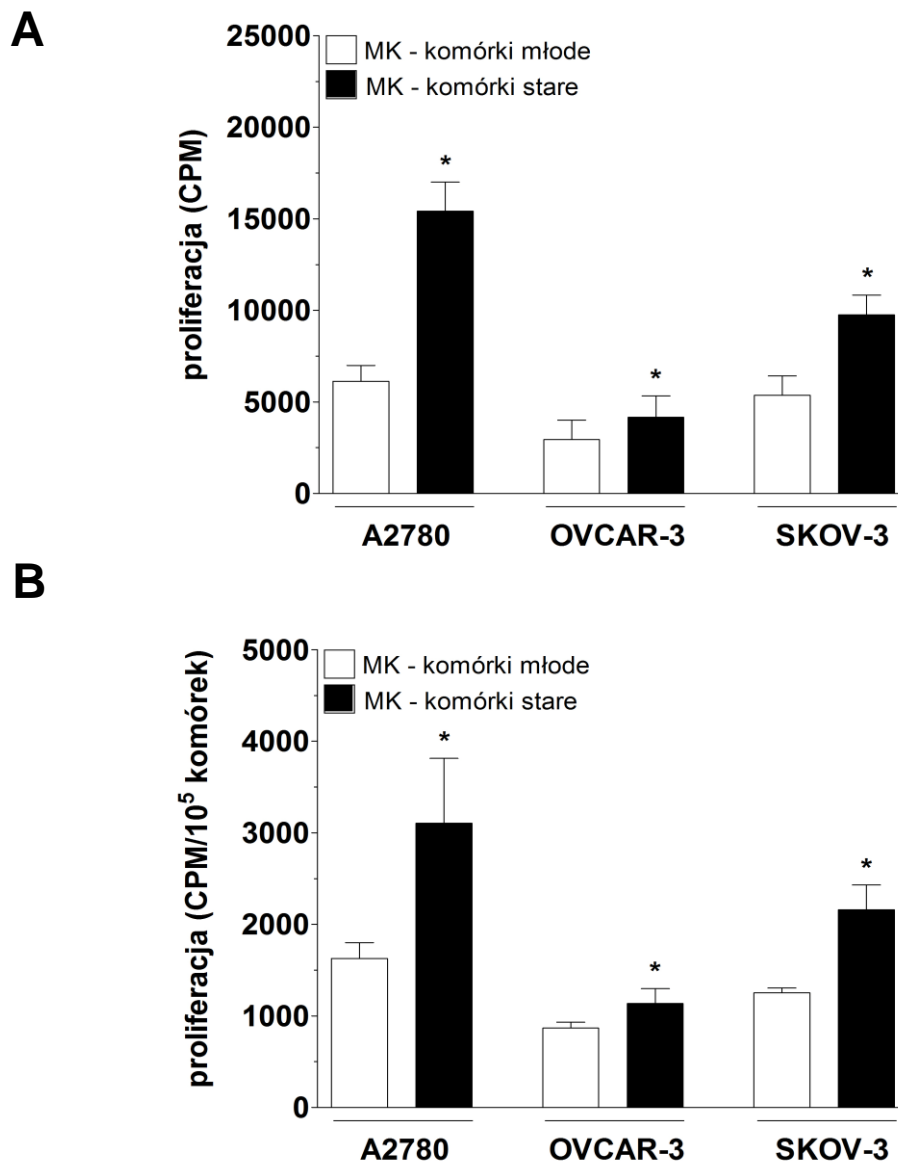
Analizę statystyczną wyników wykonano przy użyciu programu statystycznego GraphPad Prism™ 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) posługując się testem Wilcoxon dla nieparametrycznych zmiennych powiązanych oraz testem Manna-Whitneya dla nieparametrycznych zmiennych niepowiązanych. Porównania przebiegu krzywych w funkcji czasu dokonano za pomocą wieloczynnikowej analizy wariancji (*two-way ANOVA*). Przy porównaniach obejmujących trzy i więcej grup, posłużono się testem analizy wariancji dla powtórzonych pomiarów (*repeated measures ANOVA*) oraz testem Newman-Keuls jako post-hoc. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± odchylenie standardowe (SD). Za istotne statystycznie przyjęto różnice z wartością współczynnika $P < 0,05$.

4. WYNIKI

4.1. Wpływ starzenia się LKMO na proliferację komórek raka jajnika *in vitro* – ocena działania czynników rozpuszczonych w medium

Celem określenia wpływu czynników rozpuszczalnych, wydzielonych do środowiska hodowlanego przez młode i stare LKMO na proliferację komórek raka jajnika, komórki nowotworowe posiewano w naczyniach hodowlanych w niskiej gęstości, a następnie eksponowano przez 72 godziny na media kondycjonowane (MK), wygenerowane przez komórki mezotelialne. Mając na uwadze fakt, że badane media zawierały czynniki wyprodukowane przez różne liczby komórek młodych i starych, celem zobiektywizowania uzyskanych wyników badania te przeprowadzono w dwóch układach doświadczalnych, różniących się sposobem przygotowania próbek MK oraz formą normalizacji wyników. W pierwszym przypadku, kierując się znaną liczbą młodych i starych komórek mezotelium otrzewnowego, które wygenerowały MK, media z hodowli komórek młodych w odpowiedni ilościowo sposób rozcieńczono świeżą pożywką, natomiast media z hodowli starych aplikowano w formie nierozcieńczonej. W drugim układzie, komórki nowotworowe traktowano próbkami MK bez ich uprzedniego rozcieńczania, jednak uzyskane wyniki odnoszono do liczby komórek, generującej medium.

Badania z wykorzystaniem metody radioizotopowej wykazały, że w przypadku wszystkich trzech badanych linii komórek raka jajnika (A2780, OVCAR-3 i SKOV-3), proliferacja komórek nowotworowych pod wpływem działania MK ze starych LKMO była istotnie statystycznie wyższa w porównaniu z komórkami poddawanyymi działaniu MK z hodowli komórek młodych. W pierwszym z układów eksperymentalnych, proliferacja komórek A2780 eksponowanych na MK z hodowli komórek starych wzrosła o $155 \pm 30\%$ ($P < 0,001$) w porównaniu z działaniem MK z hodowli młodych, w przypadku komórek OVCAR-3 wzrost ten wynosił $49 \pm 37\%$ ($P < 0,001$), natomiast w przypadku komórek SKOV-3 - $87 \pm 38\%$ ($P < 0,001$) (**Rycina 13A**). Analizując dane uzyskane dla drugiego układu doświadczalnego stwierdzono, że efektywność proliferacji komórek A2780 pod wpływem MK ze starych LKMO wzrosła o $102 \pm 53\%$ ($P < 0,01$), komórek OVCAR-3 o $31 \pm 15\%$ ($P < 0,001$), a komórek SKOV-3 o $73 \pm 25\%$ ($P < 0,001$) (**Rycina 13B**).



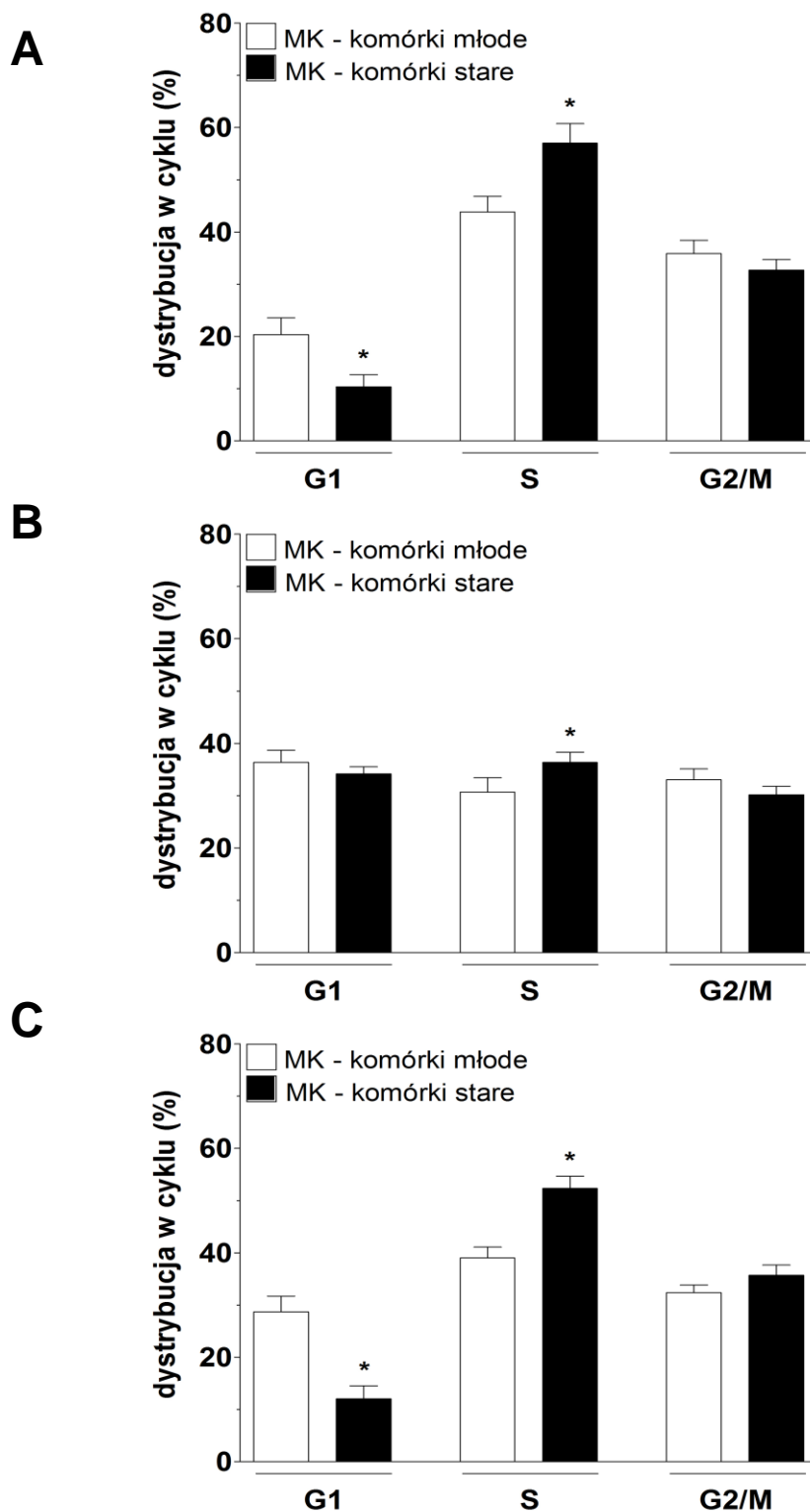
Rycina 13. Wpływ MK z hodowli młodych (□) i starych (■) LKMO na proliferację komórek raka jajnika. Wykres (A) przedstawia wyniki uzyskane po rozcieńczeniu MK z hodowli młodych LKMO, natomiast wykres (B) obrazuje wyniki znormalizowane na stałą liczbę komórek. Dane przedstawiają wartości średnie ± SD. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami ekspozowanymi na MK z hodowli młodych. Dane pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych z wykorzystaniem mediów, wygenerowanych przez komórki pochodzące od 12 różnych dawców.

4.2. Wpływ medium kondycjonowanego z hodowli komórek mezotelialnych na dystrybucję komórek raka jajnika w cyklu mitotycznym

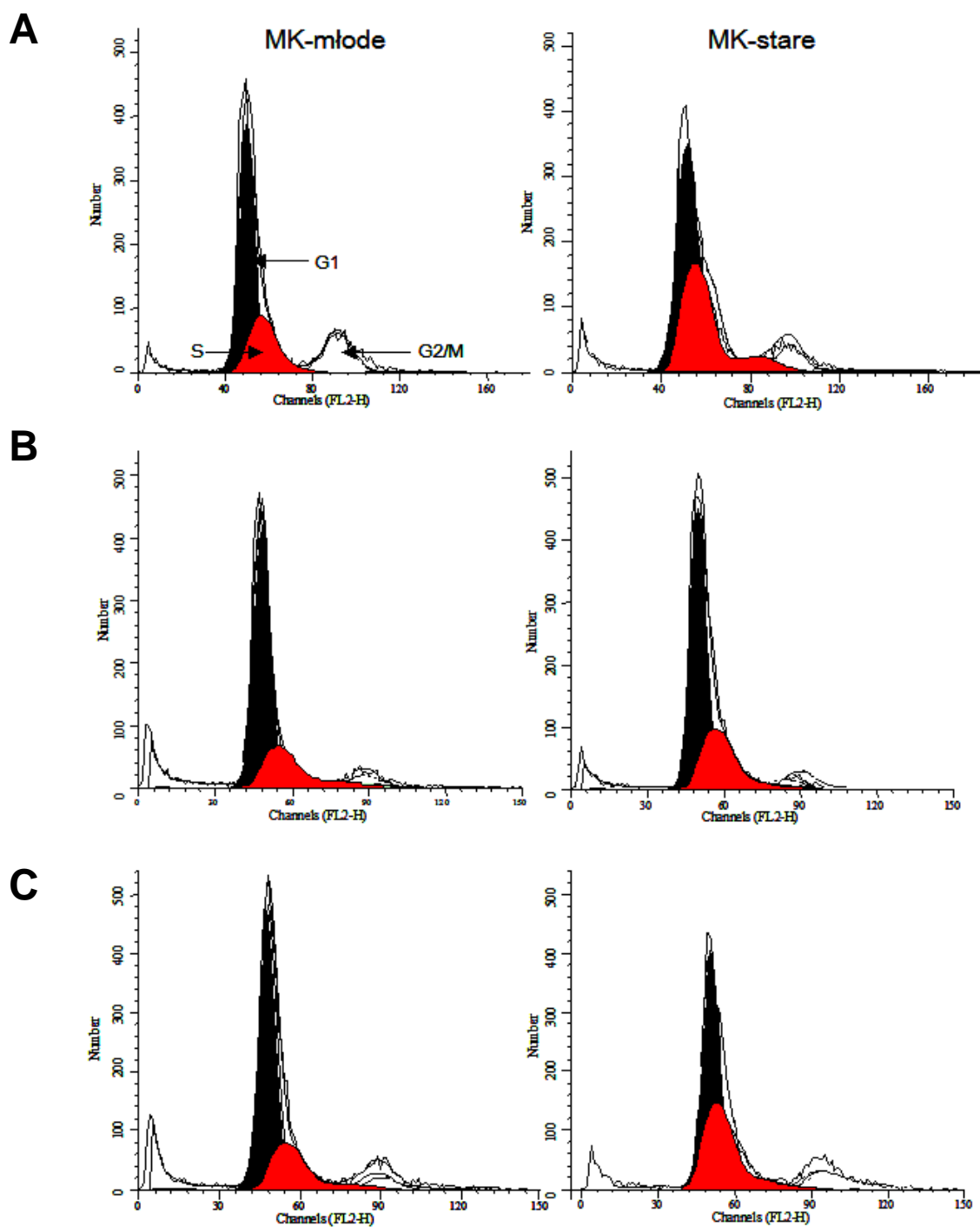
Badania proliferacji komórek nowotworowych pod wpływem MK z hodowli LKMO uzupełniono analizą jego wpływu na dystrybucję komórek w cyklu mitotycznym. Badania przeprowadzone metodą cytometrii przepływowej wykazały, że komórki A2780 poddawane działaniu MK z hodowli starych LKMO cechują się wzrostem odsetka komórek w fazie S cyklu o $30 \pm 12\%$ ($P < 0,04$) w porównaniu z komórkami eksponowanymi na MK z młodych LKMO. Ponadto w przypadku tej grupy komórek odnotowano istotnie statystycznie obniżenie odsetka komórek w fazie G1 o $48 \pm 16\%$ ($P < 0,04$) (**Rycina 14A i 15A**). Z kolei w odniesieniu do komórek linii OVCAR-3, ich ekspozycja na MK ze starych LKMO spowodowała wzrost frakcji komórek w fazie S o $19 \pm 8\%$ ($P < 0,04$), pozostając bez wpływu na dystrybucję komórek w pozostałych fazach cyklu (**Rycina 14B i 15B**). Na koniec, w komórkach SKOV-3 eksponowanych na MK ze starych LKMO stwierdzono wzrost odsetka komórek w fazie S o $34 \pm 9\%$ ($P < 0,04$) oraz obniżenie frakcji komórek w fazie G1 cyklu, o $58 \pm 11\%$ ($P < 0,04$) (**Rycina 14C i 15C**).

4.3. Wpływ starzenia się LKMO na migrację komórek raka jajnika *in vitro*

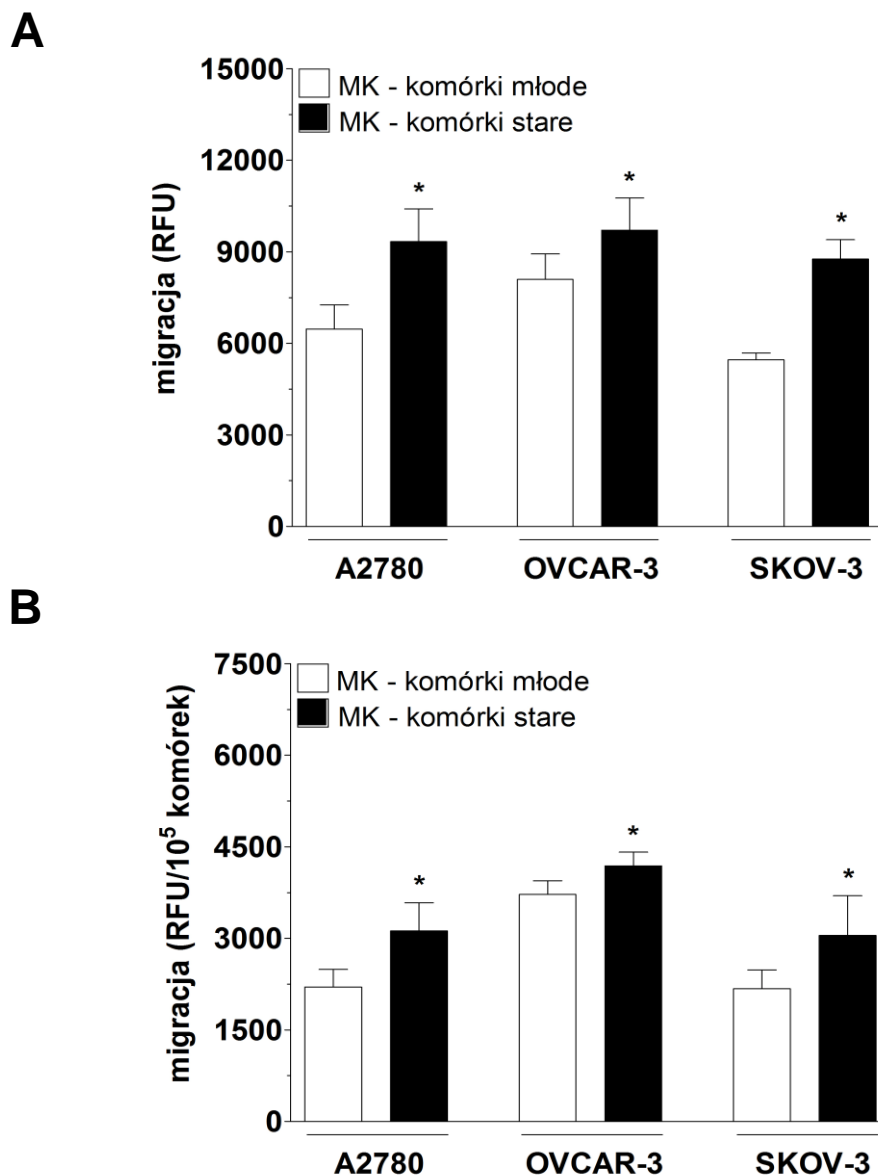
Oceny migracji komórek nowotworowych przez błony poliwęglanowe o średnicy porów $8 \mu\text{M}$ dokonano metodą fluorescencyjną, wykorzystując jako chemoatraktant próbki MK, zebrane z hodowli młodych i starych LKMO. Badanie, analogicznie do oceny proliferacji, przeprowadzono w dwóch układach eksperymentalnych; w pierwszym z nich MK z hodowli komórek młodych odpowiednio rozcieńczono, natomiast w drugim, podano je nierozcieńczone, a ostateczny wynik znormalizowano na stałą liczbę komórek. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem pierwszego układu doświadczalnego wykazały, że MK z hodowli starych LKMO wykazują silne działanie chemotaktyczne w stosunku do komórek raka jajnika, pobudzając migrację komórek A2780 o $46 \pm 20\%$ ($P < 0,001$), komórek OVCAR-3 o $20 \pm 6\%$ ($P < 0,001$) oraz komórek SKOV-3 o $61 \pm 11\%$ ($P < 0,001$) w porównaniu z działaniem MK z hodowli komórek młodych (**Rycina 16A**). W drugim układzie doświadczalnym zaobserwowano analogiczne pobudzenie migracji komórek rakowych, które w przypadku komórek linii A2780 wynosiło $44 \pm 28\%$ ($P < 0,001$), komórek OVCAR-3 $13 \pm 7\%$ ($P < 0,001$), a komórek SKOV-3 $41 \pm 28\%$ ($P < 0,001$) (**Rycina 16B**).



Rycina 14. Wpływ MK z hodowli młodych (□) i starych (■) LKMO na dystrybucję komórek raka jajnika A2780 (A), OVCAR-3 (B) i SKOV-3 (C) w cyklu podziałowym. Dane przedstawiają wartości średnie \pm SD. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na MK z hodowli młodych. Dane pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych z wykorzystaniem mediów, wygenerowanych przez komórki pochodzące od 6 różnych dawców.



Rycina 15. Reprezentatywne histogramy uzyskane w trakcie analizy cytometrycznej, ilustrujące wpływ MK z hodowli młodych (MK-młode) i starych (MK-stare) LKMO na dystrybucję komórek raka jajnika A2780 (A), OVCAR-3 (B) i SKOV-3 (C) w cyklu podziałowym. Kolorem czerwonym wyróżniono komórki w fazie S, natomiast kolorem czarnym komórki w fazie G1. W każdym z przedstawionych przypadków, badaniu poddano populację 1×10^6 komórek.

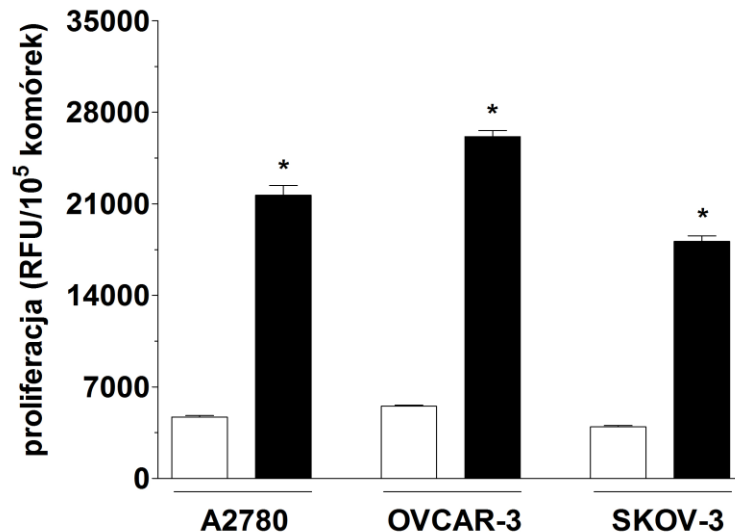


Rycina 16. Wpływ MK z hodowli młodych (□) i starych (■) LKMO na migrację komórek raka jajnika. Wykres (A) przedstawia wyniki uzyskane po rozcieńczeniu MK z hodowli młodych LKMO, natomiast wykres (B) obrazuje wyniki znormalizowane na stałą liczbę komórek. Dane przedstawiają wartości średnie \pm SD. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na MK z hodowli młodych. Dane pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych z wykorzystaniem mediów, wygenerowanych przez komórki pozyskane od 12 różnych dawców.

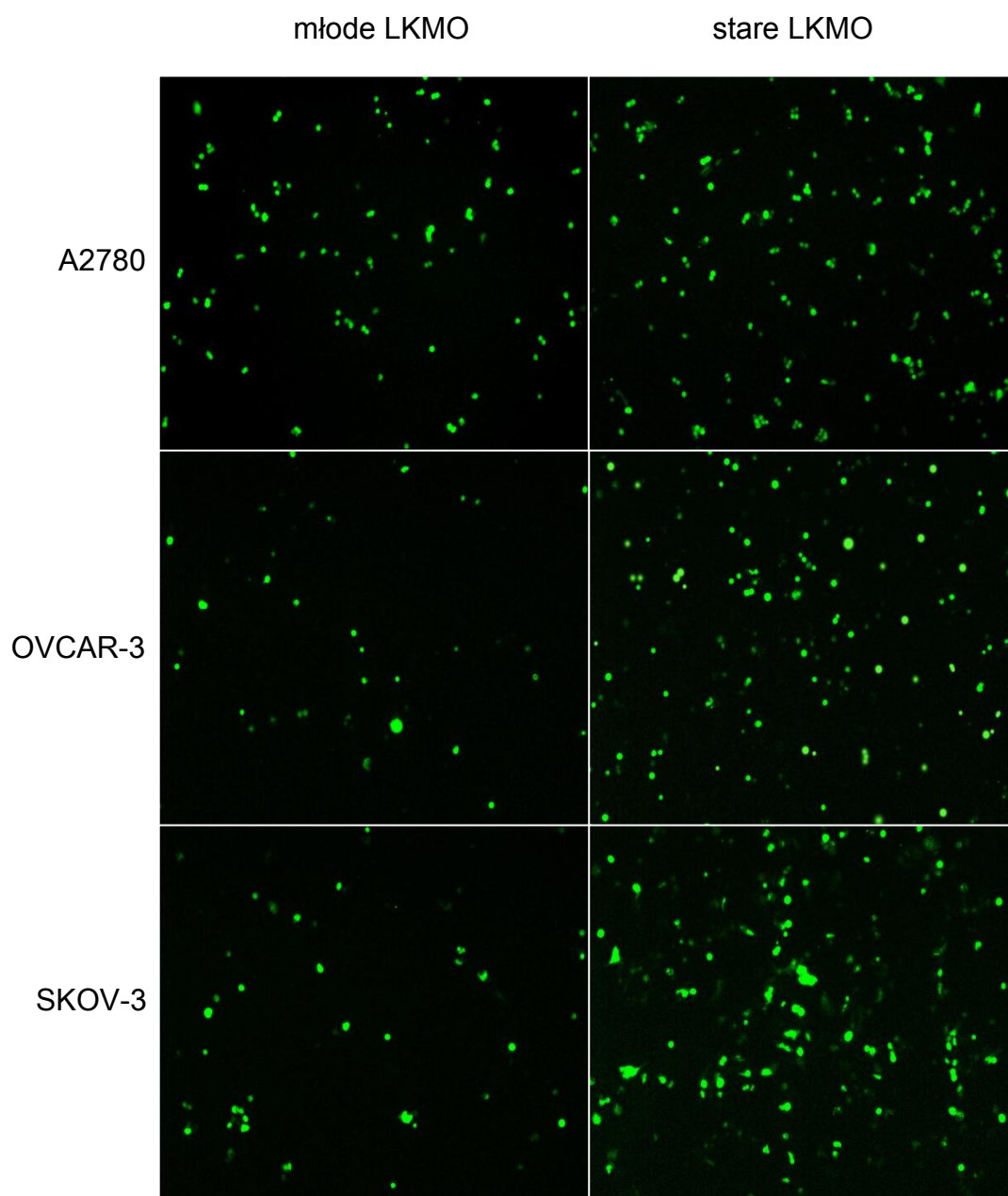
4.4. Wpływ starzenia się LKMO na proliferację komórek raka jajnika *in vitro* – ocena bezpośrednich oddziaływań komórka-komórka

Celem określenia wpływu starzenia się LKMO na proliferację komórek raka jajnika za pośrednictwem oddziaływań typu komórka-komórka, stworzono hodowle mieszane, w których komórki rakowe, poddane wcześniejszej transfekcji plazmidem dla GFP posiewane były na monowarstwy komórkowe, utworzone z, odpowiednio, młodych i starych LKMO. Po 72 godzinach ko-inkubacji, dokonywano odczytu generowanej przez GFP fluorescencji, ujednolicając uzyskany wynik względem stałej liczby komórek mezotelialnych.

Tak przeprowadzone badania wykazały, że stare LKMO, w znacznie wyższym stopniu niż komórki młode, pobudzają intensywność podziałów będących z nimi w kontakcie komórek nowotworowych. Uwagę zwraca fakt, że skala pobudzenia proliferacji trzech badanych typów komórek raka jajnika była zdecydowanie wyższa w porównaniu z opisanym wcześniej wpływem czynników rozpuszczalnych, zawartych w medium kondycjonowanym. Co ciekawe, efekty uzyskane dla trzech linii komórek nowotworowych okazały się być bardzo podobne: proliferacja komórek A2780 wzrosła pod wpływem starych LKMO o $361 \pm 21\%$ ($P < 0,04$), komórek OVCAR-3 o $373 \pm 15\%$ ($P < 0,04$), natomiast komórek SKOV-3 o $358 \pm 5\%$ ($P < 0,04$) (Rycina 17 i Rycina 18).



Rycina 17. Porównanie bezpośredniego wpływu młodych (□) i starych (■) LKMO na proliferację komórek raka jajnika. Dane przedstawiają wartości średnie \pm SD. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z działaniem komórek młodych. Dane pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych z wykorzystaniem LKMO wyizolowanych od 6 różnych dawców.

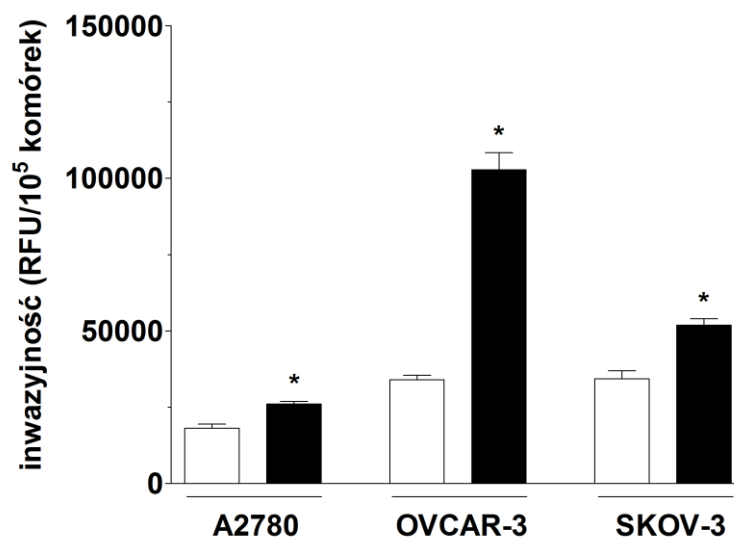


Rycina 18. Reprezentatywne zdjęcia hodowli komórek raka jajnika A2780, OVCAR-3 i SKOV-3 rosnących przez 72 godziny na monowarstwie utworzonej przez młode i stare LKMO. Zdjęcia wykonano w trakcie doświadczeń, których wyniki ilościowe przedstawiono na Rycinie 17.

4.5. Wpływ starzenia się LKMO na inwazyjność komórek raka jajnika *in vitro*

Przeprowadzono także badania wpływu starzenia się LKMO na inwazyjność komórek raka jajnika, w aspekcie poznania roli w tym procesie wzajemnych oddziaływań typu komórka prawidłowa-komórka nowotworowa. Jako miarę inwazyjności wykorzystano zdolność komórek nowotworowych, wyznakowanych uprzednio znacznikiem fluorescencyjnym (kalceiną-AM), do przechodzenia przez monowarstwę młodych lub starych LKMO oraz warstwę białek macierzy pozakomórkowej (tzw. Matrigel®), w czasie 24-godzinnej ko-inkubacji. Jako czynnik chemotaktyczny, indukujący wędrówkę komórek nowotworowych wykorzystano w tym badaniu świeże medium hodowlane, właściwe dla komórek nowotworowych.

Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że inwazyjność komórek raka jajnika w sposób znaczący wzrasta w obecności starych LKMO, w porównaniu z ich zachowaniem w obecności komórek młodych. W przypadku komórek linii A2780 odnotowano wzrost ich inwazyjności o $43 \pm 7\%$ ($P < 0,04$), w przypadku komórek OVCAR-3 o $199 \pm 7\%$ ($P < 0,04$), natomiast w przypadku komórek SKOV-3 o $54 \pm 5\%$ ($P < 0,04$) (**Rycina 19**).



Rycina 19. Porównanie bezpośredniego wpływu młodych (□) i starych (■) LKMO na inwazyjność komórek raka jajnika. Dane przedstawiają wartości średnie \pm SD. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z działaniem komórek młodych. Dane pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych z wykorzystaniem LKMO wyizolowanych od 6 różnych dawców.

4.6. Wpływ starzenia się LKMO na ekspresję genów związanych z postępowaniem procesu nowotworowego w komórkach raka jajnika – analiza metodą mikromacierzy

Celem określenia wpływu procesu starzenia się LKMO na zmianę ekspresji genów w komórkach nowotworowych, komórki raka jajnika eksponowano przez 72 godziny na próbki mediów kondycjonowanych, zebrane z hodowli młodych i starych LKMO, a następnie uzyskane z nich mRNA poddano analizie za pomocą mikromacierzy Affymetrix. W przedstawionej analizie skupiono się tylko na tych genach, które są w jednoznaczny sposób (zgodnie z danymi literaturowymi) zaangażowane w postęp choroby nowotworowej. Ponadto, w tabelach ilustrujących wyniki tych badań uwzględniono tylko te geny, których ekspresja wzrastała w sposób jednolity we wszystkich eksperymentach, tj. pod wpływem MK z czterech różnych hodowli LKMO.

Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono, że komórki nowotworowe poddawane działaniu MK ze starych LKMO cechują się wzrostem ekspresji szeregu genów, których aktywność obejmuje zjawiska biologiczne sprzyjające rozwojowi nowotworów. Są wśród nich geny związane z regulacją przebiegu cyklu komórkowego (w tym pobudzające proliferację), geny związane z nasileniem zjawiska angiogenezy, geny uczestniczące w syntezie i przebudowie struktur ECM, geny biorące udział w reakcji zapalnej (prozapalne) oraz geny zaangażowane w zjawiska adhezji, migracji i inwazyjności komórek nowotworowych. Profil genów, które uległy nadekspresji w komórkach rakowych pod wpływem starych LKMO, jak również sam stopień wzrostu ekspresji tych genów różniły się natomiast w zależności od testowanej linii komórek nowotworowych. W komórkach A2780, najwyższy wzrost ekspresji pod wpływem działania komórek starych odnotowano dla genów kodujących: cyklinę B1, białko połączeń międzykomórkowych - koneksynę 43, białko adhezyjne - kadherynę 5, metaloproteazę ADAM oraz angiogenną i chemotaktyczną chemokinę CXCL8/IL-8 (**Tabela 6**). Z kolei w komórkach OVCAR-3, najsilniej wyrażony okazał się być wzrost ekspresji genów dla: receptora dla interleukiny 6 (IL-6R), czynnika wzrostu tkanki łącznej (CTGF), mediatora adhezji - integryny $\beta 1$ oraz angiogennej i prozapalnej chemokiny CXCL1/GRO-1 (**Tabela 7**). Komórki SKOV-3 cechowały się natomiast silnie wyrażoną nadekspresją genów dla: antygenu proliferacyjnego Ki67, płytkopochodnego czynnika wzrostu C (PDGF-C), czynnika wzrostu śródbłona naczyń (VEGF), chemotaktycznej i angiogennej chemokiny CCL2/MCP-1 oraz uczestniczącego w przebudowie ECM tkankowego inhibitora metaloproteaz 1 (TIMP-1) (**Tabela 8**).

Tabela 6. Geny, których ekspresja uległa podwyższeniu w komórkach raka jajnika A2780 pod wpływem MK z hodowli starych LKMO. Dane wyrażone są jako średnia krotność wzrostu względem komórek eksponowanych na MK z komórek młodych (\pm SD). Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych z wykorzystaniem mediów, wygenerowanych przez komórki pozyskane od 4 różnych dawców.

| FUNKCJA | GEN | ZMIANA (średnia \pm SD) |
|--------------------------------------|----------------------------------|---|
| cykl komórkowy i proliferacja | cyklina A2 | 1,8 \pm 0,3 |
| | cyklina B1 | 4,2 \pm 0,2 |
| | cyklina D1 | 1,2 \pm 0,1 |
| | cyklina E2 | 2,2 \pm 0,1 |
| | Ki67 | 3,4 \pm 0,5 |
| | PDGF-C | 2,3 \pm 0,3 |
| adhezja/chemotaksja/migracja | CXCL6 | 2,8 \pm 0,3 |
| | integryna β 3 | 3,8 \pm 0,2 |
| | integryna β 6 | 4,1 \pm 0,5 |
| | koneksyna 43 | 3,5 \pm 0,4 |
| | RHAMM | 3,6 \pm 0,3 |
| angiogeneza | CXCL1/GRO-1 | 3,3 \pm 0,1 |
| | CXCL8/IL-8 | 4,3 \pm 0,3 |
| | kadheryna 5 | 4,8 \pm 0,4 |
| reakcja zapalna | CCL2/MCP-1 | 3,1 \pm 0,3 |
| | receptor dla IL-1 | 1,9 \pm 0,2 |
| | członek 2 nadrodz. TNF α | 4,3 \pm 0,1 |
| | członek 10 nadrodz. TNF α | 2,3 \pm 0,4 |
| synteza i przebudowa ECM | ADAM | 4,2 \pm 0,2 |
| | fibronektyna | 3,1 \pm 0,4 |
| | TIMP-2 | 2,8 \pm 0,1 |
| | t-PA | 2,1 \pm 0,3 |
| | u-PA | 2,9 \pm 0,2 |

Tabela 7. Geny, których ekspresja uległa podwyższeniu w komórkach raka jajnika OVCAR-3 pod wpływem MK z hodowli starych LKMO. Dane wyrażone są jako średnia krotność wzrostu względem komórek eksponowanych na MK z komórek młodych (\pm SD). Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych z wykorzystaniem mediów, wygenerowanych przez komórki pozyskane od 4 różnych dawców.

| FUNKCJA | GEN | ZMIANA (średnia \pm SD) |
|-------------------------------|-----------------------|------------------------------|
| cykl komórkowy i proliferacja | cell division cycle 2 | 2,1 \pm 0,5 |
| | cyklina A2 | 1,8 \pm 0,4 |
| | cyklina B1 | 2,1 \pm 0,1 |
| | cyklina E2 | 2,0 \pm 0,2 |
| | cyklina G2 | 1,5 \pm 0,4 |
| | PDGF-C | 2,1 \pm 0,1 |
| adhezja/chemotaksja/migracja | integryna β 1 | 3,4 \pm 0,5 |
| | RHAMM | 1,8 \pm 0,1 |
| angiogeneza | CXCL1/GRO-1 | 2,2 \pm 0,3 |
| | CXCL8/IL-8 | 2,1 \pm 0,1 |
| | HIF-3 α | 2,1 \pm 0,2 |
| reakcja zapalna | CCL2/MCP-1 | 2,9 \pm 0,4 |
| | IL-6 | 2,3 \pm 0,4 |
| | receptor dla IL-1 | 2,4 \pm 0,3 |
| | receptor dla IL-6 | 3,3 \pm 0,3 |
| synteza i przebudowa ECM | ADAM | 3,3 \pm 0,1 |
| | fibronektyna | 2,5 \pm 0,1 |
| | CTGF | 3,1 \pm 0,2 |
| | t-PA | 1,6 \pm 0,4 |

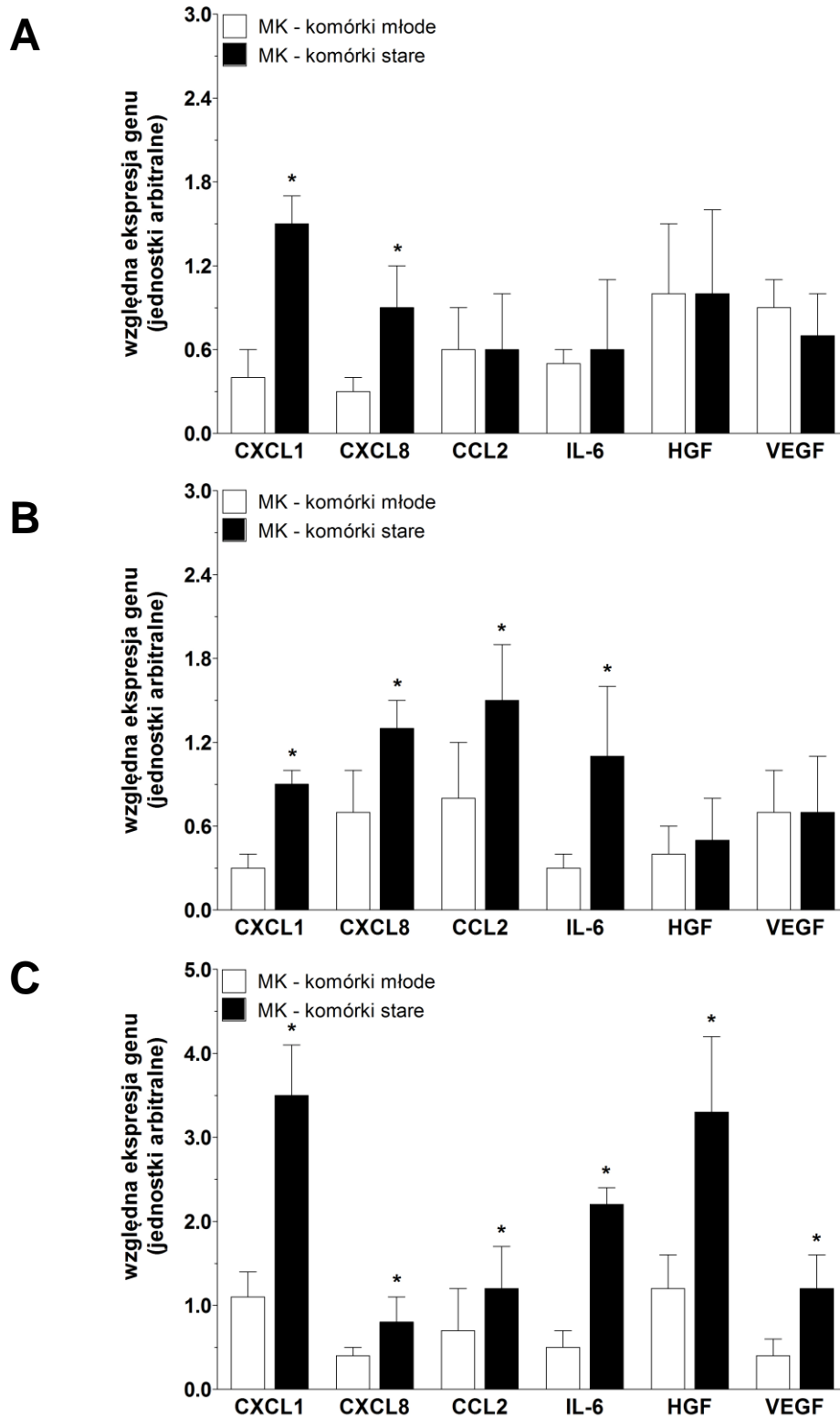
Tabela 8. Geny, których ekspresja uległa podwyższeniu w komórkach raka jajnika SKOV-3 pod wpływem MK z hodowli starych LKMO. Dane wyrażone są jako średnia krotność wzrostu względem komórek eksponowanych na MK z komórek młodych (\pm SD). Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych z wykorzystaniem mediów, wygenerowanych przez komórki pozyskane od 4 różnych dawców.

| FUNKCJA | GEN | ZMIANA (średnia \pm SD) |
|--------------------------------------|---------------------|---|
| cykl komórkowy i proliferacja | cyklina A1 | 2,2 \pm 0,3 |
| | cyklina B1 | 3,3 \pm 0,4 |
| | cyklina E2 | 2,1 \pm 0,1 |
| | cyklina G2 | 1,1 \pm 0,1 |
| | HGF | 3,3 \pm 0,4 |
| | Ki67 | 4,2 \pm 0,2 |
| adhezja/chemotaksja/migracja | PDGF-C | 5,8 \pm 0,3 |
| | CXCL6 | 2,2 \pm 0,1 |
| | integryna β 6 | 3,8 \pm 0,5 |
| angiogeneza | CXCL1/GRO-1 | 2,5 \pm 0,6 |
| | CXCL8/IL-8 | 3,6 \pm 0,5 |
| | FGFBP1 | 1,8 \pm 0,2 |
| | HIF-1 | 2,1 \pm 0,2 |
| | VEGF | 3,6 \pm 0,5 |
| reakcja zapalna | CCL2/MCP-1 | 4,5 \pm 0,7 |
| | IL-6 | 3,9 \pm 0,2 |
| | receptor dla IL-6 | 2,4 \pm 0,1 |
| synteza i przebudowa ECM | fibronektyna | 3,4 \pm 0,5 |
| | TGF- β 1 | 2,1 \pm 0,3 |
| | TIMP-1 | 6,2 \pm 0,3 |
| | TIMP-2 | 1,5 \pm 0,3 |
| | t-PA | 4,2 \pm 0,1 |

4.7. Wpływ starzenia się LKMO na ekspresję genów związanych z postępowaniem procesu nowotworowego w komórkach raka jajnika – analiza ilościową metodą PCR

Wyniki ekspresji genów uzyskane metodą mikromacierzy zweryfikowano za pomocą techniki ilościowego PCR. Badaniu temu poddano sześć transkryptów genów wybranych spośród tych, których ekspresja znacząco wzrastała w badanych liniach komórek nowotworowych. Każdy z produktów tych genów pełni ponadto znaczącą funkcję dla progresji komórek nowotworowych. W tym kontekście, analizie poddano geny kodujące: chemokiny CXCL1/GRO-1, CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1, interleukinę 6 (IL-6), czynnik wzrostu hepatocytów (HGF) oraz VEGF.

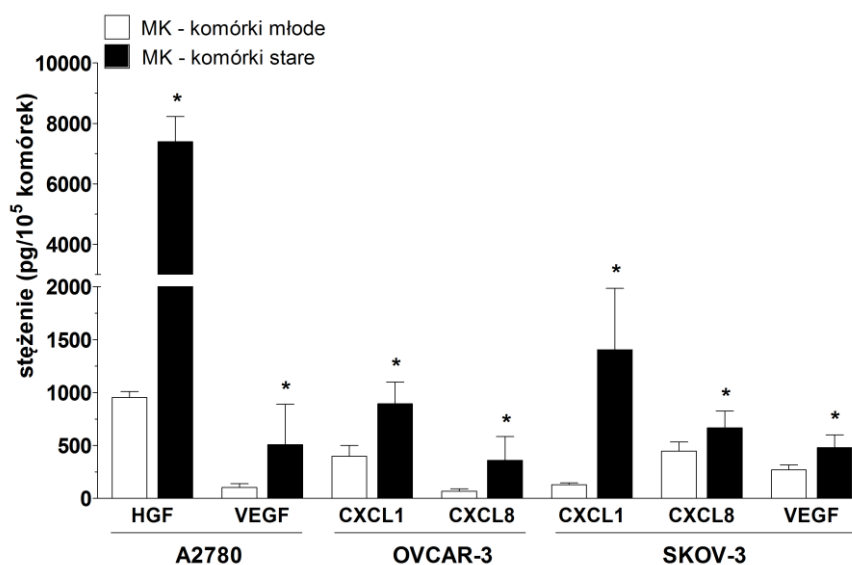
Badania wykazały, że w komórkach A2780 eksponowanych na MK z hodowli starych LKMO nastąpił wzrost ekspresji dwóch spośród badanych genów, tj. genu dla chemokiny CXCL1/GRO-1 (o $332 \pm 202\%$, $P < 0,04$) oraz chemokiny CXCL8/IL-8 (o $269 \pm 283\%$, $P < 0,04$) (**Rycina 20A**). W odniesieniu do komórek linii OVCAR-3 metoda ilościowego PCR potwierdziła wzrost ekspresji czterech spośród sześciu ocenianych genów, tj. genów dla CXCL1/GRO-1 (o $366 \pm 258\%$, $P < 0,04$), CXCL8/IL-8 (o $138 \pm 173\%$, $P < 0,04$), CCL2/MCP-1 (o $125 \pm 96\%$, $P < 0,04$) i IL-6 (o $376 \pm 235\%$, $P < 0,04$) (**Rycina 20B**). Analizując ostatnią z badanych linii raka jajnika, SKOV-3, stwierdzono jednolity wzrost ekspresji wszystkich spośród badanych genów, korespondujący ze zmianami zaobserwowanymi w analizie mikromacierzowej: ekspresja genu dla CXCL1/GRO-1 wzrosła o $247 \pm 188\%$ ($P < 0,04$), dla CXCL8/IL-8 o $123 \pm 70\%$ ($P < 0,04$), dla CCL2/MCP-1 o $105 \pm 136\%$ ($P < 0,04$), dla IL-6 o $409 \pm 320\%$ ($P < 0,04$), dla HGF o $563 \pm 421\%$ ($P < 0,04$) i dla VEGF o $262 \pm 214\%$ ($P < 0,04$) (**Rycina 20C**).



Rycina 20. Wpływ medium kondycjonowanego (MK) z hodowli młodych (□) i starych (■) LKMO na zmianę ekspresji genów w komórkach raka jajnika A2780 (A), OVCAR-3 (B) i SKOV-3 (C). Dane przedstawiają wartości średnie \pm SD. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z działaniem MK z hodowli komórek młodych. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych z wykorzystaniem mediów, wygenerowanych przez komórki pozyskane od 6 różnych dawców.

4.8. Wpływ replikacyjnego starzenia się LKMO na właściwości wydzielnicze komórek raka jajnika

W kolejnej serii doświadczeń, komórki raka jajnika poddano 24-godzinnej ekspozycji na MK z hodowli młodych i starych LKMO. Następnie, po usunięciu MK pochodzenia mezotelialnego, komórki nowotworowe utrzymywano przez 24 godziny w medium pozbawionym surowicy celem wygenerowania przez nie autologicznych mediów kondycjonowanych. Następnie, w zebranych próbkach medium zmierzono stężenia CXCL1/GRO-1, CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1, IL-6, HGF i VEGF. Badania, których wyniki zilustrowano na **Rycinie 21** wykazały, że stare LKMO wpływają na wzrost wydzielania przez komórki raka jajnika czynników, mogących w autokryny sposób promować ich progresję. W odniesieniu do komórek A2780 stwierdzono wzrost sekrecji HGF (o $674 \pm 210\%$, $P < 0,05$) i VEGF (o $206 \pm 89\%$, $P < 0,02$), w komórkach OVCAR-3 - wzrost wydzielania CXCL1/GRO-1 (o $137 \pm 79\%$, $P < 0,04$) i CXCL8/IL-8 (o $315 \pm 283\%$, $P < 0,05$), natomiast w komórkach SKOV-3 - wzrost wydzielania CXCL1/GRO-1 (o $993 \pm 462\%$, $P < 0,03$), CXCL8/IL-8 (o $51 \pm 81\%$, $P < 0,05$) i VEGF (o $87 \pm 70\%$, $P < 0,05$).



Rycina 21. Wpływ medium kondycjonowanego (MK) z hodowli młodych (□) i starych (■) LKMO na profil sekrecyjny komórek raka jajnika. Dane przedstawiają wartości średnie \pm SD. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z działaniem MK z hodowli komórek młodych. Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych z wykorzystaniem mediów, wygenerowanych przez komórki pozyskane od 6 różnych dawców.

4.9. Wpływ replikacyjnego starzenia na zmiany ekspresji genów w LKMO – analiza metodą mikromacierzy

Badania globalnej ekspresji genów metodą mikromacierzy wykazały, iż starzenie się LKMO prowadzi do istotnej statystycznie zmiany ekspresji $27 \pm 9\%$ genów, z czego ekspresja $17 \pm 5\%$ z nich uległa podwyższeniu, a $10 \pm 4\%$ obniżeniu. W niniejszej rozprawie skoncentrowano się na tych genach, których ekspresja uległa znaczącemu podwyższeniu (co najmniej dwukrotnie), a ich białkowe produkty mogą być zaangażowane w różne elementy progresji procesu nowotworowego. Wśród tych genów wyróżnić można geny dla czynników promujących zjawisko adhezji, angiogenezę, przebieg reakcji zapalnej oraz syntezę i przebudowę struktur ECM (**Tabela 9**).

Tabela 9. Geny, których ekspresja uległa podwyższeniu w trakcie replikacyjnego starzenia się LKMO *in vitro*. Dane wyrażone są jako średnia krotność wzrostu względem komórek młodych (\pm SD). Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych na pierwotnych hodowlach LKMO wyizolowanych od 6 różnych dawców. W tabeli ujęte są tylko te geny, których ekspresja rosła w sposób zgodny we wszystkich badanych hodowlach.

| FUNKCJA | GEN | ZMIANA (średnia \pm SD) |
|-----------------|-----------------------|------------------------------|
| adhezja | E-kadheryna | $2,6 \pm 0,1$ |
| | integryna $\alpha 7$ | $3,4 \pm 0,3$ |
| | integryna $\alpha 8$ | $6,4 \pm 0,4$ |
| | integryna $\alpha 11$ | $3,3 \pm 0,2$ |
| | integryna $\beta 1$ | $3,2 \pm 0,2$ |
| | integryna $\beta 3$ | $2,1 \pm 0,3$ |
| | integryna $\beta 4$ | $2,1 \pm 0,2$ |
| angiogeneza | angiopoetyna-1 | $3,1 \pm 0,4$ |
| | CXCL1/GRO-1 | $3,3 \pm 0,3$ |
| | CXCL8/IL-8 | $3,5 \pm 0,2$ |
| | FGF2 | $4,4 \pm 0,4$ |
| | HIF3 | $3,2 \pm 0,3$ |
| | VEGF | $2,1 \pm 0,3$ |
| reakcja zapalna | IL-6 | $3,3 \pm 0,1$ |
| | ICAM-1 | $5,6 \pm 0,4$ |
| | CXCL5 | $2,1 \pm 0,3$ |
| | CCL12 | $4,1 \pm 0,4$ |

| | | |
|--------------------------|------------------------|-----------|
| | CCL26 | 3,3 ± 0,1 |
| synteza i przebudowa ECM | ADAM | 3,3 ± 0,2 |
| | biglikan | 3,4 ± 0,2 |
| | CTGF | 2,7 ± 0,1 |
| | fibulina 1 | 3,5 ± 0,4 |
| | fibronektyna | 3,5 ± 0,4 |
| | kolagen I | 2,2 ± 0,3 |
| | kolagen IV | 3,2 ± 0,2 |
| | kolagen VI | 3,1 ± 0,3 |
| | kolagen XII | 3,2 ± 0,4 |
| | kolagen XV | 6,1 ± 0,5 |
| | kolagen XVI | 3,2 ± 0,3 |
| | MMP-3 | 8,4 ± 0,2 |
| | MMP-12 | 2,8 ± 0,5 |
| | PAI-1 | 4,8 ± 0,3 |
| | TGF-β1 | 3,4 ± 0,1 |
| | TGF-β2 | 2,1 ± 0,1 |
| | receptor III dla TGF-β | 2,7 ± 0,2 |
| | TIMP-1 | 2,9 ± 0,3 |
| | u-PA | 2,7 ± 0,4 |
| | TSP-1 | 7,4 ± 0,4 |
| witronektyna | 5,1 ± 0,3 | |

4.10. Wpływ replikacyjnego starzenia na zmiany ekspresji genów w LKMO - analiza metodą PCR

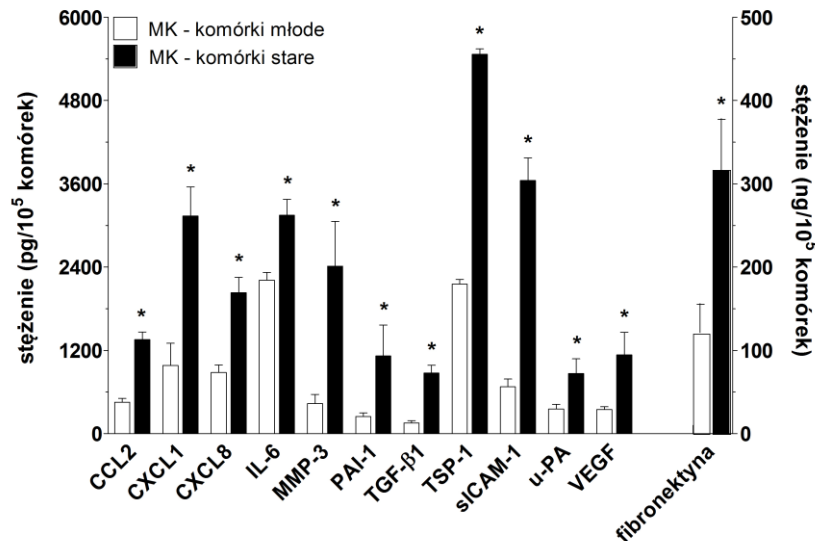
Po przeprowadzeniu analizy mikromacierzowej, uzyskane wyniki, dotyczące zmian ekspresji genów w trakcie replikacyjnego starzenia się LKMO zweryfikowano dla arbitralnie wybranej grupy celów za pomocą ilościowej metody PCR. Badania wykazały istotny statystycznie wzrost większości genów poddanych badaniu. Tylko w przypadku genów dla: FGF2, CXCL5, CTGF, MMP-12 i TGFα wynik badania przeprowadzonego metodą PCR nie potwierdził wzrostu ekspresji, wykazanego uprzednio metodą mikromacierzy (**Tabela 10**).

Tabela 10. Wyniki porównania ekspresji wybranych genów w młodych i starych LKMO za pomocą ilościowej metody PCR. Dane wyrażone są jako średnia względna ekspresja genu (\pm SD). Wyniki pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych na pierwotnych hodowlach LKMO wyizolowanych od 6 różnych dawców. b.i.s. - brak istotności statystycznej.

| FUNKCJA | GEN | Komórki młode średnia \pm SD | Komórki stare średnia \pm SD | Istotność statystyczna |
|-------------------------------------|----------------|--|--|-----------------------------------|
| angiogeneza | angiopoetyna-1 | 0,9 \pm 0,3 | 1,9 \pm 0,3 | P<0,04 |
| | CXCL1/GRO-1 | 1,1 \pm 0,2 | 2,7 \pm 0,3 | P<0,04 |
| | CXCL8/IL-8 | 0,4 \pm 0,05 | 1,4 \pm 0,2 | P<0,01 |
| | FGF2 | 1,2 \pm 0,3 | 1,4 \pm 0,2 | b.i.s. |
| | VEGF | 0,8 \pm 0,1 | 3,1 \pm 0,4 | P<0,03 |
| reakcja zapalna | CCL2/MCP-1 | 0,5 \pm 0,05 | 1,3 \pm 0,06 | P<0,04 |
| | CXCL5 | 0,3 \pm 0,08 | 0,3 \pm 0,05 | b.i.s. |
| | IL-6 | 0,6 \pm 0,08 | 1,9 \pm 0,4 | P<0,04 |
| | ICAM-1 | 0,3 \pm 0,04 | 0,6 \pm 0,05 | P<0,05 |
| synteza i przebudowa ECM | kolagen I | 0,4 \pm 0,08 | 0,9 \pm 0,1 | P<0,05 |
| | kolagen XII | 0,6 \pm 0,07 | 1,3 \pm 0,2 | P<0,05 |
| | CTGF | 0,5 \pm 0,1 | 0,4 \pm 0,07 | b.i.s. |
| | fibronektyna | 0,7 \pm 0,1 | 2,7 \pm 0,7 | P<0,03 |
| | MMP-3 | 0,4 \pm 0,08 | 1,0 \pm 0,09 | P<0,04 |
| | MMP-12 | 0,8 \pm 0,03 | 0,7 \pm 0,09 | b.i.s. |
| | PAI-1 | 0,7 \pm 0,08 | 1,7 \pm 0,05 | P<0,05 |
| | TGF α | 0,3 \pm 0,05 | 0,3 \pm 0,02 | b.i.s. |
| | TGF β | 0,3 \pm 0,06 | 0,7 \pm 0,09 | P<0,04 |
| | TIMP-1 | 0,5 \pm 0,1 | 1,8 \pm 0,1 | P<0,04 |
| | TSP-1 | 0,2 \pm 0,04 | 1,9 \pm 0,3 | P<0,03 |
| | u-PA | 0,6 \pm 0,05 | 2,8 \pm 0,08 | P<0,03 |
| witronektyna | 0,7 \pm 0,1 | 3,1 \pm 0,4 | P<0,01 | |

4.11. Wpływ replikacyjnego starzenia na właściwości wydzielnicze LKMO

W celu określenia towarzyszących starzeniu zmian właściwości sekrecyjnych LKMO, próbki medium kondycjonowanego (MK) z hodowli komórek młodych i starych zbadano pod kątem stężenia rozpuszczalnych form wybranych czynników, których geny cechowały się wzrostem ekspresji, wykazanym za pomocą ilościowej metody PCR. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że replikacyjne starzenie się LKMO jest związane ze wzrostem wydzielania CCL2/MCP-1 (o $200 \pm 21\%$, $P < 0,03$), CXCL1/GRO-1 (o $219 \pm 47\%$, $P < 0,01$), CXCL8/IL-8 (o $131 \pm 15\%$, $P < 0,04$), IL-6 (o $42 \pm 11\%$, $P < 0,04$), MMP-3 (o $448 \pm 78\%$, $P < 0,04$), PAI-1 (o $357 \pm 43\%$, $P < 0,03$), TGF- β 1 (o $466 \pm 33\%$, $P < 0,04$), TSP-1 (o $153 \pm 41\%$, $P < 0,03$), ICAM-1 (o $440 \pm 134\%$, $P < 0,05$), u-PA (o $144 \pm 44\%$, $P < 0,03$), VEGF (o $228 \pm 98\%$, $P < 0,05$) i fibronektyny (o $158 \pm 64\%$, $P < 0,04$) (**Rycina 22**).



Rycina 22. Porównanie profilu wydzielniczego młodych (□) i starych (■) LKMO. Ze względu na zmianę rzędu wielkości, wartości stężeń fibronektyny odniesiono do prawej osi X. Dane przedstawiają wartości średnie \pm SD. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami młodymi. Dane pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych z wykorzystaniem LKMO wyizolowanych od 14 różnych dawców.

4.12. Wpływ egzogennych form czynników wydzielanych w zwiększonych stężeniach przez stare LKMO na proliferację i migrację komórek raka jajnika

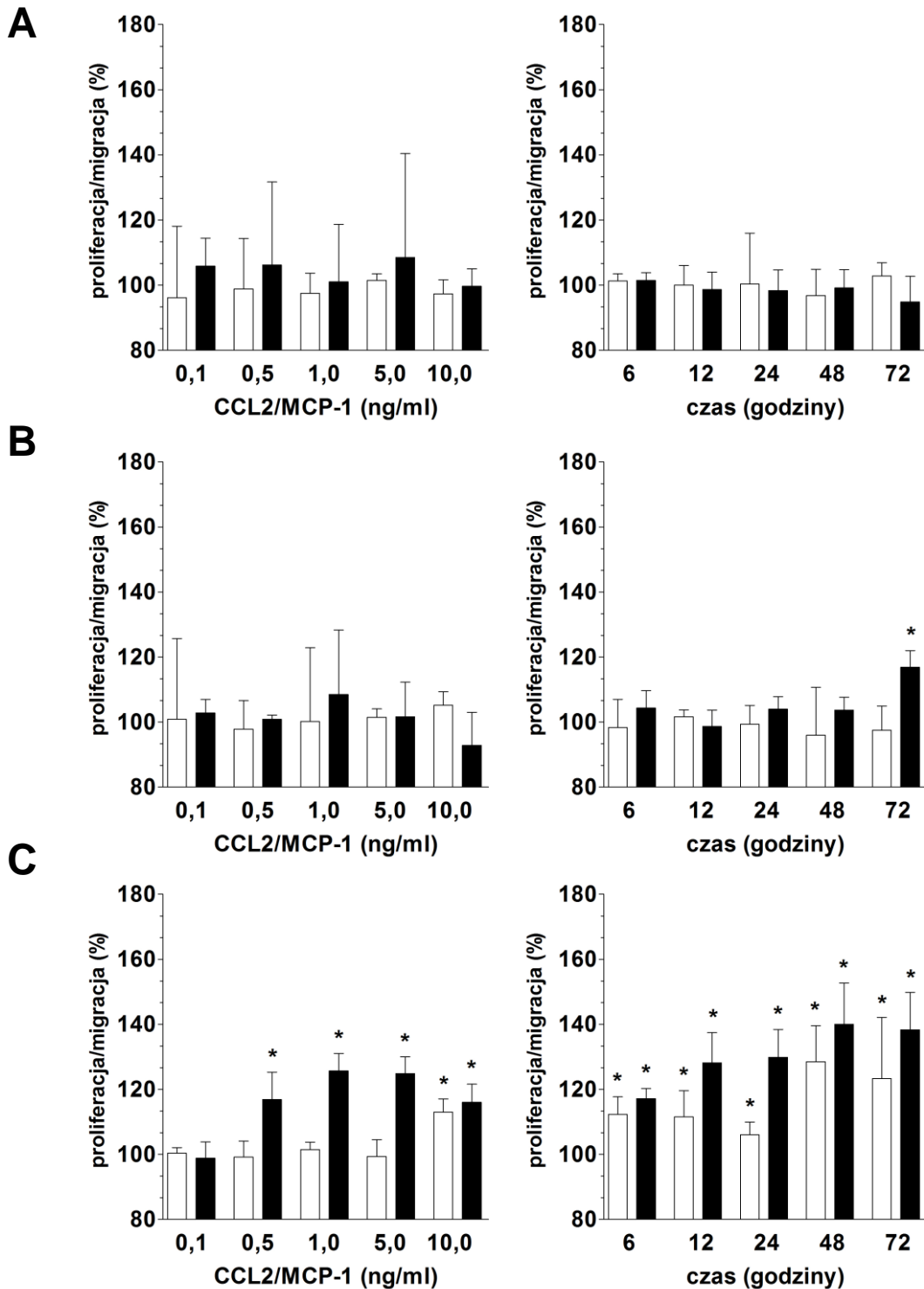
Aby zidentyfikować mediatory wzmożonej proliferacji i migracji komórek raka jajnika pod wpływem MK z hodowli starych LKMO, komórki nowotworowe eksponowano na rekombinowane formy czynników, wydzielanych w zwiększonych stężeniach przez komórki stare. W pierwszej grupie doświadczeń, mającej na celu określenie odpowiedzi komórek zależnej od dawki, komórki eksponowano przez 6 godzin na dany czynnik, zastosowany w stężeniach 0,1-10 ng/ml (100-1000 ng/ml dla fibronektyny). Wybrane stężenia korespondowały z wartościami, stwierdzanymi w próbkach MK z komórek starych. Ponadto, wykorzystując najniższe z badanych stężeń, które wywołało działanie pobudzające proliferację lub migrację, przeprowadzono badanie reakcji komórek w funkcji czasu, w przedziale 6-72 godziny. W przypadku czynników, które w pierwszej grupie doświadczeń (efekt dawki) nie wywoływały zmian istotnych statystycznie, w sposób arbitralny wybierano stężenie o względnie najsilniejszym działaniu i oceniano, czy jego wpływ może wzrastać wraz z wydłużeniem czasu ekspozycji.

4.12.1. Działanie egzogennej, rekombinowanej formy CCL2/MCP-1

Badania z wykorzystaniem CCL2/MCP-1 wykazały, że w przypadku komórek A2780, chemokina ta nie wpływa na zmianę ich proliferacji lub migracji. Brak efektu dostrzeżono w doświadczeniach z rosnącymi dawkami CCL2/MCP-1, jak również w badaniach odpowiedzi komórek w funkcji czasu (**Rycina 23A**).

W odniesieniu do linii OVCAR-3, badania reakcji na rosnące stężenia CCL2/MCP-1 nie wykazały zmian proliferacji i migracji. Także wydłużenie czasu ekspozycji nie wpłynęło na pierwszy z procesów. Z kolei wydłużenie ekspozycji komórek na CCL2/MCP-1 (1 ng/ml) do 72 godzin, spowodowało wzrost migracji o $17 \pm 5\%$ ($P < 0,04$) (**Rycina 23B**).

W komórkach SKOV-3, proliferacja komórek eksponowanych na CCL2/MCP-1 w stężeniu 10 ng/ml wzrosła o $13 \pm 4\%$ ($P < 0,04$), a przedłużenie inkubacji efekt ten jeszcze nasiliło. Przykładowo, po 48 godzinach, proliferacja komórek wzrosła o $29 \pm 11\%$ ($P < 0,05$). Jednocześnie, badany czynnik, począwszy od stężenia 0,5 ng/ml, stymulował migrację komórek (dla tej dawki o $17 \pm 8\%$, $P < 0,05$). Najwyższe pobudzenie (o $26 \pm 5\%$, $P < 0,04$) odnotowano dla stężenia 1 ng/ml. W wyniku przedłużenia ekspozycji na CCL2/MCP-1 (0,5 ng/ml), działanie tego czynnika wzrosło, czego przykładem było nasilenie migracji komórek o $40 \pm 13\%$ ($P < 0,04$) po 48 godzinach ekspozycji (**Rycina 23C**).



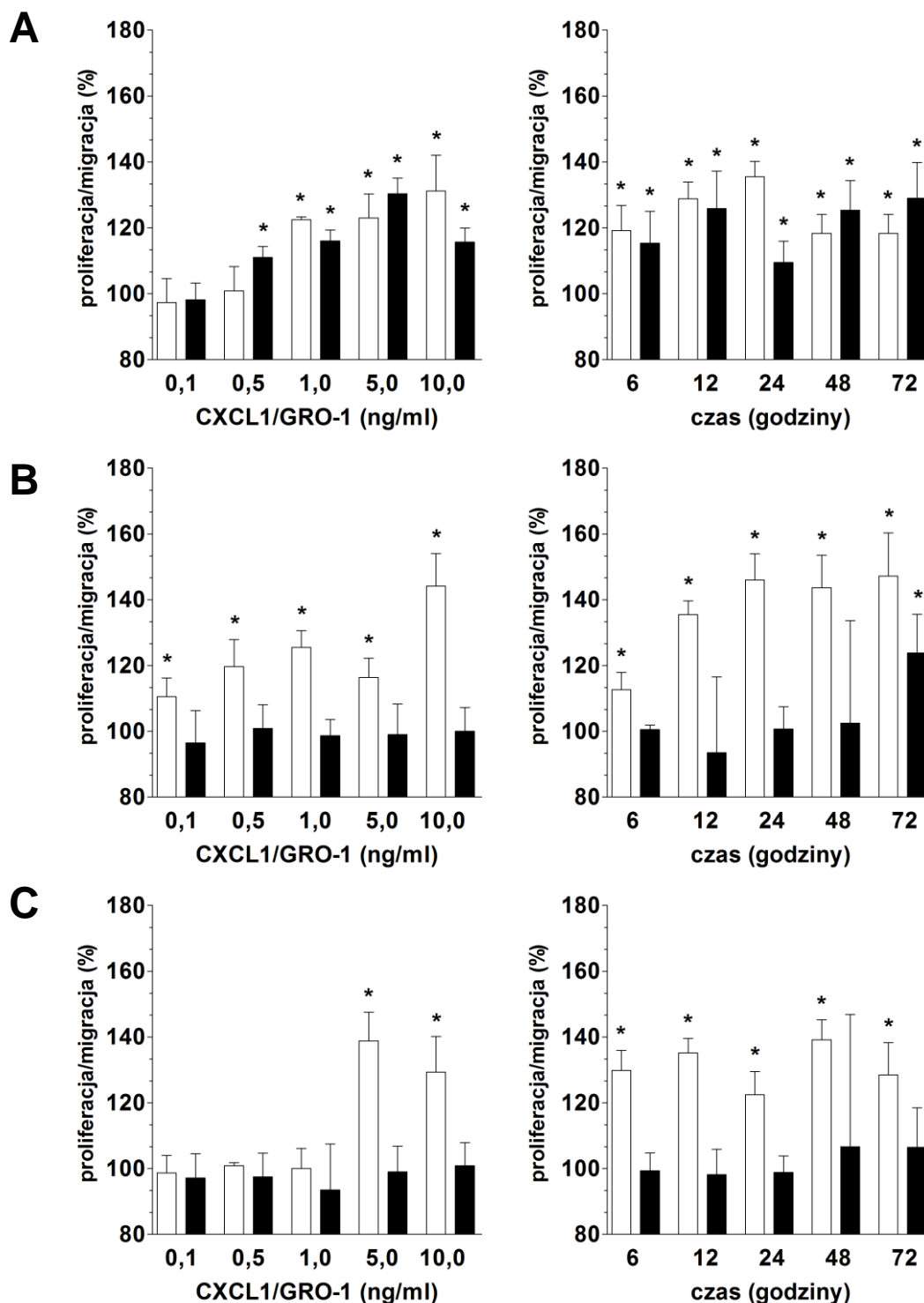
Rycina 23. Wpływ egzogennej, rekombinowanej formy CCL2/MCP-1 na proliferację (□) i migrację (■) komórek raka jajnika A2780 (A), OVCAR-3 (B) i SKOV-3 (C). Wykresy po lewej stronie ilustrują efekt zależny od dawki, natomiast wykresy po prawej stronie – efekt zależny od czasu ekspozycji. Dane przedstawiają wartości średnie \pm SD. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami grupy kontrolnej, traktowanymi jako 100%. Dane pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w sześciu powtórzeniach.

4.12.2. Działanie egzogennej, rekombinowanej formy CXCL1/GRO-1

Badania z wykorzystaniem egzogennej, rekombinowanej formy CXCL1/GRO-1 wykazały, że chemokina ta, począwszy od stężenia 1 ng/ml, powoduje pobudzenie proliferacji komórek A2780. Przy wspomnianej dawce, proliferacja komórek wzrosła o $23 \pm 4\%$ ($P < 0,04$), natomiast najsilniejszy efekt odnotowano przy stężeniu 10 ng/ml, kiedy to pobudzenie proliferacji wyniosło $31 \pm 11\%$ ($P < 0,05$). Zaobserwowano także, że wydłużenie czasu inkubacji komórek z badaną chemokina w stężeniu 1 ng/ml wiązało się z dalszym nasileniem proliferacji, a największy efekt odnotowano po 24 godzinach ekspozycji (wzrost o $36 \pm 5\%$ ($P < 0,03$)). Oceniając migrację komórek A2780 stwierdzono, że CXCL1/GRO-1 zwiększa efektywność tego procesu począwszy od stężenia 0,5 ng/ml (wzrost o $11 \pm 3\%$, $P < 0,05$). Najsilniejszy efekt odnotowano natomiast przy stężeniu 5 ng/ml, kiedy to migracja komórek wzrosła o $30 \pm 5\%$ ($P < 0,03$). Przedłużenie ekspozycji komórek na CXCL1/GRO-1 w stężeniu 0,5 ng/ml doprowadziło do dalszego wzrostu migracji, która po 72 godzinach była wyższa o $29 \pm 11\%$ ($P < 0,04$) w porównaniu z komórkami kontrolnymi (**Rycina 24A**).

W odniesieniu do linii OVCAR-3, chemokina CXCL1/GRO-1 pobudzała proliferację już od najniższego z zastosowanych stężeń (wzrost o $10 \pm 6\%$, $P < 0,05$), najsilniejsze działanie wykazując przy stężeniu 10 ng/ml (wzrost o $44 \pm 10\%$, $P < 0,03$). W wyniku przedłużenia ekspozycji komórek na CXCL1/GRO-1 (0,1 ng/ml) nastąpił wzrost siły działania tej chemokiny, przejawiający się pobudzeniem proliferacji komórek o $36 \pm 4\%$ ($P < 0,04$) po 12 godzinach inkubacji oraz o $47 \pm 13\%$ ($P < 0,04$) po 72 godzinach inkubacji. W odniesieniu do migracji komórek, nie odnotowano zmian efektywności tego procesu wskutek ich ekspozycji na rosnące stężenia badanej chemokiny (w czasie 6 godzin), natomiast ekspozycja na stężenie 0,5 ng/ml przedłużona do 72 godzin zaowocowała wzrostem migracji o $24 \pm 12\%$ ($P < 0,05$) (**Rycina 24B**).

W przypadku komórek linii SKOV-3, ekspozycja komórek na CXCL1/GRO-1 spowodowała wzrost proliferacji o $39 \pm 9\%$ ($P < 0,04$) przy stężeniu 5 ng/ml oraz o $29 \pm 11\%$ ($P < 0,04$) przy stężeniu 10 ng/ml. Przedłużenie ekspozycji na pierwsze ze stężeń nie wiązało się z dalszym wzrostem efektywności proliferacji komórek (po 48 godzinach, pobudzenie wynosiło nadal $39 \pm 6\%$, $P < 0,03$). Jednocześnie, nie odnotowano wpływu chemokiny CXCL1/GRO-1 na zmianę efektywności migracji komórek SKOV-3, zarówno przy rosnących stężeniach egzogennej chemokiny, jak również w wyniku wydłużenia czasu ekspozycji (**Rycina 24C**).



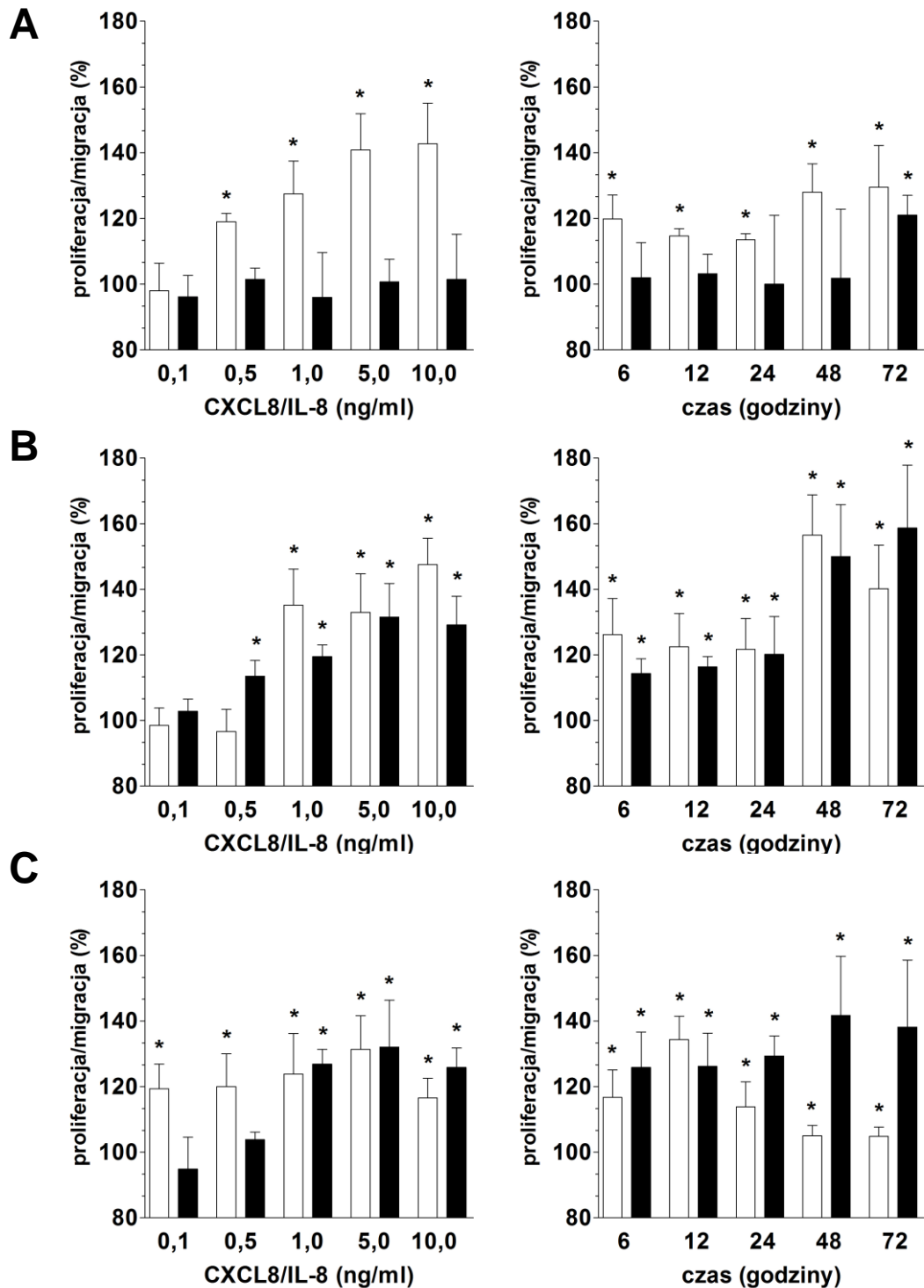
Rycina 24. Wpływ egzogennej, rekombinowanej formy CXCL1/GRO-1 na proliferację (□) i migrację (■) komórek raka jajnika A2780 (A), OVCAR-3 (B) i SKOV-3 (C). Wykresy po lewej stronie ilustrują efekt zależny od dawki, natomiast wykresy po prawej stronie – efekt zależny od czasu ekspozycji. Dane przedstawiają wartości średnie ± SD. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami grupy kontrolnej, traktowanymi jako 100%. Dane pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w sześciu powtórzeniach.

4.12.3. Działanie egzogennej, rekombinowanej formy CXCL8/IL-8

Badania na komórkach A2780 wykazały, że chemokina CXCL8/IL-8 pobudza zjawisko proliferacji już od stężenia 0,5 ng/ml (wzrost o $19 \pm 3\%$, $P < 0,05$). Najsilniejszy efekt zaobserwowano natomiast przy stężeniu 10 ng/ml, kiedy to proliferacja wzrosła o $43 \pm 12\%$ ($P < 0,04$). Przedłużenie czasu ekspozycji na badaną chemokinę w stężeniu 0,5 ng/ml spowodowało niewielki wzrost reakcji komórek, czego odzwierciedleniem był wzrost proliferacji o $30 \pm 13\%$ ($P < 0,05$) po 72 godzinach ekspozycji. Oceniając zdolności migracyjne komórek stwierdzono, że badana chemokina, użyta w testowanym zakresie stężeń nie wpływa na zmianę efektywności tego procesu po 6 godzinach ekspozycji. Jednocześnie jednak, przedłużenie czasu ekspozycji komórek na CXCL8/IL-8 w stężeniu 10 ng/ml do 72 godzin spowodowało wzrost migracji o $21 \pm 6\%$ ($P < 0,04$) (**Rycina 25A**).

W przypadku komórek OVCAR-3 odnotowano wzrost ich proliferacji w odpowiedzi na działanie CXCL8/IL-8. Efekt ten był widoczny począwszy od stężenia 1 ng/ml (wzrost o $35 \pm 11\%$, $P < 0,04$), a najsilniejsze działanie zaobserwowano przy stężeniu 10 ng/ml (wzrost o $48 \pm 8\%$, $P < 0,01$). Przedłużenie ekspozycji komórek na badaną chemokinę w stężeniu 1 ng/ml spowodowało dalszy wzrost ich proliferacji, czego dowodem było pobudzenie tego procesu o $57 \pm 12\%$ ($P < 0,03$) po 48 godzinach inkubacji. W przypadku komórek OVCAR-3 stwierdzono także, że chemokina CXCL8/IL-8 użyta w stężeniu 0,5 ng/ml pobudza ich migrację o $14 \pm 5\%$ ($P < 0,05$), najsilniejsze działanie osiągając przy stężeniu 5 ng/ml (wzrost o $32 \pm 10\%$, $P < 0,04$). W wyniku przedłużenia ekspozycji na CXCL8/IL-8 w stężeniu 0,5 ng/ml zaobserwowano dalsze wzmocnienie efektu działania tej chemokiny, czego dowodem był wzrost migracji komórek o $59 \pm 9\%$ ($P < 0,03$) po 72 godzinach inkubacji (**Rycina 25B**).

W odniesieniu do komórek SKOV-3, chemokina CXCL8/IL-8 pobudzała proliferację komórek już od stężenia 0,1 ng/ml (wzrost o $19 \pm 8\%$, $P < 0,05$), natomiast najsilniejszy efekt odnotowano przy stężeniu 5 ng/ml (wzrost o $31 \pm 10\%$, $P < 0,05$). Efektem wydłużenia czasu ekspozycji na badaną chemokinę w stężeniu 0,1 ng/ml był wzrost jej siły działania, przejawiający się pobudzeniem proliferacji o $34 \pm 7\%$ ($P < 0,04$) po 12 godzinach ekspozycji. Badania migracji wykazały natomiast, że pobudzenie tego zjawiska następuje pod wpływem CXCL8/IL-8 już od stężenia 1 ng/ml (wzrost o $27 \pm 4\%$, $P < 0,05$), a największy efekt stwierdzono przy stężeniu 5 ng/ml (wzrost o $32 \pm 14\%$, $P < 0,04$). Przedłużenie inkubacji z egzogenną formą CXCL8/IL-8 w stężeniu 1 ng/ml spowodowało dalsze nasilenie migracji, czego odzwierciedleniem był wzrost efektywności tego zjawiska o $42 \pm 18\%$ ($P < 0,04$) po 48 godzinach ekspozycji (**Rycina 25C**).



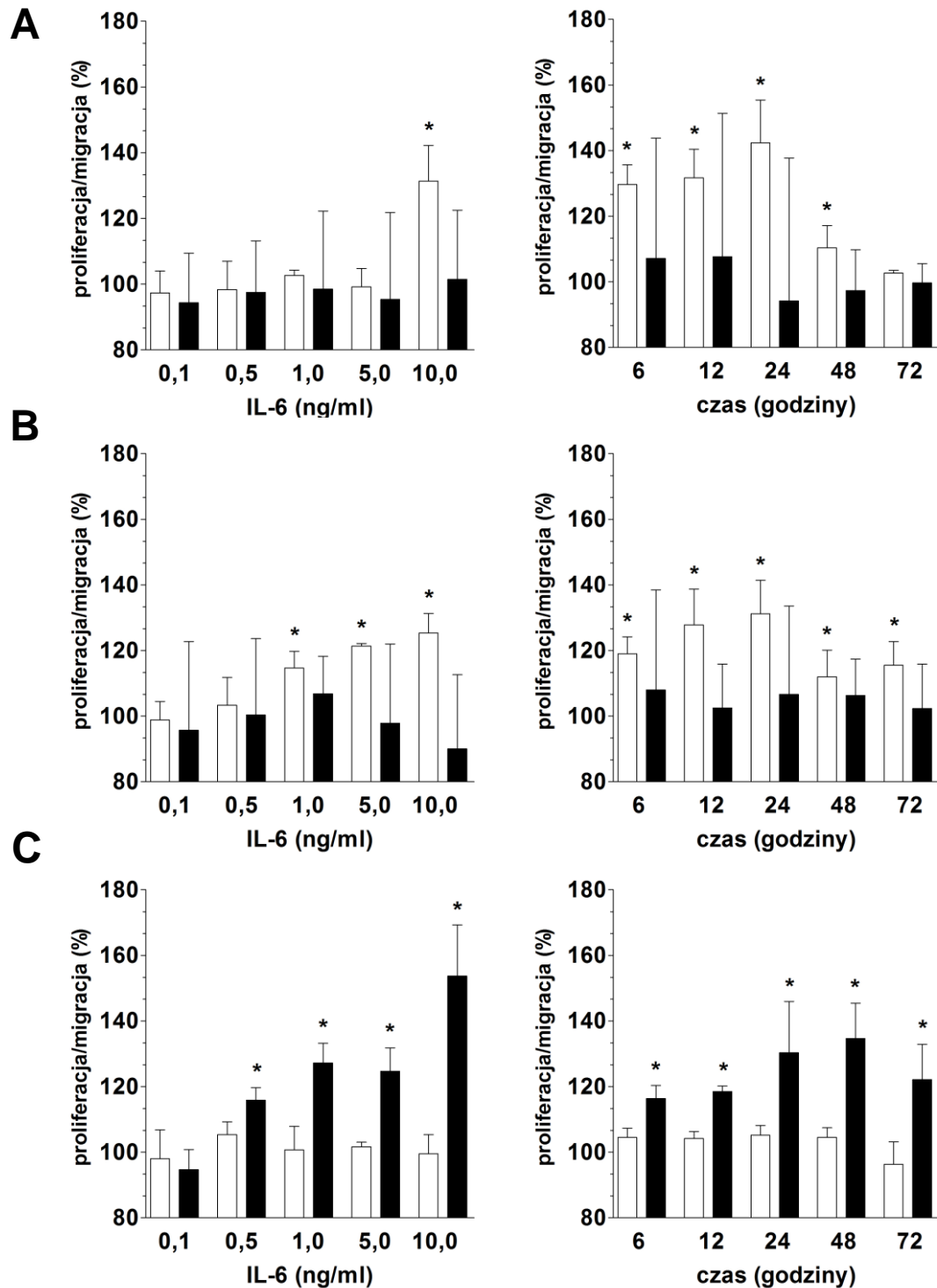
Rycina 25. Wpływ egzogennej, rekombinowanej formy CXCL8/IL-8 na proliferację (□) i migrację (■) komórek raka jajnika A2780 (A), OVCAR-3 (B) i SKOV-3 (C). Wykresy po lewej stronie ilustrują efekt zależny od dawki, natomiast wykresy po prawej stronie – efekt zależny od czasu ekspozycji. Dane przedstawiają wartości średnie \pm SD. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami grupy kontrolnej, traktowanymi jako 100%. Dane pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w sześciu powtórzeniach.

4.12.4. Działanie egzogennej, rekombinowanej formy IL-6

Komórki raka jajnika A2780 poddawane działaniu egzogennej, rekombinowanej formy IL-6 odpowiedziały wzrostem proliferacji dopiero przy zastosowaniu stężenia 10 ng/ml (wzrost o $31 \pm 11\%$, $P < 0,04$). Przedłużenie ekspozycji komórek spowodowało dalszy, nieznaczny wzrost proliferacji, która po 24 godzinach inkubacji była podwyższona o $42 \pm 13\%$ ($P < 0,03$). W odniesieniu do komórek linii A2780 nie stwierdzono wpływu IL-6 na migrację komórek, zarówno w doświadczeniach uwzględniających rosnące stężenia badanego czynnika, jak również wydłużony czas ekspozycji (**Rycina 26A**).

Badania przeprowadzone na komórkach linii OVCAR-3 wykazały natomiast, że w przypadku tej grupy komórek IL-6 pobudza proliferację już przy stężeniu 1 ng/ml (wzrost o $15 \pm 5\%$, $P < 0,05$), a najsilniejszy wpływ wywiera przy stężeniu 10 ng/ml (wzrost o $25 \pm 6\%$, $P < 0,04$). Wydłużenie czasu ekspozycji komórek na IL-6 w stężeniu 1 ng/ml spowodowało dalszy wzrost jej działania, który objawił się nasileniem proliferacji komórek o $31 \pm 10\%$, $P < 0,04$ po 24 godzinach inkubacji. Oceniając z kolei wpływ IL-6 na migrację komórek OVCAR-3 stwierdzono, że podobnie jak w przypadku komórek linii A2780, efektywność migracji badanych komórek pod wpływem działania tej cytokiny nie ulega zmianie (**Rycina 26B**).

Badania na trzeciej linii komórek raka jajnika, SKOV-3, wykazały, że w przeciwieństwie do komórek A2780 i OVCAR-3, egzogenna rekombinowana forma IL-6 nie wpływa na zmiany proliferacji tej grupy komórek. Brak efektu był zauważalny zarówno w doświadczeniach przeprowadzonych z rosnącymi dawkami IL-6, jak również w badaniach uwzględniających wydłużenie czasu ekspozycji do 72 godzin. Z kolei oceniając migrację komórek stwierdzono, że IL-6 posiada zdolność pobudzania tego procesu już od stężenia 0,5 ng/ml (wzrost o $16 \pm 4\%$, $P < 0,05$). Najsilniejszy efekt odnotowano natomiast dla stężenia 10 ng/ml, kiedy to wzrost migracji komórek wyniósł $54 \pm 16\%$ ($P < 0,03$). W badaniach uwzględniających wydłużenie czasu ekspozycji komórek na IL-6 w stężeniu 0,5 ng/ml stwierdzono, że efekty działania tej cytokiny rosną wraz z czasem inkubacji. Przykładowo, po 48 godzinach ekspozycji, migracja komórek SKOV-3 wzrosła o $35 \pm 11\%$ ($P < 0,04$) w porównaniu z grupą kontrolną (**Rycina 26C**).



Rycina 26. Wpływ egzogennej, rekombinowanej formy IL-6 na proliferację (□) i migrację (■) komórek raka jajnika A2780 (A), OVCAR-3 (B) i SKOV-3 (C). Wykresy po lewej stronie ilustrują efekt zależny od dawki, natomiast wykresy po prawej stronie – efekt zależny od czasu ekspozycji. Dane przedstawiają wartości średnie \pm SD. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami grupy kontrolnej, traktowanymi jako 100%. Dane pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w sześciu powtórzeniach.

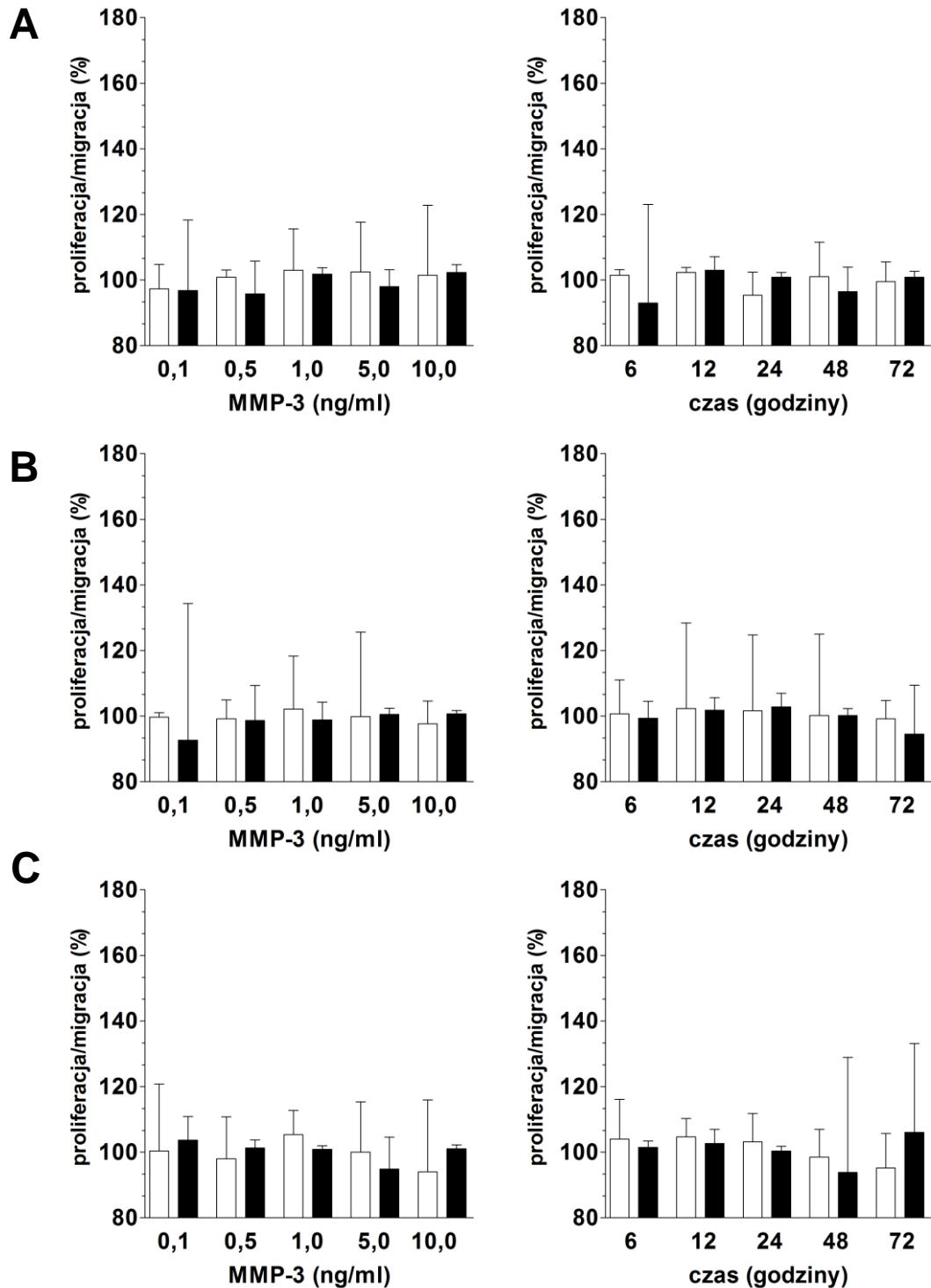
4.12.5. Działanie egzogennej, rekombinowanej formy MMP-3

Badania przeprowadzone z wykorzystaniem egzogennej, rekombinowanej formy MMP-3 wykazały, że czynnik ten nie wpływa na zmianę proliferacji oraz migracji w żadnej z testowanych linii komórek nowotworowych. Efektu nie stwierdzono zarówno w doświadczeniach z rosnącymi stężeniami MMP-3, jak i w badaniach reakcji komórek w funkcji czasu (**Rycina 27**).

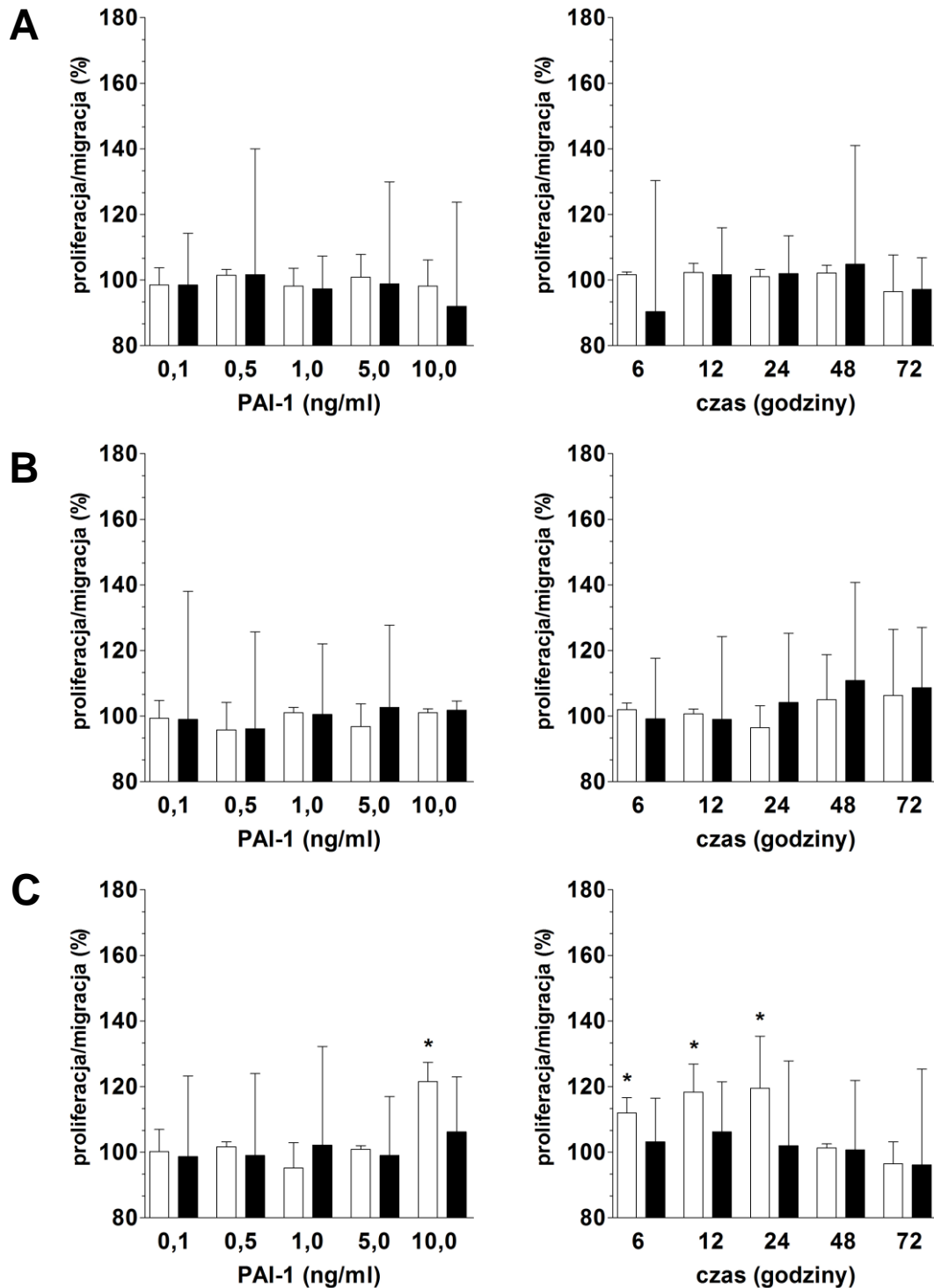
4.12.6. Działanie egzogennej, rekombinowanej formy PAI-1

Badania z użyciem egzogennej, rekombinowanej formy PAI-1 wykazały, że w przypadku komórek raka jajnika linii A2780 i OVCAR-3, czynnik ten nie wpływa na zmiany efektywności ich proliferacji oraz migracji (**Rycina 28A i 28B**).

W przypadku badań komórek linii SKOV-3, odnotowano wzrost ich proliferacji pod wpływem rekombinowanej formy PAI-1, zastosowanej w stężeniu 10 ng/ml (wzrost o $22 \pm 6\%$, $P < 0,04$). W wyniku wydłużenia czasu ekspozycji komórek nie zaobserwowano dalszego, istotnego wzrostu migracji. Najsilniejszy efekt w tych badaniach odnotowano, gdy komórki SKOV-3 poddawano działaniu PAI-1 w stężeniu 10 ng/ml przez 24 godziny, kiedy to wzrost proliferacji komórek wyniósł $20 \pm 16\%$, $P < 0,05$). W odniesieniu do zjawiska migracji, podobnie jak w przypadku komórek A2780 i OVCAR-3, egzogenna forma PAI-1 nie wpływała na zmianę efektywności tego procesu w komórkach SKOV-3 (**Rycina 28C**).



Rycina 27. Wpływ egzogennej, rekombinowanej formy MMP-3 na proliferację (□) i migrację (■) komórek raka jajnika A2780 (A), OVCAR-3 (B) i SKOV-3 (C). Wykresy po lewej stronie ilustrują efekt zależny od dawki, natomiast wykresy po prawej stronie – efekt zależny od czasu ekspozycji. Dane przedstawiają wartości średnie ± SD. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami grupy kontrolnej, traktowanymi jako 100%. Dane pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w sześciu powtórzeniach.



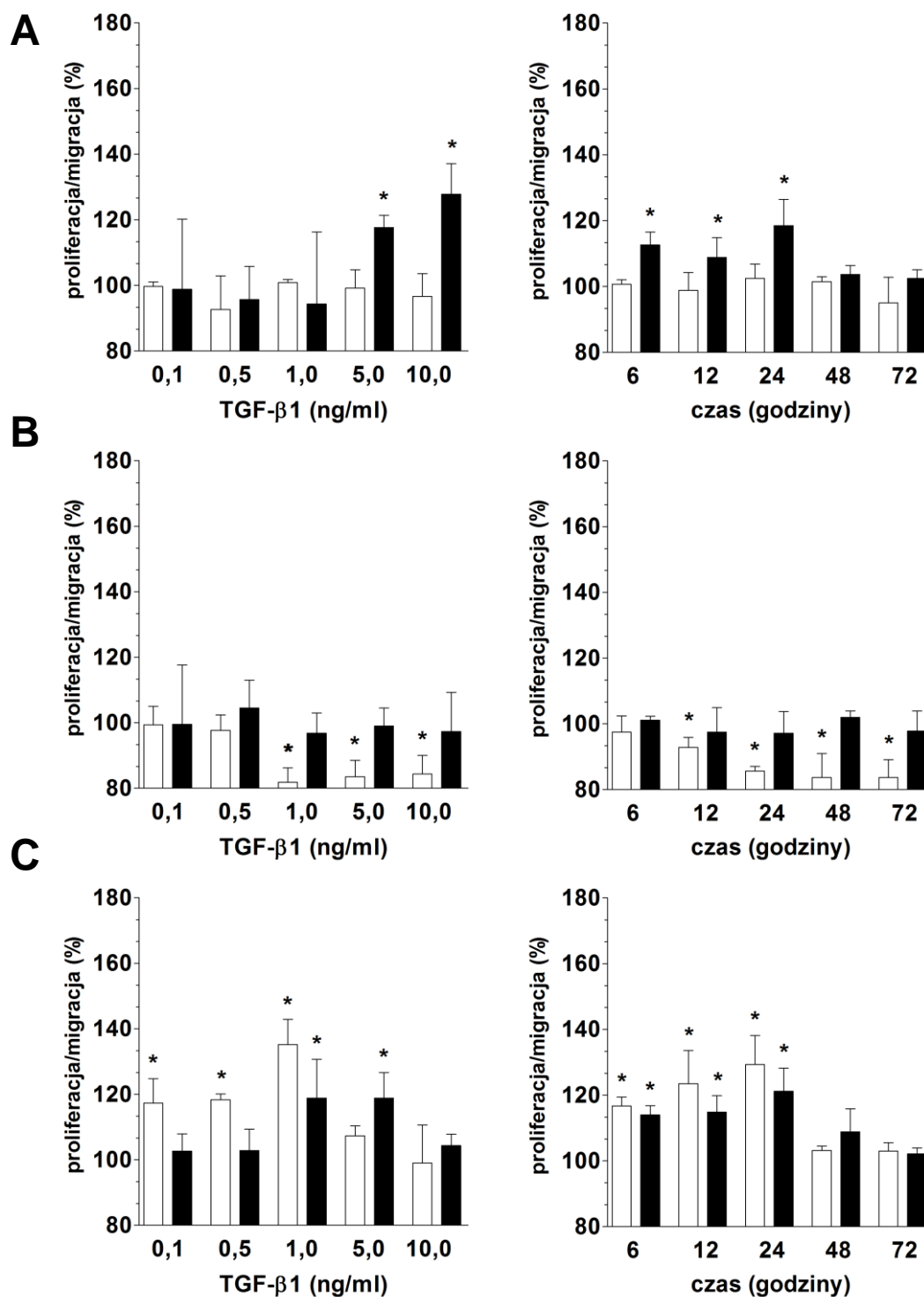
Rycina 28. Wpływ egzogennej, rekombinowanej formy PAI-1 na proliferację (□) i migrację (■) komórek raka jajnika A2780 (A), OVCAR-3 (B) i SKOV-3 (C). Wykresy po lewej stronie ilustrują efekt zależny od dawki, natomiast wykresy po prawej stronie – efekt zależny od czasu ekspozycji. Dane przedstawiają wartości średnie ± SD. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami grupy kontrolnej, traktowanymi jako 100%. Dane pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w sześciu powtórzeniach.

4.12.7. Działanie egzogennej, rekombinowanej formy TGF- β 1

Badania przeprowadzone na komórkach A2780 wykazały, że TGF- β 1 nie wpływa na zmianę ich proliferacji. Czynniki ten zwiększa natomiast migrację komórek, poczynając od stężenia 5 ng/ml, kiedy to migracja wzrosła o $18 \pm 4\%$ ($P < 0,05$). Najsilniejszy efekt odnotowano natomiast przy stężeniu 10 ng/ml, kiedy wzrost migracji wyniósł $28 \pm 9\%$ ($P < 0,04$). W efekcie wydłużenia ekspozycji komórek na TGF- β 1 w stężeniu 5 ng/ml nie odnotowano dalszego wzmocnienia działania tego czynnika. Przykładowo, po 24 godzinach ekspozycji, migracja komórek była podwyższona o $19 \pm 8\%$ ($P < 0,05$) (**Rycina 29A**).

W wyniku ekspozycji komórek OVCAR-3 na TGF- β 1 nastąpiło zahamowanie proliferacji komórek, a efekt ten zaobserwowano przy stężeniu 1 ng/ml (zmiana o $18 \pm 4\%$, $P < 0,04$). Zahamowanie proliferacji komórek odnotowano także dla stężeń 5 ng/ml i 10 ng/ml, jednak odnotowane zmiany były porównywalne z działaniem TGF- β 1 w dawce 1 ng/ml. Istotnej zmiany siły oddziaływania rekombinowanej formy TGF- β 1 nie stwierdzono także w wyniku ekspozycji komórek na badany czynnik w dawce 0,1 ng/ml, przedłużonej do 72 godzin. W tym przypadku bowiem zaobserwowano, iż stężenie to także wywiera działanie anty-proliferacyjne, czego przejawem było zmniejszenie efektywności tego procesu o $16 \pm 5\%$ ($P < 0,04$) po 48 godzinach ekspozycji. W odniesieniu do zjawiska migracji, egzogenne TGF- β 1 okazał się nie wpływać na ten proces w komórkach OVCAR-3, niezależnie od zastosowanego stężenia lub czasu ekspozycji (**Rycina 29B**).

Doświadczenia przeprowadzone na komórkach nowotworowych SKOV-3 wykazały, że TGF- β 1 pobudza ich proliferację przy stężeniu 0,1 ng/ml (o $17 \pm 7\%$, $P < 0,05$), stężeniu 0,5 ng/ml (o $18 \pm 2\%$, $P < 0,04$) oraz stężeniu 1 ng/ml (o $35 \pm 8\%$, $P < 0,03$), natomiast przy wyższych stężeniach efekt ten zanika. Przedłużenie inkubacji komórek z badanym czynnikiem wzrostu, zastosowanym w stężeniu 0,1 ng/ml, spowodowało dalsze pobudzenie proliferacji komórek (o $29 \pm 9\%$, $P < 0,05$), po 24 godzinach ekspozycji. Badania migracji komórek wykazały natomiast, że TGF- β 1 zwiększa wydajność tego procesu przy stężeniach 1 ng/ml i 5 ng/ml (wzrost o, odpowiednio, $19 \pm 12\%$ i $19 \pm 8\%$, $P < 0,05$). Wydłużenie ekspozycji komórek na egzogenną formę TGF- β 1 w stężeniu 1 ng/ml nie spowodowało istotnego wzmocnienia efektu działania badanego czynnika. Przykładowo, po 24 godzinach ekspozycji, migracja komórek była podwyższona o $21 \pm 7\%$ ($P < 0,04$) (**Rycina 29C**).



Rycina 29. Wpływ egzogennej, rekombinowanej formy TGF-β1 na proliferację (□) i migrację (■) komórek raka jajnika A2780 (A), OVCAR-3 (B) i SKOV-3 (C). Wykresy po lewej stronie ilustrują efekt zależny od dawki, natomiast wykresy po prawej stronie – efekt zależny od czasu ekspozycji. Dane przedstawiają wartości średnie ± SD. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami grupy kontrolnej, traktowanymi jako 100%. Dane pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w sześciu powtórzeniach.

4.12.8. Działanie egzogennej, rekombinowanej formy TSP-1

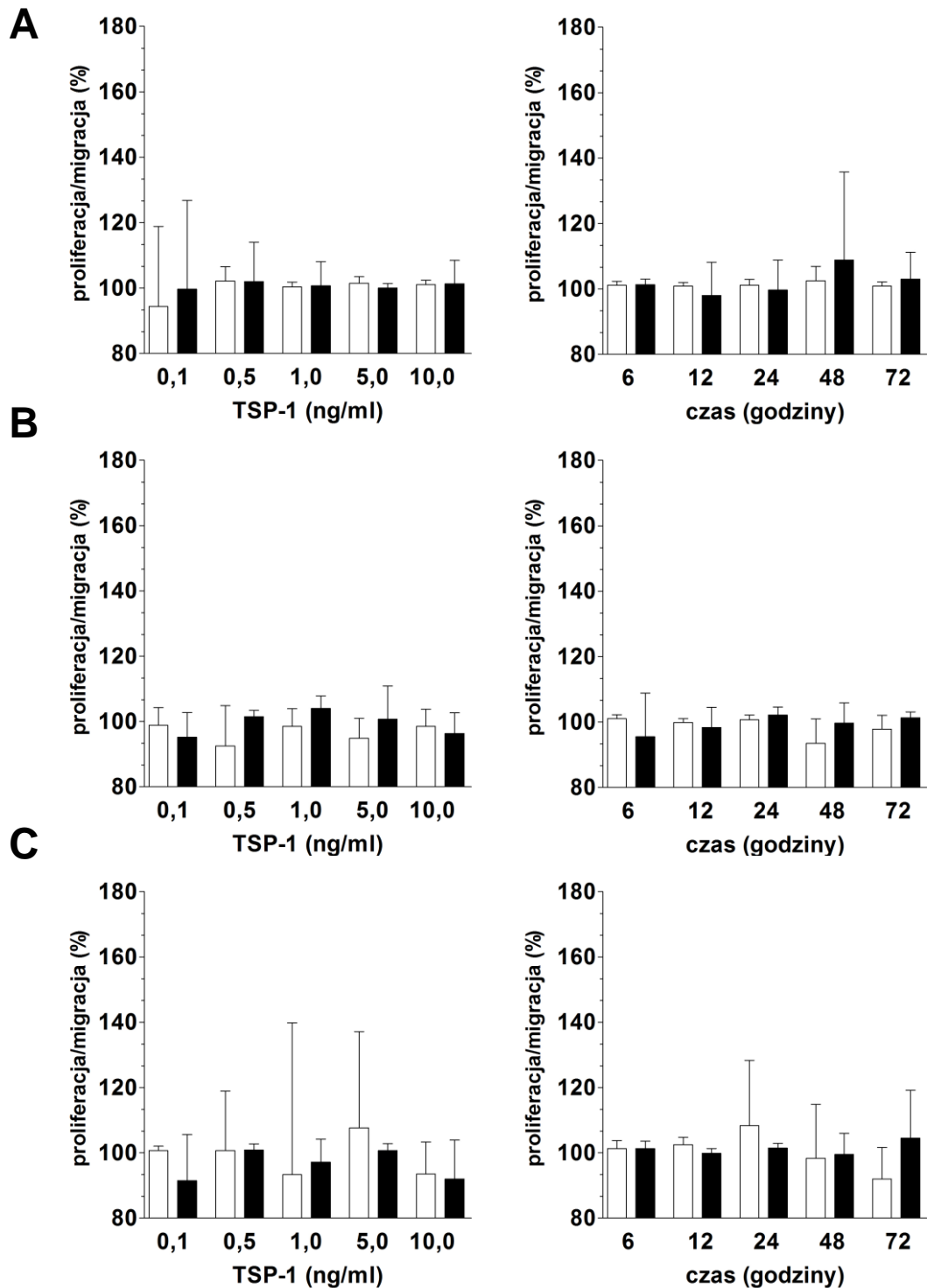
Badania przeprowadzone z wykorzystaniem egzogennej, rekombinowanej formy TSP-1 wykazały, że czynnik ten nie wpływa na zmianę proliferacji oraz migracji żadnej z testowanych linii komórek raka jajnika. Efektu nie stwierdzono zarówno w doświadczeniach wykorzystujących rosnące stężenia badanego czynnika, jak i w badaniach reakcji komórek w funkcji czasu (**Rycina 30**).

4.12.9. Działanie egzogennej, rekombinowanej formy sICAM-1

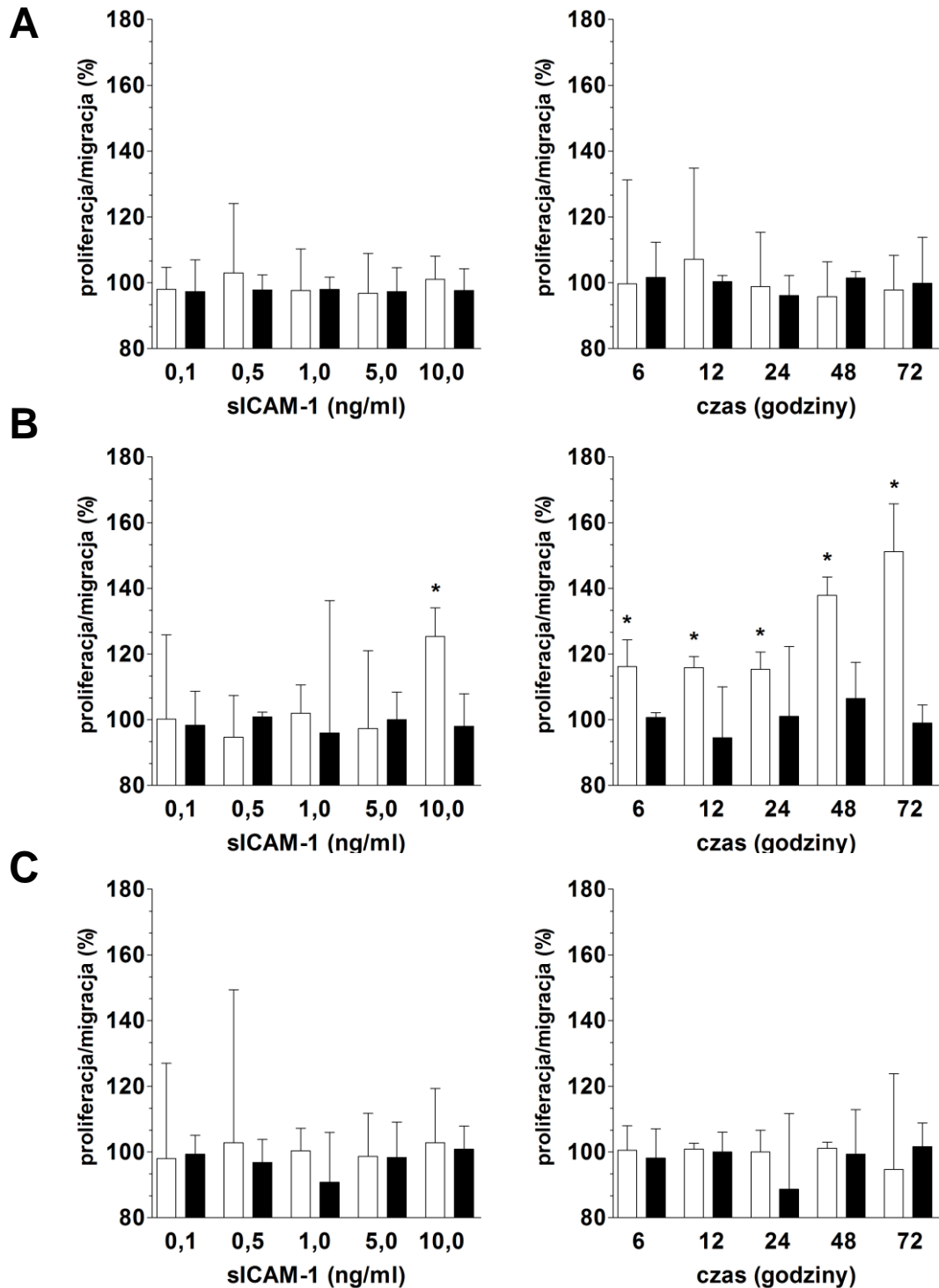
Stwierdzono, że egzogenna, rekombinowana cząstka adhezyjna sICAM-1 nie wpływa na zmianę efektywności proliferacji lub migracji komórek A2780, niezależnie od użytego stężenia lub czasu ekspozycji (**Rycina 31A**).

W odniesieniu do komórek linii OVCAR-3, badany czynnik wpływał na wzrost ich proliferacji, jednak efekt ten był dostrzegalny wyłącznie przy najwyższym z użytych stężeń, tj. przy 10 ng/ml (wzrost o $25 \pm 9\%$, $P < 0,04$). Wydłużenie czasu inkubacji komórek z sICAM-1 wpłynęło na znaczące nasilenie efektów działania tego czynnika, czego odzwierciedleniem był wzrost proliferacji komórek o $51 \pm 15\%$ ($P < 0,03$) po 72 godzinach ekspozycji. Migracja komórek OVCAR-3 pod wpływem sICAM-1 nie uległa natomiast zmianie, niezależnie od zastosowanych warunków eksperymentalnych (**Rycina 31B**).

W przypadku komórek raka jajnika SKOV-3, nie odnotowano wpływu egzogennej formy sICAM-1 na proliferację lub migrację komórek (**Rycina 31C**).



Rycina 30. Wpływ egzogennej, rekombinowanej formy TSP-1 na proliferację (□) i migrację (■) komórek raka jajnika A2780 (A), OVCAR-3 (B) i SKOV-3 (C). Wykresy po lewej stronie ilustrują efekt zależny od dawki, natomiast wykresy po prawej stronie – efekt zależny od czasu ekspozycji. Dane przedstawiają wartości średnie \pm SD. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami grupy kontrolnej, traktowanymi jako 100%. Dane pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w sześciu powtórzeniach.



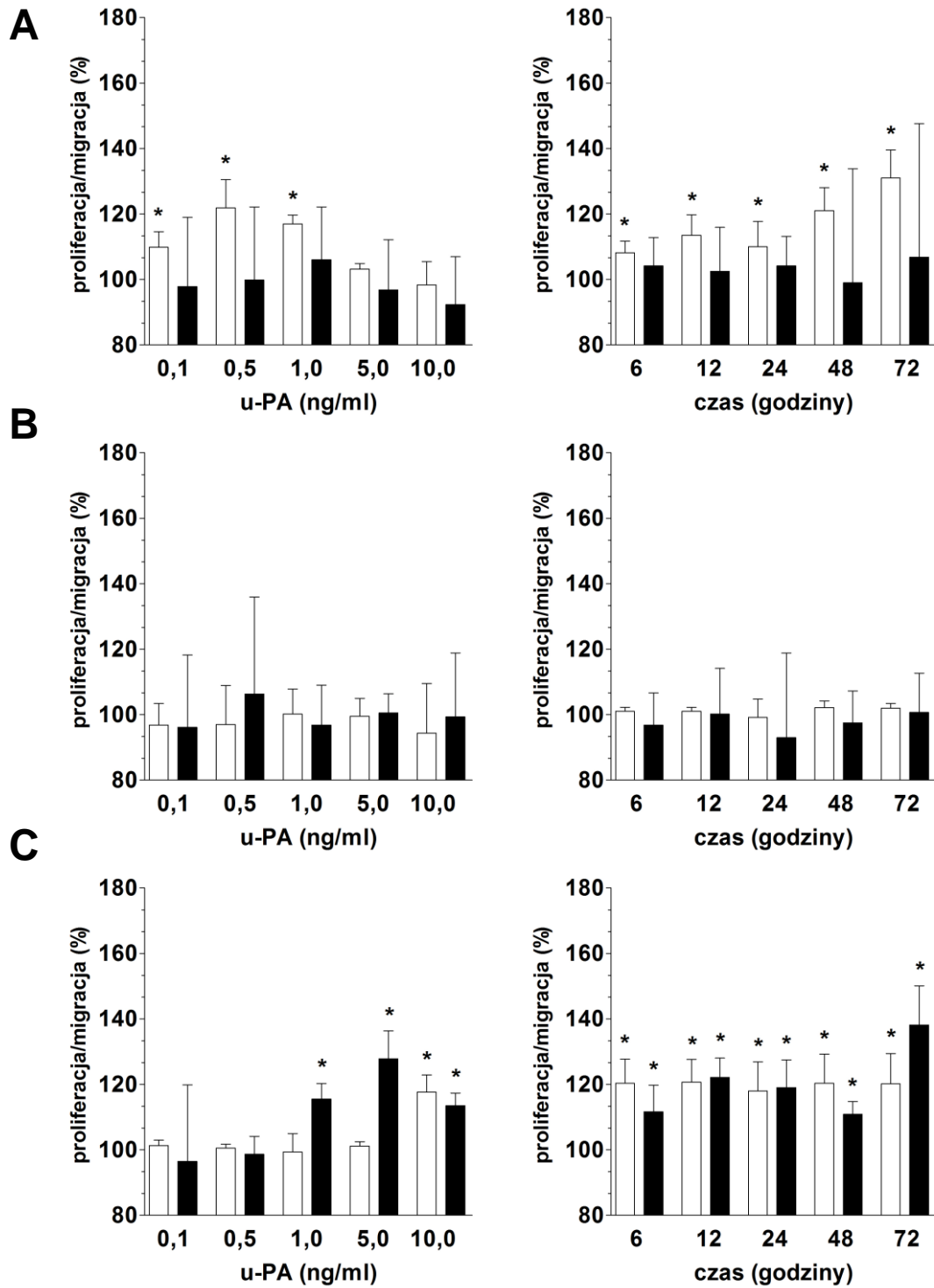
Rycina 31. Wpływ egzogennej, rekombinowanej formy sICAM-1 na proliferację (□) i migrację (■) komórek raka jajnika A2780 (A), OVCAR-3 (B) i SKOV-3 (C). Wykresy po lewej stronie ilustrują efekt zależny od dawki, natomiast wykresy po prawej stronie – efekt zależny od czasu ekspozycji. Dane przedstawiają wartości średnie ± SD. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami grupy kontrolnej, traktowanymi jako 100%. Dane pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w sześciu powtórzeniach.

4.12.10. Działanie egzogennej, rekombinowanej formy u-PA

Badania przeprowadzone na komórkach linii A2780 wykazały, że egzogenna, rekombinowana forma u-PA ma zdolność pobudzania ich proliferacji, a znaczący statystycznie efekt odnotowano już przy zastosowaniu najniższego ze stężeń, tj. 0,1 ng/ml (wzrost o $10 \pm 5\%$, $P < 0,05$). Najsilniejszy wpływ badanego czynnika stwierdzono przy stężeniu 0,5 ng/ml, kiedy to proliferacja komórek wzrosła o $22 \pm 9\%$ ($P < 0,04$) w porównaniu z komórkami grupy kontrolnej. Doświadczenia, w których komórki eksponowano na u-PA w stężeniu 0,1 ng/ml przez dłuższy okres czasu wykazały natomiast, że pobudzające proliferację działanie u-PA może być jeszcze bardziej nasilone, czego dowodem był wzrost proliferacji komórek o $31 \pm 9\%$ ($P < 0,04$) po 72 godzinach ekspozycji. Oceniając wpływ egzogennej formy u-PA na migrację komórek A2780 nie odnotowano zmian istotnych statystycznie w żadnym z zastosowanych układów doświadczalnych (**Rycina 32A**).

Z kolei, w odniesieniu do komórek raka jajnika OVCAR-3, badania wykazały, że u-PA nie wpływa na zmianę ich proliferacji lub migracji. Brak efektu odnotowano zarówno w badaniach z użyciem rosnących stężeń u-PA, jak również w doświadczeniach wykorzystujących wydłużone czasy ekspozycji (**Rycina 32B**).

Badania trzeciej linii komórek nowotworowych, SKOV-3, wykazały, że egzogenna forma u-PA pobudza proliferację komórek, jednak efekt ten był widoczny tylko przy zastosowaniu najwyższego stężenia badanego czynnika, tj. 10 ng/ml (wzrost o $18 \pm 5\%$, $P < 0,04$). Wydłużenie czasu ekspozycji komórek na u-PA w tym stężeniu nie wpłynęło na pogłębienie jego działania. Z kolei analiza wpływu egzogennej formy u-PA na migrację komórek SKOV-3 wykazała, że czynnik ten pobudza migrację począwszy od stężenia 1 ng/ml (wzrost o $16 \pm 5\%$, $p < 0,04$). Najsilniejszy efekt stwierdzono dla stężenia 5 ng/ml, kiedy to migracja komórek wzrosła o $28 \pm 8\%$ ($p < 0,04$) w porównaniu z komórkami grupy kontrolnej. Wydłużenie czasu trwania ekspozycji komórek SKOV-3 na u-PA w stężeniu 1 ng/ml spowodowało wzmocnienie działania tego czynnika, czego przejawem było nasilenie efektywności migracji komórek o $38 \pm 12\%$ ($p < 0,05$) po 72 godzinach ekspozycji (**Rycina 32C**).



Rycina 32. Wpływ egzogennej, rekombinowanej formy u-PA na proliferację (□) i migrację (■) komórek raka jajnika A2780 (A), OVCAR-3 (B) i SKOV-3 (C). Wykresy po lewej stronie ilustrują efekt zależny od dawki, natomiast wykresy po prawej stronie – efekt zależny od czasu ekspozycji. Dane przedstawiają wartości średnie \pm SD. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami grupy kontrolnej, traktowanymi jako 100%. Dane pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w sześciu powtórzeniach.

4.12.11. Działanie egzogennej, rekombinowanej formy VEGF

Badania wykorzystujące egzogenne VEGF wykazały, że w przypadku komórek raka jajnika linii A2780 czynnik ten nie wpływa na zmianę ich proliferacji lub migracji, niezależnie od użytego stężenia oraz długości czasu ekspozycji (**Rycina 33A**).

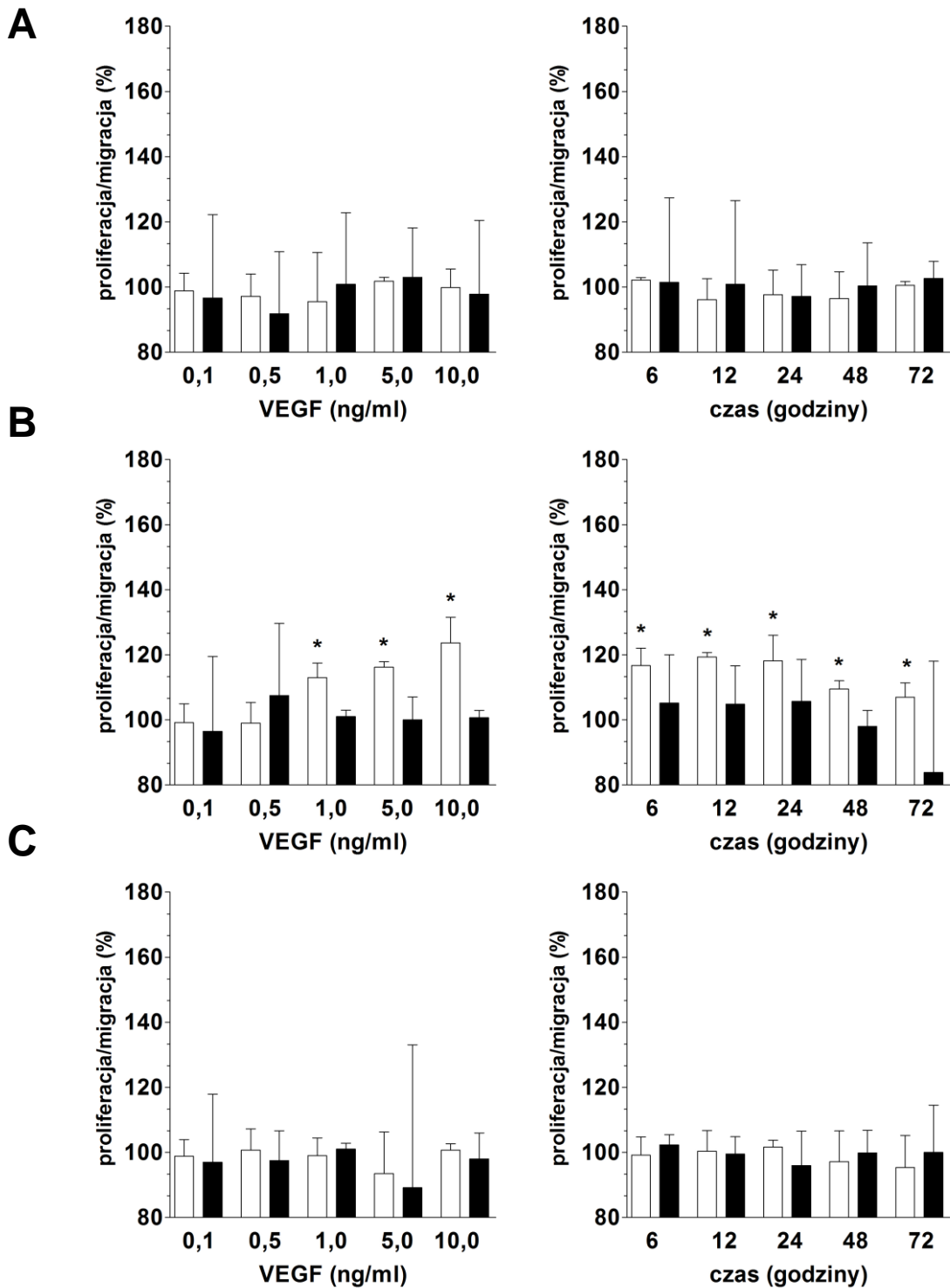
W odniesieniu do komórek OVCAR-3, VEGF okazał się pobudzać ich proliferację, począwszy od stężenia 1 ng/ml (wzrost o $13 \pm 4\%$, $P < 0,05$). Najsilniejszy efekt zaobserwowano z kolei przy stężeniu 10 ng/ml, kiedy to proliferacja komórek wzrosła o $24 \pm 8\%$, $P < 0,04$). Wydłużenie czasu ekspozycji komórek na VEGF w stężeniu 1 ng/ml nie spowodowało dalszego pobudzenia proliferacji komórek. Przeprowadzone badania migracji komórek pod wpływem egzogennej VEGF nie wykazały znaczącego wpływu tego czynnika na badany proces (**Rycina 33B**).

W badaniach przeprowadzonych na komórkach SKOV-3 nie stwierdzono wpływu VEGF na proliferację i migrację komórek, niezależnie od zastosowanego układu eksperymentalnego (**Rycina 33C**).

4.12.12. Działanie egzogennej, rekombinowanej formy fibronektyny

Badania przeprowadzone na komórkach linii A2780 wykazały, że egzogenna fibronektyna posiada zdolność pobudzania ich proliferacji, a efekt ten był już dostrzegalny przy stężeniu 750 ng/ml (wzrost o $16 \pm 5\%$, $P < 0,05$). Najwyższą stymulację zaobserwowano natomiast przy stężeniu 1000 ng/ml, kiedy to proliferacja komórek wzrosła o $19 \pm 6\%$ ($P < 0,05$). Wydłużenie czasu ekspozycji komórek na fibronektynę w stężeniu 750 ng/ml nie spowodowało dalszego wzrostu proliferacji komórek. Doświadczenia poświęcone ocenie migracji wykazały natomiast, że fibronektyna nasila ten proces już przy stężeniu 250 ng/ml (wzrost o $14 \pm 4\%$, $P < 0,05$), wywierając swój najsilniejszy efekt przy stężeniu 1000 ng/ml (wzrost o $40 \pm 13\%$, $P < 0,03$). Wydłużenie czasu ekspozycji komórek na fibronektynę w dawce 250 ng/ml spowodowało dalsze nasilenie migracji, czego dowodem był wzrost efektywności tego procesu o $49 \pm 11\%$, $P < 0,03$ po 48 godzinach ekspozycji (**Rycina 34A**).

Przedłużenie ekspozycji komórek na fibronektynę w stężeniu 100 ng/ml spowodowało dalsze pobudzenie ich proliferacji, czego odzwierciedleniem był jej wzrost o $40 \pm 13\%$, $P < 0,04$ po 12 godzinach inkubacji. Badając proces migracji stwierdzono pobudzające działanie fibronektyny począwszy od stężenia 500 ng/ml (wzrost o $24 \pm 4\%$, $P < 0,04$). Najsilniejszy efekt odnotowano przy stężeniu 1000 ng/ml, kiedy to migracja komórek wzrosła o $35 \pm 14\%$ ($P < 0,05$).



Rycina 33. Wpływ egzogennej, rekombinowanej formy VEGF na proliferację (□) i migrację (■) komórek raka jajnika A2780 (A), OVCAR-3 (B) i SKOV-3 (C). Wykresy po lewej stronie ilustrują efekt zależny od dawki, natomiast wykresy po prawej stronie – efekt zależny od czasu ekspozycji. Dane przedstawiają wartości średnie \pm SD. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami grupy kontrolnej, traktowanymi jako 100%. Dane pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w sześciu powtórzeniach.

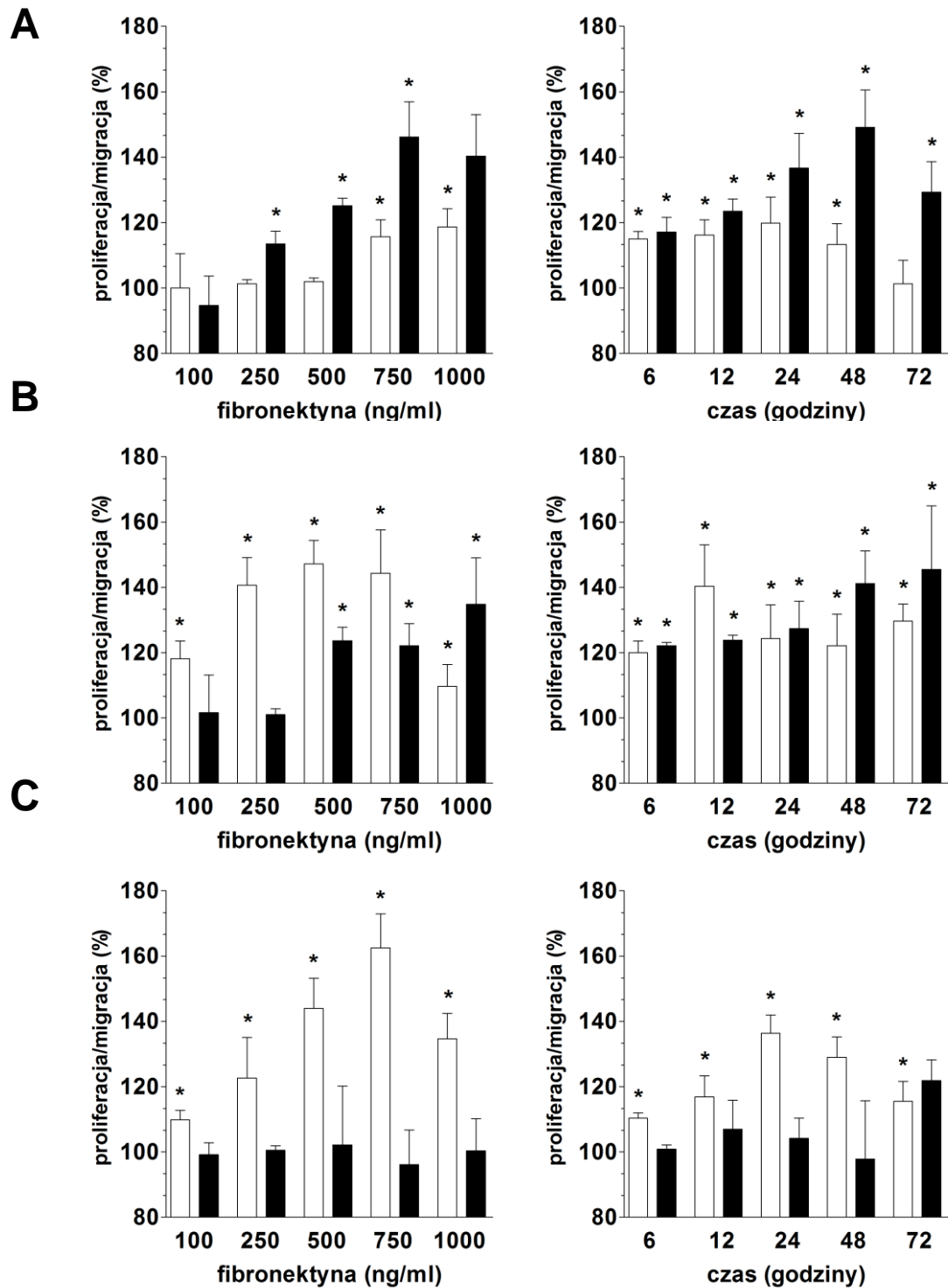
Wydłużenie czasu ekspozycji komórek na fibronektynę w stężeniu 500 ng/ml spowodowało dalsze pobudzenie migracji, czego dowodem był wzrost efektywności tego procesu o $46 \pm 19\%$ ($P < 0,04$) po 72 godzinach inkubacji (**Rycina 34B**).

Badania przeprowadzone na komórkach linii SKOV-3 wykazały, że i w tym przypadku fibronektyna pobudza proliferację komórek, począwszy od stężenia 100 ng/ml (wzrost o $10 \pm 3\%$, $P < 0,05$). Najsilniejszy efekt stwierdzono przy stężeniu 750 ng/ml, kiedy to proliferacja komórek wzrosła o $63 \pm 10\%$ ($P < 0,03$). Wydłużenie czasu ekspozycji komórek na fibronektynę w stężeniu 100 ng/ml wzmocniło efekt działania tego czynnika, czego potwierdzeniem był wzrost proliferacji o $36 \pm 6\%$ ($P < 0,04$), zaobserwowany po 24 godzinach inkubacji. Doświadczenia związane z oceną migracji komórek wykazały natomiast, że fibronektyna nie wpływa na efektywność tego procesu w komórkach SKOV-3, niezależnie od zastosowanego stężenia lub czasu ekspozycji (**Rycina 34C**).

4.13. Identyfikacja rozpuszczalnych mediatorów pobudzającego proliferację i migrację wpływu starych LKMO za pomocą badań interwencyjnych

Celem ostatecznej identyfikacji czynników, wydzielanych w zwiększonych stężeniach przez stare LKMO, których działanie może być przyczyną wzrostu proliferacji i/lub migracji komórek raka jajnika, przeprowadzono badania, w których proliferację i migrację komórek nowotworowych oceniono po neutralizacji ich potencjalnych mediatorów w MK z komórek starych. W badaniu dokonano neutralizacji tylko tych czynników, których pobudzający proliferację i/lub migrację wpływ wykazano we wcześniejszych badaniach z użyciem ich egzogennych, rekombinowanych odpowiedników. Stężenia przeciwciał neutralizujących podane w części metodologicznej rozprawy wybrano na podstawie danych literaturowych, zaleceń producenta oraz przeprowadzonych badań wstępnych. Na etapie badań pilotażowych (wyników nie pokazano), efekty neutralizacji danego czynnika w MK skonfrontowano każdorazowo z działaniem odpowiedniego dla niego przeciwciała kontrolnego, w analogicznym stężeniu.

W pierwszym etapie badań dokonano indywidualnej neutralizacji czynników mogących promować proliferację i/lub migrację danego typu komórek raka jajnika. Następnie, po zidentyfikowaniu czynników, których zablokowanie realnie wpłynęło na obniżenie promującego proliferację i/lub migrację działania MK z komórek starych, dokonano połączonej neutralizacji wszystkich z nich w jednej próbce medium, celem ostatecznego stwierdzenia, czy pobudzający wpływ starych LKMO został zniesiony całkowicie.



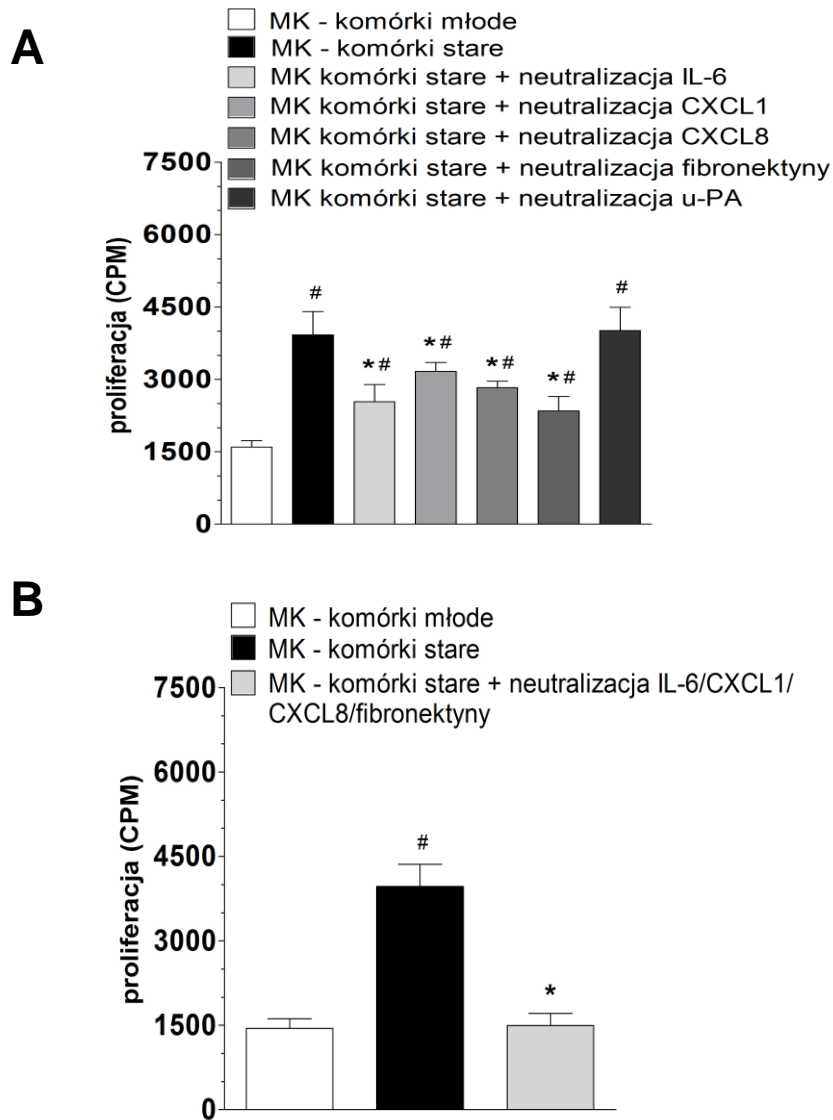
Rycina 34. Wpływ egzogennej, rekombinowanej formy fibronektyny na proliferację (□) i migrację (■) komórek raka jajnika A2780 (A), OVCAR-3 (B) i SKOV-3 (C). Wykresy po lewej stronie ilustrują efekt zależny od dawki, natomiast wykresy po prawej stronie – efekt zależny od czasu ekspozycji. Dane przedstawiają wartości średnie ± SD. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami grupy kontrolnej, traktowanymi jako 100%. Dane pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych w sześciu powtórzeniach.

4.13.1. Identyfikacja mediatorów nasilonej proliferacji

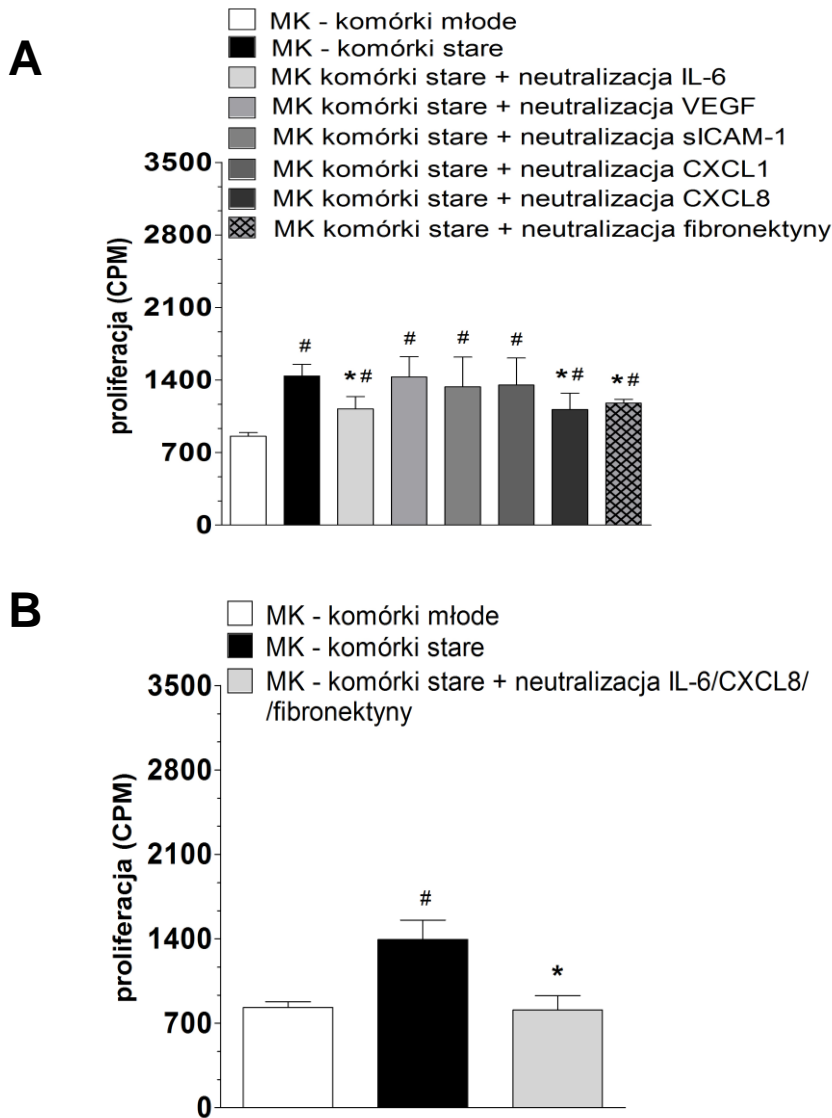
W przypadku komórek A2780, zaobserwowano znaczące obniżenie ich proliferacji wskutek unieczynnienia w MK ze starych LKMO takich czynników, jak IL-6 (o $35 \pm 12\%$, $P < 0,05$), CXCL1/GRO-1 (o $19 \pm 8\%$, $P < 0,05$), CXCL8/IL-8 (o $27 \pm 8\%$, $P < 0,04$) oraz fibronektyna (o $39 \pm 13\%$, $P < 0,04$). Efektu nie odnotowano z kolei po neutralizacji u-PA (**Rycina 35A**). W wyniku połączonej neutralizacji IL-6, CXCL1/GRO-1, CXCL8/IL-8 i fibronektyny w jednej próbce MK z hodowli starych LKMO, pobudzający proliferację wpływ tego medium został zniesiony całkowicie (**Rycina 35B**).

W odniesieniu do komórek linii OVCAR-3, badania wykazały częściową inhibicję ich proliferacji po zablokowaniu IL-6 (o $21 \pm 13\%$, $P < 0,04$), CXCL8/IL-8 (o $22 \pm 11\%$, $P < 0,04$) i fibronektyny (o $18 \pm 10\%$, $P < 0,05$) w MK ze starych LKMO. Efektywnym nie okazało się natomiast zablokowanie w medium VEGF, sICAM-1 i CXCL1/GRO-1 (**Rycina 36A**). Całkowite zniesienie pobudzającego działania MK osiągnięto wskutek jednoczesnej neutralizacji IL-6, CXCL8/IL-8 i fibronektyny (**Rycina 36B**).

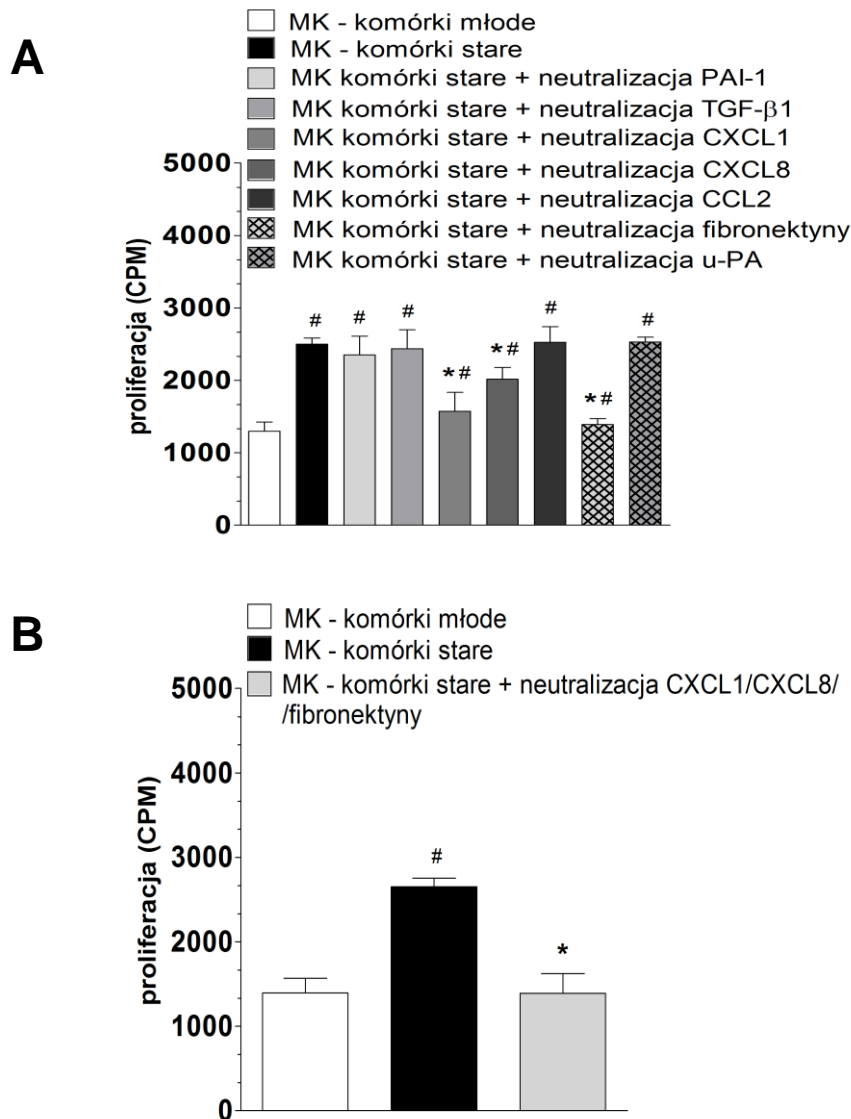
Analogiczne badania przeprowadzone na komórkach SKOV-3 wykazały, że proliferację tej grupy komórek, początkowo pobudzoną działaniem MK ze starych LKMO, można efektywnie zmniejszyć poprzez blokadę CXCL1/GRO-1 (o $37 \pm 12\%$, $P < 0,03$), CXCL8/IL-8 (o $19 \pm 8\%$, $P < 0,04$) i fibronektyny (o $44 \pm 9\%$, $P < 0,01$). Celu tego nie osiągnięto natomiast po unieczynnieniu PAI-1, TGF- β 1, CCL2/MCP-1 i u-PA (**Rycina 37A**). Zastosowanie połączonej neutralizacji CXCL1/GRO-1, CXCL8/IL-8 i fibronektyny w jednej próbce medium zaowocowało całkowitym zniesieniem pobudzającego proliferację działania MK z hodowli komórek starych (**Rycina 37B**).



Rycina 35. Zmiany proliferacji komórek raka jajnika A2780 wywołane neutralizacją w MK ze starych LKMO potencjalnych mediatorów tego zjawiska. Wykres (A) ilustruje efekty indywidualnej neutralizacji poszczególnych czynników w odrębnych próbkach MK, natomiast wykres (B) – efekt łącznej neutralizacji czynników wywierających działanie istotne statystycznie, w jednej próbce medium. Dane przedstawiają wartości średnie \pm SD. Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na MK z komórek młodych. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na MK z komórek starych. Dane pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych z wykorzystaniem próbek MK uzyskanych z hodowli LKMO od sześciu różnych dawców.



Rycina 36. Zmiany proliferacji komórek raka jajnika OVCAR-3 wywołane neutralizacją w MK ze starych LKMO potencjalnych mediatorów tego zjawiska. Wykres (A) ilustruje efekty indywidualnej neutralizacji poszczególnych czynników w odrębnych próbkach MK, natomiast wykres (B) – efekt łącznej neutralizacji czynników wywierających działanie istotne statystycznie, w jednej próbce medium. Dane przedstawiają wartości średnie \pm SD. Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na MK z komórek młodych. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na MK z komórek starych. Dane pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych z wykorzystaniem próbek MK uzyskanych z hodowli LKMO od sześciu różnych dawców.



Rycina 37. Zmiany proliferacji komórek raka jajnika SKOV-3 wywołane neutralizacją w MK ze starych LKMO potencjalnych mediatorów tego zjawiska. Wykres (A) ilustruje efekty indywidualnej neutralizacji poszczególnych czynników w odrębnych próbkach MK, natomiast wykres (B) – efekt łącznej neutralizacji czynników wywierających działanie istotne statystycznie, w jednej próbce medium. Dane przedstawiają wartości średnie \pm SD. Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na MK z komórek młodych. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na MK z komórek starych. Dane pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych z wykorzystaniem próbek MK uzyskanych z hodowli LKMO od sześciu różnych dawców.

4.13.2. Identyfikacja mediatorów nasilonej migracji

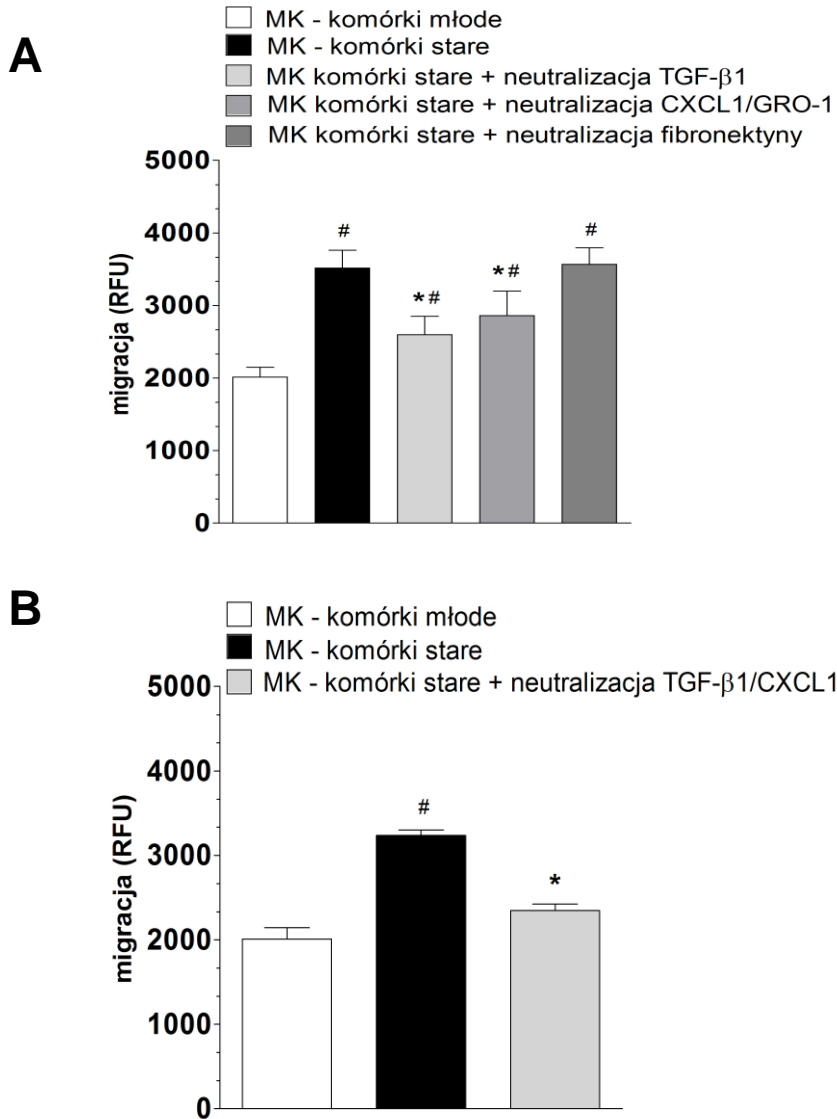
W przypadku komórek A2780, stwierdzono znaczące zmniejszenie ich migracji na skutek unieczynnienia TGF- β 1 (o $26 \pm 5\%$, $P < 0,04$) i CXCL1/GRO-1 (o $18 \pm 15\%$, $P < 0,05$) w MK ze starych LKMO. Efektu nie uzyskano natomiast poprzez neutralizację fibronektyny (**Rycina 38A**). Połączona neutralizacja TGF- β 1 i CXCL1/GRO-1 zaowocowała całkowitym zniesieniem pobudzającego migrację działania MK ze starych LKMO (**Rycina 38B**).

Badania na komórkach OVCAR-3 wykazały częściowe zahamowanie ich migracji po zablokowaniu CXCL1/GRO-1 (o $11 \pm 4\%$, $P < 0,05$), CXCL8/IL-8 (o $11 \pm 3\%$, $P < 0,05$) i fibronektyny (o $8 \pm 3\%$, $P < 0,05$). Efektu nie stwierdzono po neutralizacji CCL2/MCP-1 (**Rycina 39A**). Całkowite zniesienie pobudzającego działania MK osiągnięto w wyniku jednoczesnej neutralizacji CXCL1/GRO-1, CXCL8/IL-8 i fibronektyny (**Rycina 39B**).

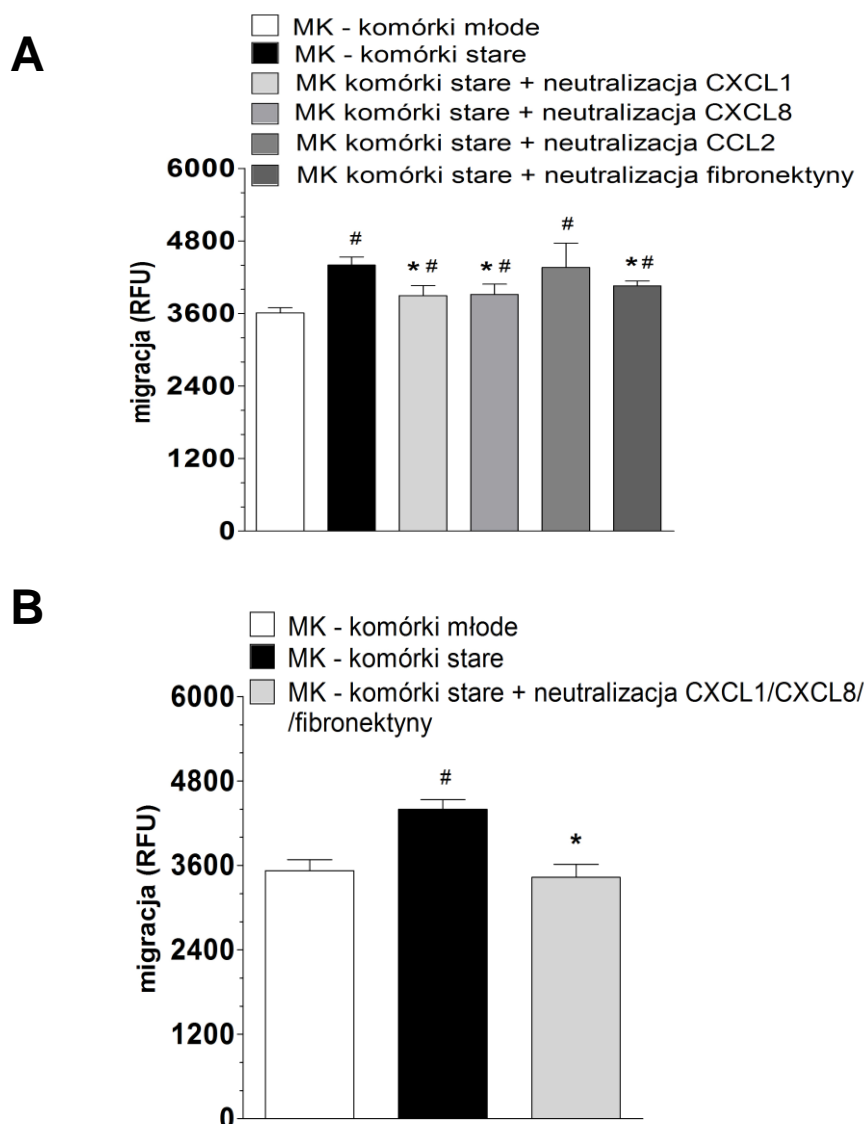
Badania wykonane na komórkach SKOV-3 dowiodły, że migrację tych komórek, nasiloną pod wpływem MK ze starych LKMO, można zmniejszyć poprzez unieczynnienie IL-6 (o $28 \pm 3\%$, $P < 0,04$) i CXCL8/IL-8 (o $16 \pm 3\%$, $P < 0,05$). Efektu nie stwierdzono wskutek neutralizacji TGF- β 1, CCL2/MCP-1 i u-PA (**Rycina 40A**). Zastosowanie połączonej neutralizacji IL-6 i CXCL8/IL-8 zaowocowało całkowitym zniesieniem pobudzającego migrację działania MK z hodowli komórek starych (**Rycina 40B**).

4.14. Wpływ czynników, wydzielanych przez stare LKMO na wykładniki proliferacji i starzenia się komórek prawidłowych

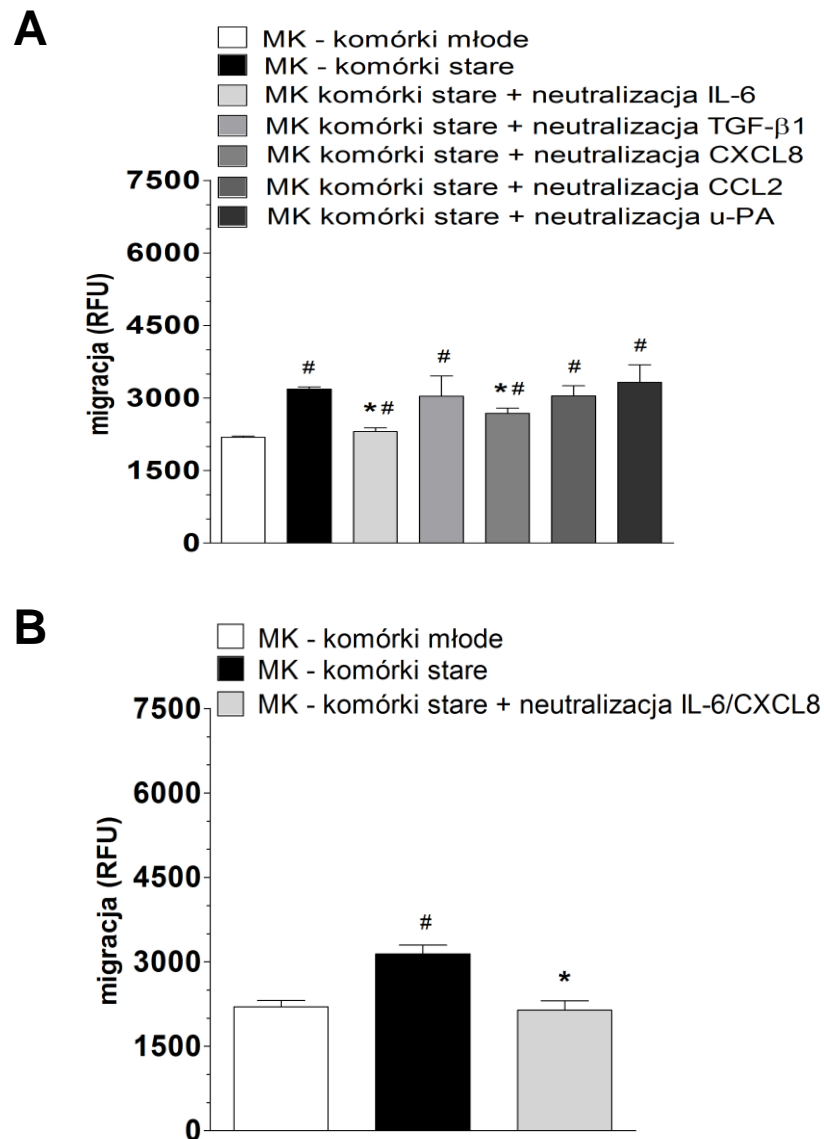
Istotą badań było porównanie wpływu MK, generowanego przez młode i stare LKMO na możliwości proliferacyjne (liczbę osiągniętych podziałów oraz ekspresję antygenu PCNA) oraz wykładniki starzenia się (obecność SA- β -Gal i ognisk γ -H2A.X) w hodowlach młodych LKMO i fibroblastów otrzewnowych (LFO). Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że 7-dniowa ekspozycja komórek na MK ze starych LKMO powoduje obniżenie liczby osiągniętych przez nie podziałów o, odpowiednio, $33 \pm 18\%$ ($P < 0,04$) i $23 \pm 12\%$ ($P < 0,05$) dla LKMO i LFO (**Rycina 41A**). Efekt ten związany był z obniżeniem odsetka komórek, cechujących się ekspresją antygenu PCNA. W LKMO frakcja komórek PCNA-dodatnich zmniejszyła się o $28 \pm 9\%$ ($P < 0,04$), natomiast w LFO o $28 \pm 12\%$ ($P < 0,05$) (**Rycina 41B**). Ponadto stwierdzono, że MK ze starych LKMO zwiększa odsetek komórek wykazujących ekspresję SA- β -Gal (o $30 \pm 41\%$, $P < 0,04$ dla LKMO i o $142 \pm 116\%$, $P < 0,05$ dla LFO) (**Rycina 41C**) oraz obecność ognisk γ -H2A.X (o $34 \pm 27\%$, $P < 0,05$ dla LKMO i o $55 \pm 37\%$, $P < 0,05$ dla LFO) (**Rycina 41D**).



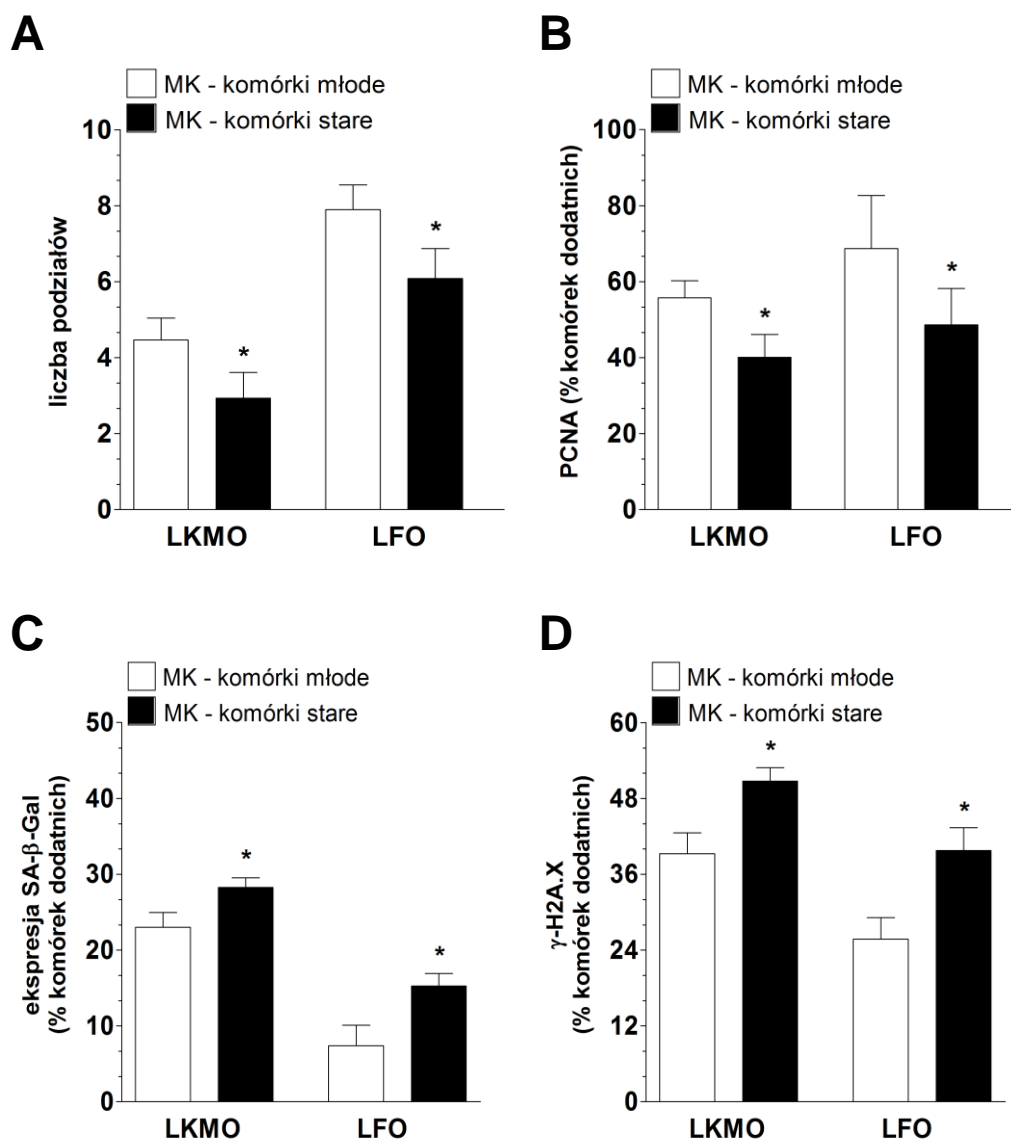
Rycina 38. Zmiany migracji komórek raka jajnika A2780 wywołane neutralizacją w MK ze starych LKMO potencjalnych mediatorów tego zjawiska. Wykres (A) ilustruje efekty indywidualnej neutralizacji poszczególnych czynników w odrębnych próbkach MK, natomiast wykres (B) – efekt łącznej neutralizacji czynników wywierających działanie istotne statystycznie, w jednej próbce medium. Dane przedstawiają wartości średnie \pm SD. Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na MK z komórek młodych. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na MK z komórek starych. Dane pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych z wykorzystaniem próbek MK uzyskanych z hodowli LKMO od sześciu różnych dawców.



Rycina 39. Zmiany migracji komórek raka jajnika OVCAR-3 wywołane neutralizacją w MK ze starych LKMO potencjalnych mediatorów tego zjawiska. Wykres (A) ilustruje efekty indywidualnej neutralizacji poszczególnych czynników w odrębnych próbkach MK, natomiast wykres (B) – efekt łącznej neutralizacji czynników wywierających działanie istotne statystycznie, w jednej próbce medium. Dane przedstawiają wartości średnie \pm SD. Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na MK z komórek młodych. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na MK z komórek starych. Dane pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych z wykorzystaniem próbek MK uzyskanych z hodowli LKMO od sześciu różnych dawców.



Rycina 40. Zmiany migracji komórek raka jajnika SKOV-3 wywołane neutralizacją w MK ze starych LKMO potencjalnych mediatorów tego zjawiska. Wykres (A) ilustruje efekty indywidualnej neutralizacji poszczególnych czynników w odrębnych próbkach MK, natomiast wykres (B) – efekt łącznej neutralizacji czynników wywierających działanie istotne statystycznie, w jednej próbce medium. Dane przedstawiają wartości średnie \pm SD. Symbolem # oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na MK z komórek młodych. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami eksponowanymi na MK z komórek starych. Dane pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych z wykorzystaniem próbek MK uzyskanych z hodowli LKMO od sześciu różnych dawców.



Rycina 41. Wpływ medium kondycjonowanego z młodych (□) i starych (■) LKMO na liczbę osiągniętych podziałów (A), ekspresję antygeny proliferacyjnego PCNA (B), ekspresję SA-β-Gal (C) oraz obecność histonu γ -H2A.X (D) w hodowlach młodych LKMO i LFO. Dane przedstawiają wartości średnie \pm SD. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z komórkami ekspozycjami na MK z hodowli komórek młodych. Dane pochodzą z eksperymentów przeprowadzonych z wykorzystaniem próbek MK, pochodzącego z hodowli pozyskanych od ośmiu różnych dawców.

4.15. Wpływ starzenia się LKMO na wewnątrztrzewnowy rozwój raka jajnika w modelu zwierzęcym

Celem zweryfikowania wyników, wskazujących na podbudzający wpływ starzenia się LKMO na proliferację i migrację komórek raka jajnika w warunkach *in vitro*, przeprowadzono doświadczenia na modelu zwierzęcym *in vivo*. Istotą tych badań było dootrzewnowe wszczepienie immunoniekompetentnym myszom SCID mieszanin komórek raka jajnika z młodymi lub starymi LKMO (w stosunku 1:1), a następnie monitorowanie rozwoju guzów w otrzewnej w ciągu 21 dni eksperymentu. Długość trwania eksperymentu została wybrana arbitralnie na podstawie analizy zróżnicowanego tempa wzrostu guzów w otrzewnej po podaniu trzech różnych typów komórek raka jajnika. Limitujące okazały się komórki A2780, które po 21 dniach od wszczepienia wytwarzały guzy o największych rozmiarach, powodujące dostrzegalne cierpienie zwierząt. W związku z powyższym, okres 21 dni obserwacji zastosowano dla każdego typu badanych komórek nowotworowych. Po upływie tego czasu, eksperyment kończono eutanazją zwierząt.

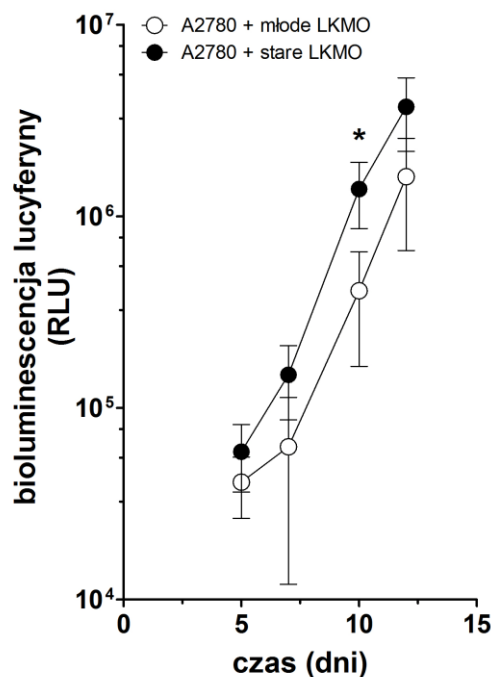
Aby umożliwić małoinwazyjny monitoring rozwoju zmian nowotworowych, komórki nowotworowe poddano przed procedurą wszczepiania transfekcji plazmidem dla lucyferazy, dzięki czemu możliwa była ocena bioluminescencji emitowanej przez te komórki (wskutek utleniania katalizowanego działaniem podawanej dootrzewnowo lucyferyny) za pomocą systemu obrazowania IVIS Spectrum. Aby zapewnić badanym zwierzętom odpowiedni dobrostan, pierwszy pomiar bioluminescencji wykonywano każdorazowo po 5 dniach od wszczepienia komórek. Kolejne punkty czasowe nie były stałe i różniły się w poszczególnych grupach doświadczeń. Ich dobór był podyktowany zarówno wymogami eksperymentalnymi, jak również dostosowaniem się badacza do zachowania zwierząt w danym dniu; zauważalny dystres był czynnikiem, który powodował odstępianie od próby monitoringu.

Dla każdego typu komórek rakowych porównano wpływ młodych i starych LKMO na rozwój guzów w otrzewnej w funkcji czasu, jak również oceniono dynamikę rozwoju tych zmian, przyjmując jako kryterium różnicę (określaną dalej w tekście i na rycinach jako „przyrost”) między bioluminescencją emitowaną przez komórki nowotworowe w ostatnim punkcie czasowym a wartością wyjściową, w pierwszym punkcie czasowym.

Po upływie 21 dni, zwierzęta uśmiercano, a ich jamę otrzewnej poddawano inspekcji, celem usunięcia powstałych guzów i poddania ich analizie histopatologicznej (na podstawie barwienia h+e).

4.15.1. Bioluminescencyjna ocena rozwoju zmian nowotworowych w otrzewnej po wszczepieniu komórek A2780 z młodymi lub starymi LKMO

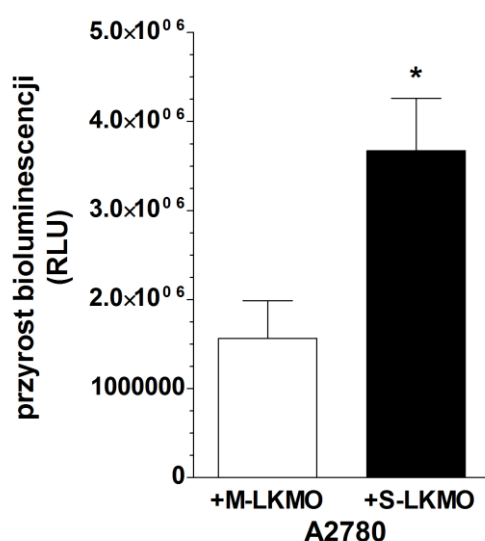
Doświadczenia, których wynik zilustrowano na **Rycinie 42** wykazały, że średnia bioluminescencja emitowana przez tkankę nowotworową, wytworzoną w wyniku dootrzewnowego wszczepienia myszom mieszaniny komórek rakowych A2780 ze starymi LKMO jest wyższa w porównaniu z guzami, wytworzonymi w obecności komórek młodych. Należy jednak podkreślić, że porównanie przebiegu obu krzywych w funkcji czasu za pomocą wieloczynnikowej analizy wariancji (two-way ANOVA) nie wykazała różnic istotnych statystycznie, ze względu na duże różnice między poszczególnymi osobnikami w danej grupie, przekładające się na wysokie wartości odchylenia standardowego (SD). Wskazana tendencja jest jednak zauważalna w każdym z badanych punktów czasowych. Co więcej, kiedy porównano ze sobą wyniki bioluminescencji w jednym punkcie czasowym, tj. po 10 dniach od wszczepienia (wtedy różnica między punktami na krzywej jest największa), zastosowany test Manna-Whitneya dla zmiennych niepowiązanych wykazał istnienie różnicy istotnej statystycznie między analizowanymi grupami ($P < 0,003$).



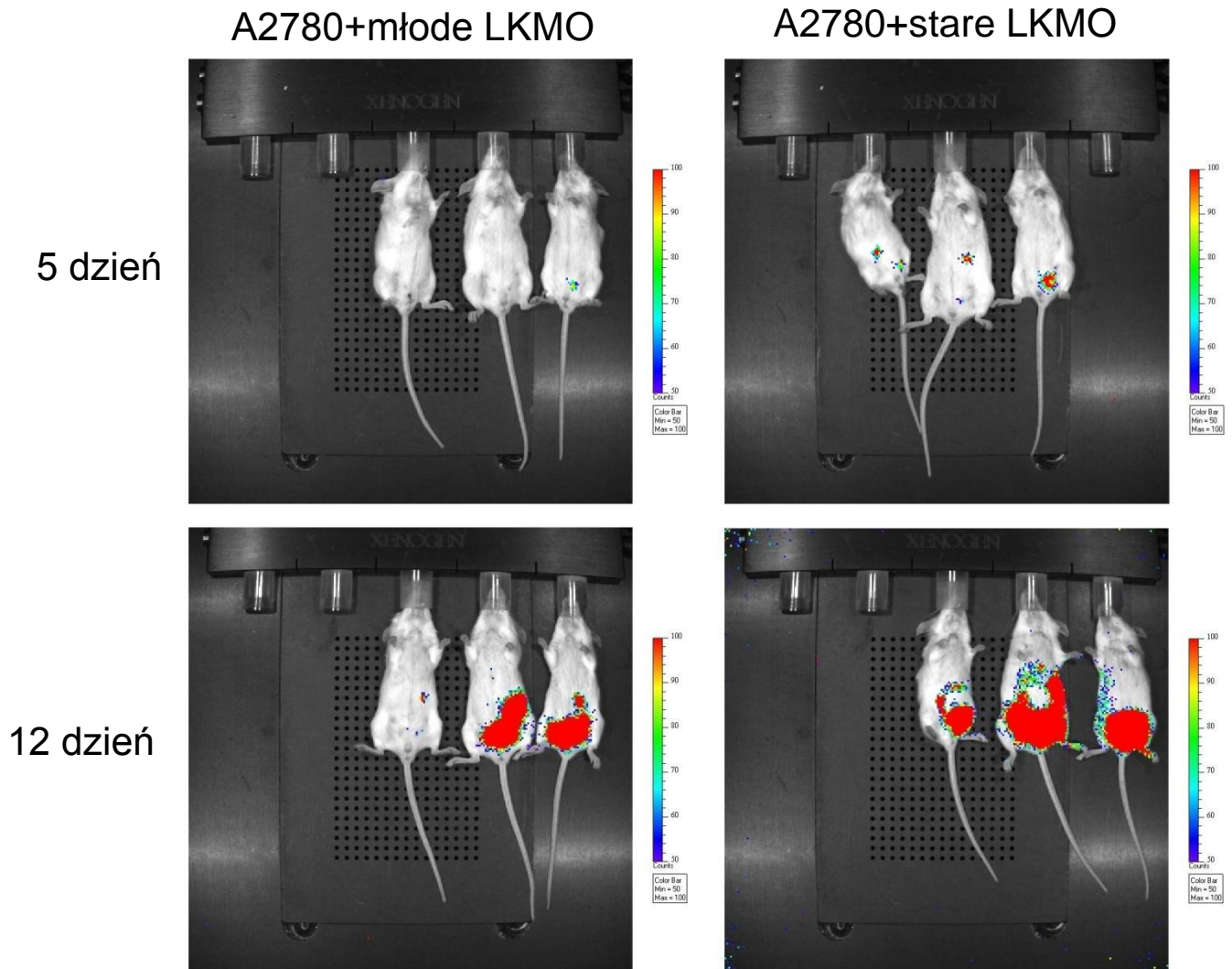
Rycina 42. Porównanie krzywych wzrostu guza jajnika w jamie otrzewnej po wszczepieniu komórek A2780 z młodymi (○) i starymi (●) LKMO. Dane przedstawiają wartości średnie ± SD. Wyniki pochodzą z badań przeprowadzonych na 6 osobnikach w każdej grupie. RLU - względne jednostki świetlne. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z guzami, wytworzonymi w obecności komórek młodych. Dla zachowania przejrzystości prezentacji, wykres przygotowano w skali logarymicznej.

W tej grupie doświadczeń, ostatni monitoring rozwoju guza przeprowadzono po 12 dniach od wszczepienia, gdyż stan myszy po tym czasie był istotnym przeciwwskazaniem do poddawania ich tej procedurze. Eksperyment zakończono natomiast planowo, tj. po 21 dniach.

Przeprowadzone porównanie dynamiki rozwoju guzów wykazało natomiast, że średni przyrost bioluminescencji odnotowany dla zmian rozwiniętych w obecności starych LKMO był ponad dwukrotnie wyższy ($P < 0,04$) w porównaniu z guzami, wytworzonymi w obecności komórek młodych (**Rycina 43**).



Rycina 43. Porównanie dynamiki wzrostu guza jajnika w jamie otrzewnej po wszczepieniu komórek A2780 z młodymi (M, □) i starymi (S, ■) LKMO. Dane przedstawiają wartości średnie ± SD. Wyniki pochodzą z badań przeprowadzonych na 6 osobnikach w każdej grupie. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z guzami, wytworzonymi w obecności komórek młodych. Dla zachowania przejrzystości prezentacji, wykres przygotowano w skali liniowej.



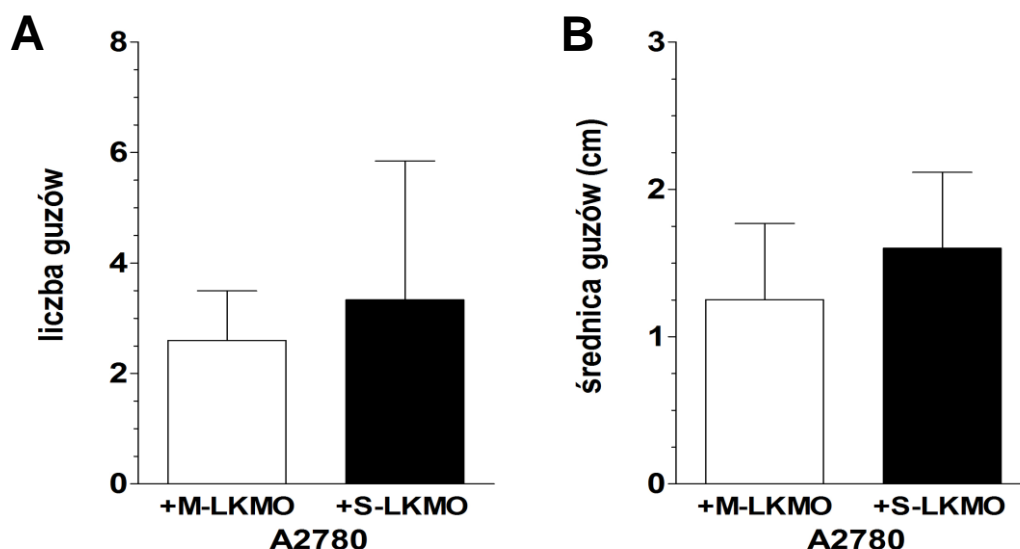
Rycina 44. Porównanie sygnału bioluminescencyjnego, emitowanego przez komórki raka jajnika A2780 wszczepione dootrzewnowo myszom doświadczalnym w obecności młodych i starych LKMO. Na rycinie przedstawiono obrazy uzyskane podczas monitoringu rozwoju zmian nowotworowych u 3 reprezentatywnych osobników w każdej z grup.

4.15.2. Histopatologiczna ocena zmian nowotworowych, wytworzonych w otrzewnej po wszczepieniu komórek A2780 z młodymi lub starymi LKMO

Inspekcja jamy otrzewnej, dokonana po eutanazji zwierząt wykazała obecność rozległych zmian w formie guzów. Badanie mikroskopowe, przeprowadzone po wybarwieniu metodą h+e preparatów histologicznych, przygotowanych z tych zmian potwierdziło, że usunięte guzy mają charakter nowotworowy. Ze względu na swą wielkość, guzy wypełniały znaczącą część jamy otrzewnej badanych zwierząt, uciskając przylegające narządy wewnętrzne.

Średnia liczba guzów, stwierdzonych u zwierząt, którym wszczepiono komórki nowotworowe w obecności młodych LKMO wynosiła $2,6 \pm 0,9$, natomiast u osobników, którym komórki A2780 wszczepiano wraz ze starymi LKMO, wynosiła $3,3 \pm 2,5$ ($P > 0,05$). Badania średnicy usuniętych guzów wykazały natomiast, że w pierwszej z grup wartość ta wynosiła $1,3 \pm 0,5$, natomiast w drugiej $1,6 \pm 0,5$ ($P > 0,05$) (**Rycina 45**).

Reprezentatywne zdjęcia makroskopowe i mikroskopowe (barwienie h+e) guzów, usuniętych z otrzewnej myszy po wszczepieniu im komórek A2780 z młodymi lub starymi LKMO przedstawione zostały na **Rycinach 46, 47, 48**.



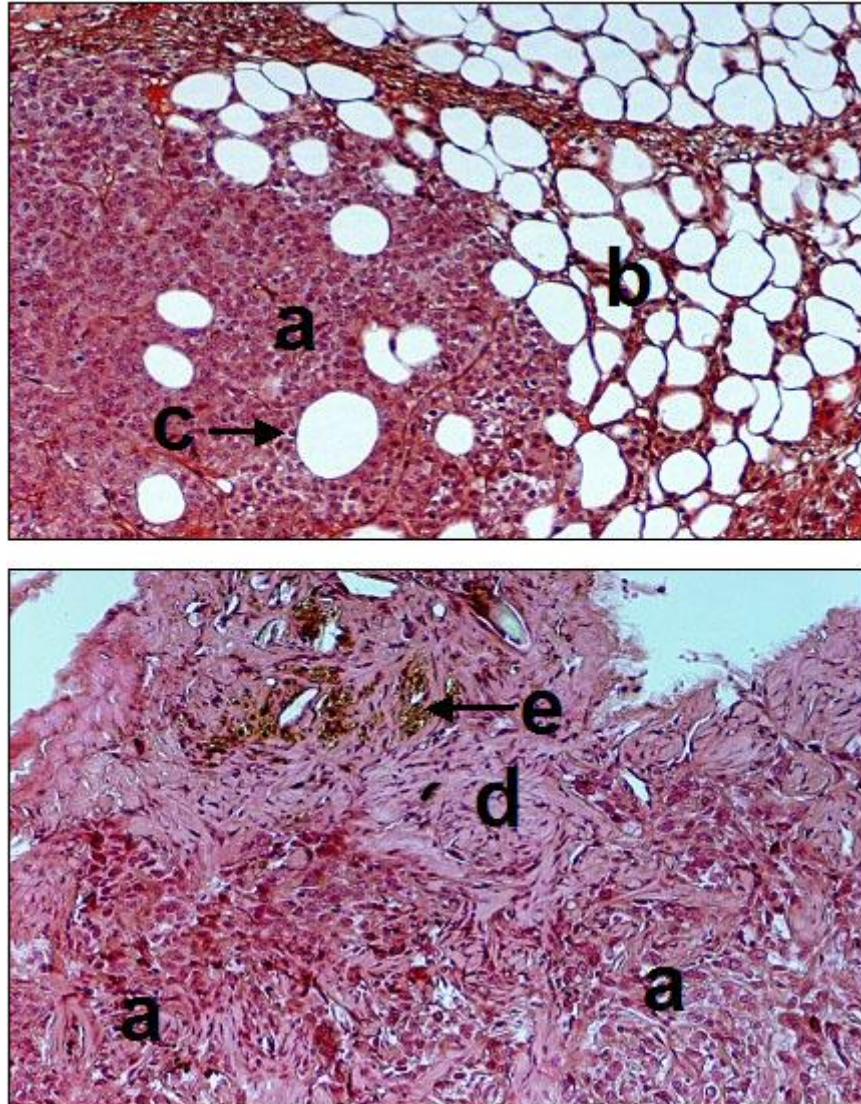
Rycina 45. Porównanie liczby (A) i średnicy (B) guzów rozwiniętych w otrzewnej myszy po wszczepieniu komórek A2780 z młodymi (M, □) i starymi (S, ■) LKMO. W przypadku zmian nie mających formy kulistej, jako średnicę traktowano uśredniony wynik pomiaru dwóch najdłuższych osi guza. Dane przedstawiają wartości średnie \pm SD. Wyniki pochodzą z badań przeprowadzonych na 6 osobnikach w każdej grupie.



Rycina 46. Morfologia guzów usuniętych z jamy otrzewnej reprezentatywnego osobnika, któremu wszczepiono mieszaninę komórek raka jajnika A2780 z młodymi LKMO. Strzałkami zaznaczono guzy przed ich izolacją z otrzewnej.



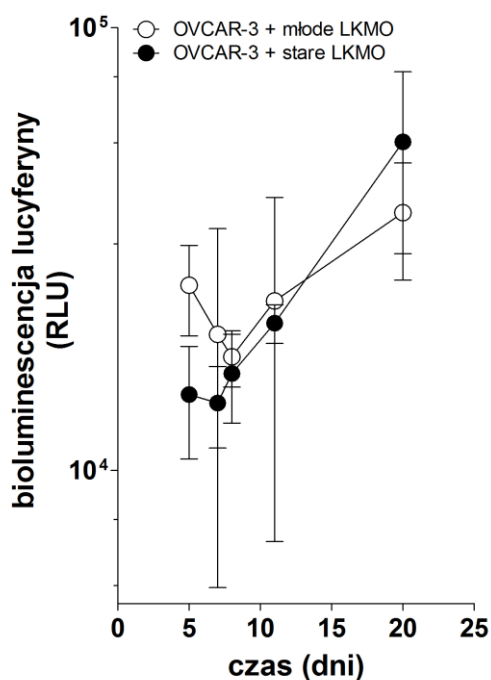
Rycina 47. Morfologia guzów usuniętych z jamy otrzewnej reprezentatywnego osobnika, któremu wszczepiono mieszaninę komórek raka jajnika A2780 ze starymi LKMO. Strzałkami zaznaczono guzy przed ich izolacją z otrzewnej.



Rycina 48. Reprezentatywne zdjęcia ilustrujące wynik barwienia h+e preparatów, przygotowanych z guzów usuniętych z otrzewnej myszy, którym wszczepiono mieszaniny komórek A2780 z młodymi (zdjęcie górne) lub starymi (zdjęcie dolne) LKMO. Opis preparatu: komórki nowotworowe (a), tkanka tłuszczowa (b), pojedyncze adipocyty w obrębie utkania raka (c), włóknienie w centrum nowotworu (d), złogi hemosyderyny (e).

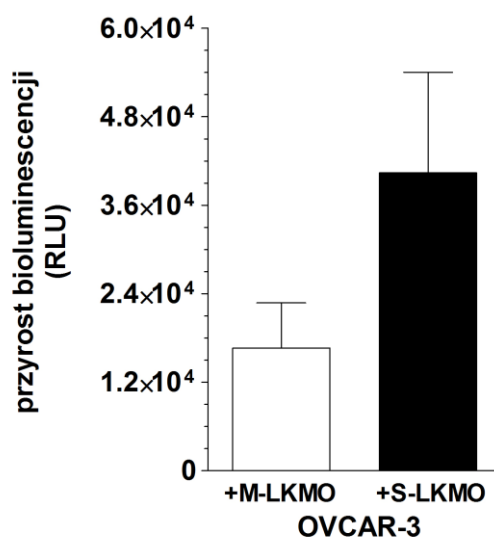
4.15.3. Bioluminescencyjna ocena rozwoju zmian nowotworowych w otrzewnej po wszczepieniu komórek OVCAR-3 z młodymi lub starymi LKMO

Odmiennie niż w przypadku komórek A2780, średnia bioluminescencja emitowana przez tkankę nowotworową, rozwiniętą w obecności starych LKMO była niższa od tej, stwierdzonej dla guzów rozwijających się w obecności komórek młodych. Taką tendencję odnotowano w pierwszych czterech punktach czasowych, tj. do 11 dnia od wszczepienia mieszanin komórkowych. W ostatnim z punktów czasowych, w którym monitorowano rozwój guzów (po 20 dniach) tendencja ta uległa odwróceniu i uśredniony sygnał pochodzący z guzów rozwiniętych w obecności starych LKMO był silniejszy. Bardzo duże różnice międzyosobnicze, przekładające się na wysokie wartości SD spowodowały, że wieloczynnikowa analiza wariancji nie wykazała różnic istotnych statystycznie między dwoma krzywymi rozwoju guzów w funkcji czasu (**Rycina 49**).

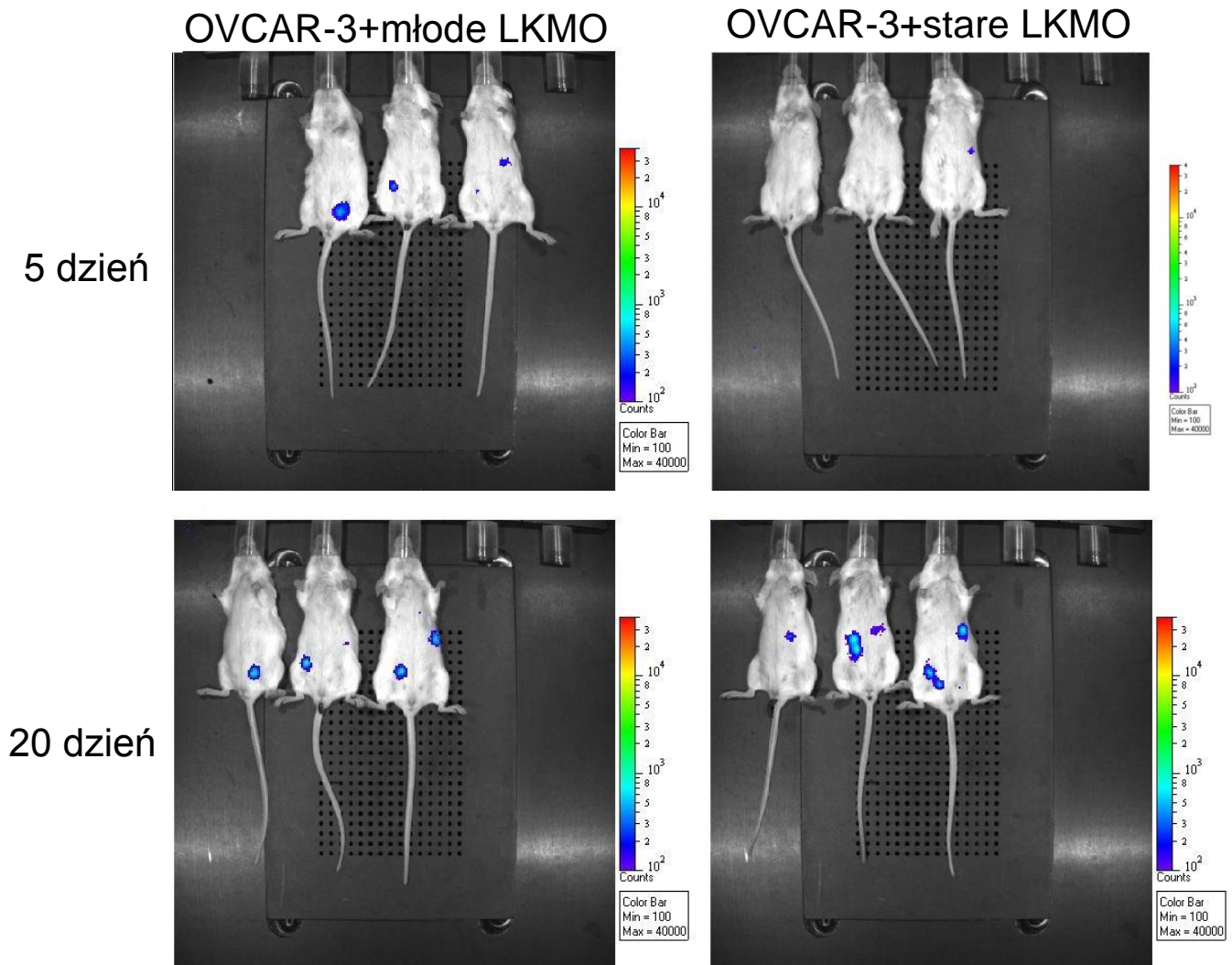


Rycina 49. Porównanie krzywych wzrostu guza jajnika w jamie otrzewnej po wszczepieniu komórek OVCAR-3 z młodymi (○) i starymi (●) LKMO. Dane przedstawiają wartości średnie ± SD. Wyniki pochodzą z badań przeprowadzonych na 3 osobnikach w każdej grupie. RLU - względne jednostki świetlne. Dla zachowania przejrzystości prezentacji, wykres przygotowano w skali logarytmicznej.

Ostatni pomiar bioluminescencji, emitowanej przez rozwinięte guzy został wykonany po 20 dniach od wszczepienia komórek, dzień przed planowaną eutanazją zwierząt. Przeprowadzone porównanie dynamiki rozwoju guzów wykazało, że średni przyrost bioluminescencji odnotowany (między 5 a 20 dniem) dla zmian rozwiniętych w obecności starych LKMO był wyższy w porównaniu z guzami, wytworzonymi w obecności komórek młodych (**Rycina 50**). Przeprowadzenie analizy statystycznej tych wyników nie było jednak możliwe, gdyż przebieg choroby spowodował, iż z początkowych 7 osobników, którym wszczepiono mieszaniny komórkowe, sukcesywnie kolejne z nich umierały, w efekcie czego do końca eksperymentu przetrwały tylko 3 myszy.



Rycina 50. Porównanie dynamiki wzrostu guza jajnika w jamie otrzewnej po wszczepieniu komórek OVCAR-3 z młodymi (M, □) i starymi (S, ■) LKMO. Dane przedstawiają wartości średnie ± SD. Wyniki pochodzą z badań przeprowadzonych na 3 osobnikach w każdej grupie. Dla zachowania przejrzystości prezentacji, wykres przygotowano w skali liniowej.



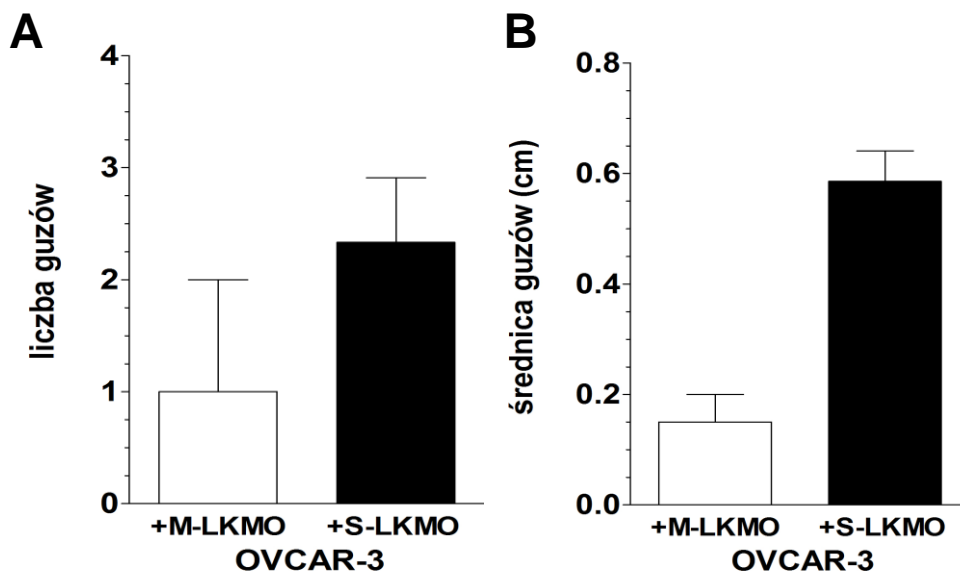
Rycina 51. Porównanie sygnału bioluminescencyjnego, emitowanego przez komórki raka jajnika OVCAR-3 wszczepione dootrzewnowo myszom doświadczalnym w obecności młodych i starych LKMO. Na rycinie przedstawiono obrazy uzyskane podczas monitoringu rozwoju zmian nowotworowych u 3 reprezentatywnych osobników w każdej z grup.

4.15.4. Histopatologiczna ocena zmian nowotworowych, wytworzonych w otrzewnej po wszczepieniu komórek OVCAR-3 z młodymi lub starymi LKMO

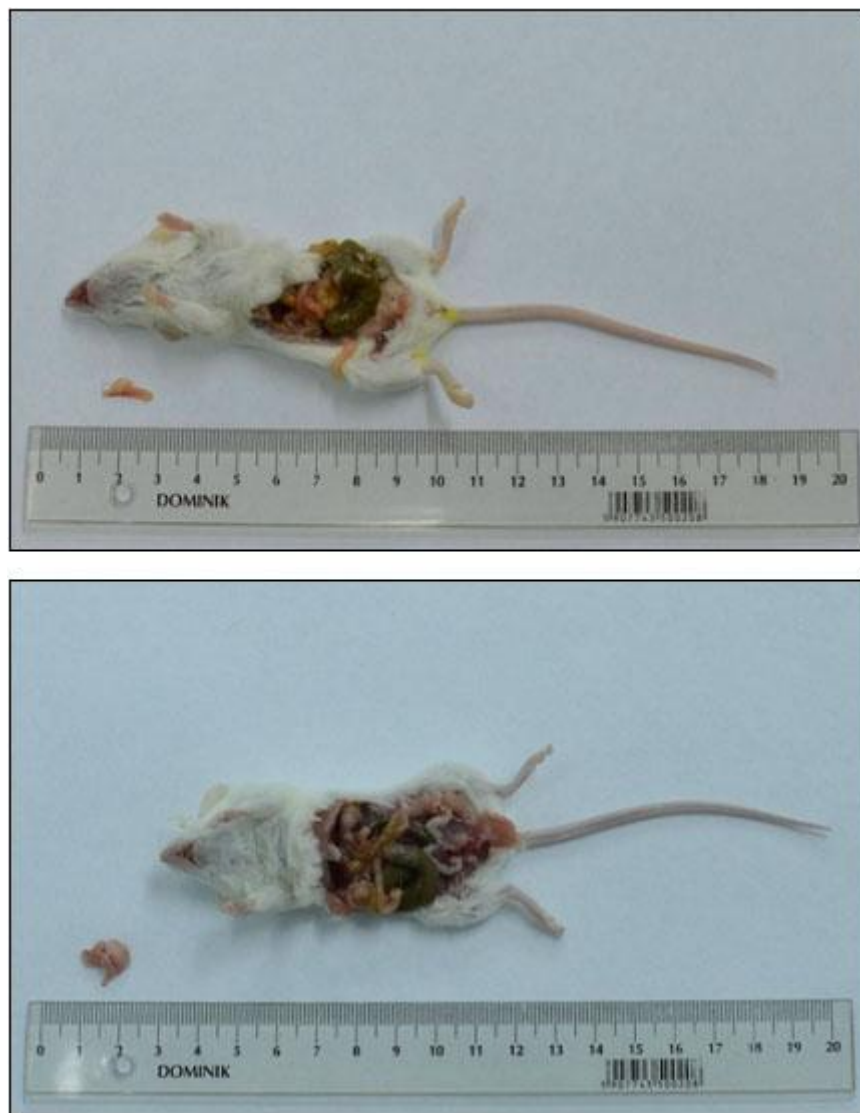
Badanie otrzewnej, przeprowadzone po eutanazji zwierząt wykazało obecność guzów, które, po wybarwieniu przygotowanych z nich preparatów histologicznych metodą h+e, zostały zidentyfikowane jako zmiany nowotworowe. Wykształcone guzy najczęściej lokalizowały się w obrębie sieci większej, sporadycznie naciekały także na mięśnie szkieletowe. Nie zaobserwowano natomiast różnic w lokalizacji guzów pomiędzy osobnikami obu grup badanych.

Liczba guzów, stwierdzonych w otrzewnej zwierząt, którym wszczepiono komórki OVCAR-3 z młodymi LKMO wynosiła $1,0 \pm 1,0$, natomiast w przypadku zwierząt, którym komórki rakowe wszczepiono wraz ze starymi LKMO, wynosiła $2,3 \pm 0,6$ ($P > 0,05$). Badania średnicy guzów pokazały jeszcze większą różnicę między grupami. Mianowicie, średnica zmian wykształconych po wszczepieniu komórek nowotworowych wraz z młodymi LKMO wynosiła $0,15 \pm 0,05$ cm, natomiast po ich wszczepieniu w obecności komórek starych, wartość ta wynosiła $0,56 \pm 0,14$ cm ($P > 0,05$) (**Rycina 52**).

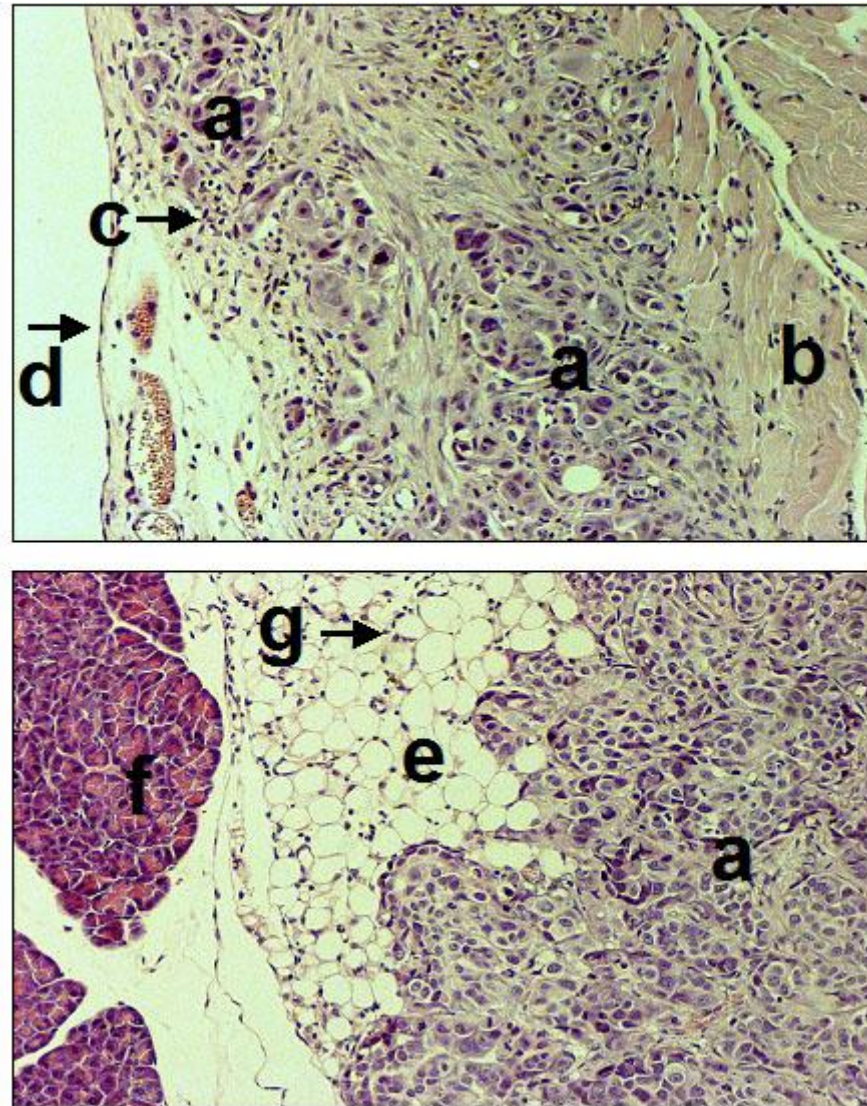
Reprezentatywne zdjęcia makroskopowe i mikroskopowe (barwienie h+e) guzów, usuniętych z otrzewnej myszy po implantacji komórek OVCAR-3 z młodymi lub starymi LKMO przedstawione zostały na **Rycinach 53 i 54**.



Rycina 52. Porównanie liczby (A) i średnicy (B) guzów rozwiniętych w otrzewnej myszy po wszczepieniu komórek OVCAR-3 z młodymi (M, □) i starymi (S, ■) LKMO. W przypadku zmian nie mających formy kulistej, jako średnicę traktowano uśredniony wynik pomiaru dwóch najdłuższych osi guza. Dane przedstawiają wartości średnie \pm SD. Wyniki pochodzą z badań przeprowadzonych na 3 osobnikach w każdej grupie.



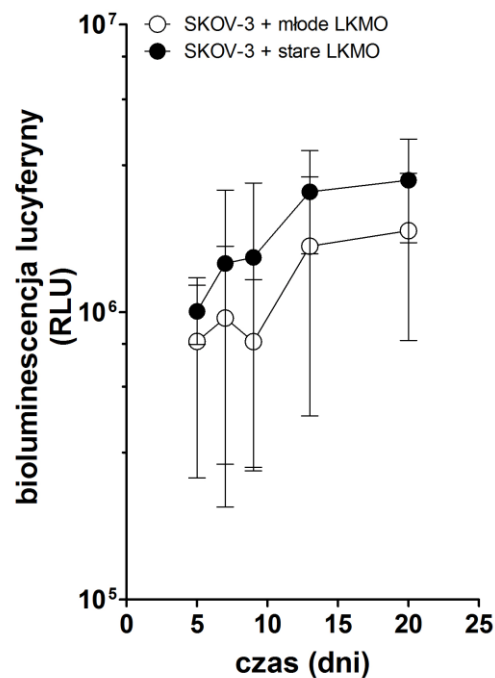
Rycina 53. Morfologia guzów usuniętych z jamy otrzewnej reprezentatywnego osobnika, któremu wszczepiono mieszaninę komórek raka jajnika OVCAR-3 z młodymi (zdjęcie górne) i starymi (zdjęcie dolne) LKMO.



Rycina 54. Reprezentatywne zdjęcia ilustrujące wynik barwienia h+e preparatów, przygotowanych z guzów usuniętych z otrzewnej myszy, którym wszczepiono mieszaniny komórek OVCAR-3 z młodymi (zdjęcie górne) lub starymi (zdjęcie dolne) LKMO. Opis preparatu: komórki nowotworowe (a), mięsień szkieletowy (b), proces zapalny na obwodzie guza (c), komórki mezotelium otrzewnowego (d), tkanka tłuszczowa (e), komórki trzustki (f), naciek zapalny w obrębie tkanki tłuszczowej (g).

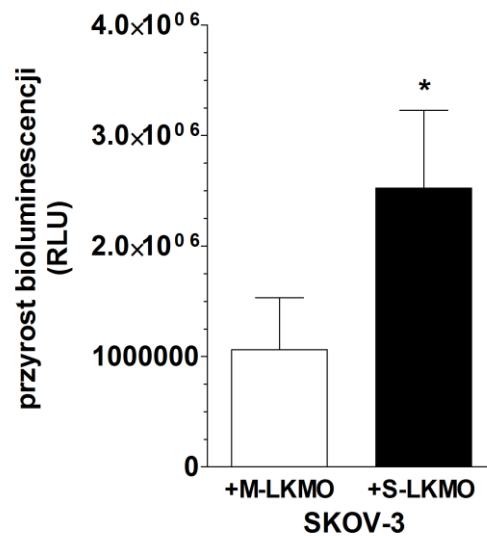
4.15.5. Bioluminescencyjna ocena rozwoju zmian nowotworowych w otrzewnej po wszczepieniu komórek SKOV-3 z młodymi lub starymi LKMO

Krzywa, przedstawiająca uśredniony sygnał bioluminescencyjny, emitowany przez komórki nowotworowe SKOV-3 wszczone wraz ze starymi LKMO biegła w wyraźny sposób nad krzywą, odpowiadającą bioluminescencji komórek nowotworowych, wszczepionych w obecności młodych komórek mezotelialnych. Tak jak i w przypadku dwóch wcześniej badanych linii komórek rakowych, i w tym przypadku duże wartości SD, będące wynikiem znaczących różnic międzyosobniczych w tempie rozwoju guzów, spowodowały brak możliwości wykazania różnic istotnych statystycznie za pomocą wieloczynnikowej analizy wariancji. Trzeba jednak nadmienić, że średnia bioluminescencja emitowana przez tkankę nowotworową, rozwiniętą w obecności starych LKMO była wyższa w każdym z badanych punktów czasowych (**Rycina 55**).

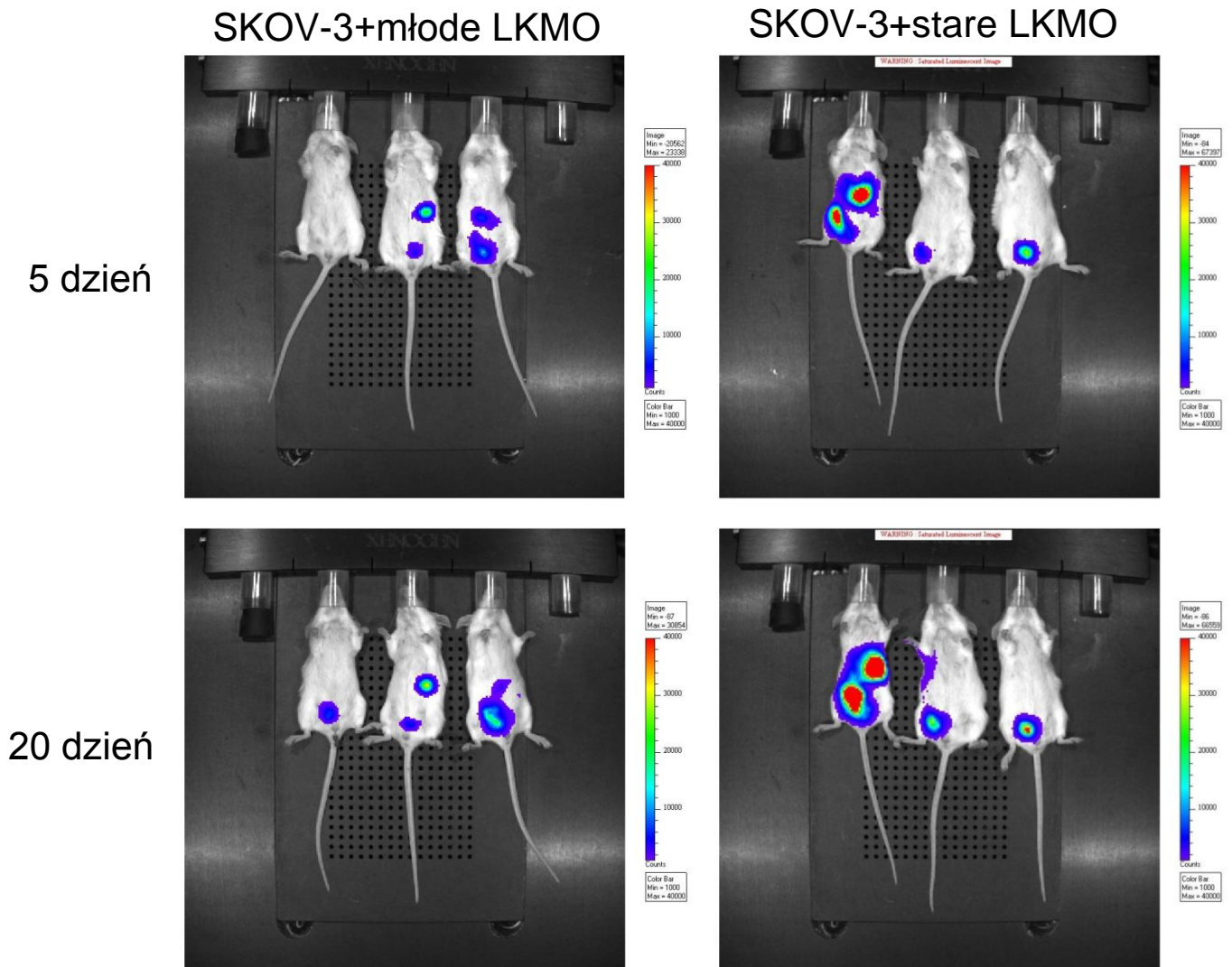


Rycina 55. Porównanie krzywych wzrostu guza jajnika w jamie otrzewnej po wszczepieniu komórek SKOV-3 z młodymi (○) i starymi (●) LKMO. Dane przedstawiają wartości średnie ± SD. Wyniki pochodzą z badań przeprowadzonych na 6 osobnikach w każdej grupie. RLU - względne jednostki świetlne. Dla zachowania przejrzystości prezentacji, wykres przygotowano w skali logarytmicznej.

Podobnie jak w przypadku komórek OVCAR-3, w tej grupie doświadczeń ostatni pomiar bioluminescencji emitowanej przez tkankę nowotworową nastąpił w 20 dniu eksperymentu. Badania skoncentrowane na porównaniu dynamiki rozwoju guzów wykazały, że średni przyrost bioluminescencji (między 5 a 20 dniem), odnotowany dla zmian nowotworowych rozwiniętych w obecności starych LKMO był ponad dwukrotnie wyższy ($P < 0,05$) w porównaniu z guzami, wytworzonymi w obecności komórek młodych (**Rycina 56**).



Rycina 56. Porównanie dynamiki rozwoju guza jajnika w jamie otrzewnej po wszczepieniu komórek SKOV-3 z młodymi (M, □) i starymi (S, ■) LKMO. Dane przedstawiają wartości średnie \pm SD. Wyniki pochodzą z badań przeprowadzonych na 6 osobnikach w każdej grupie. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z guzami, wytworzonymi w obecności komórek młodych. Dla zachowania przejrzystości prezentacji, wykres przygotowano w skali liniowej.



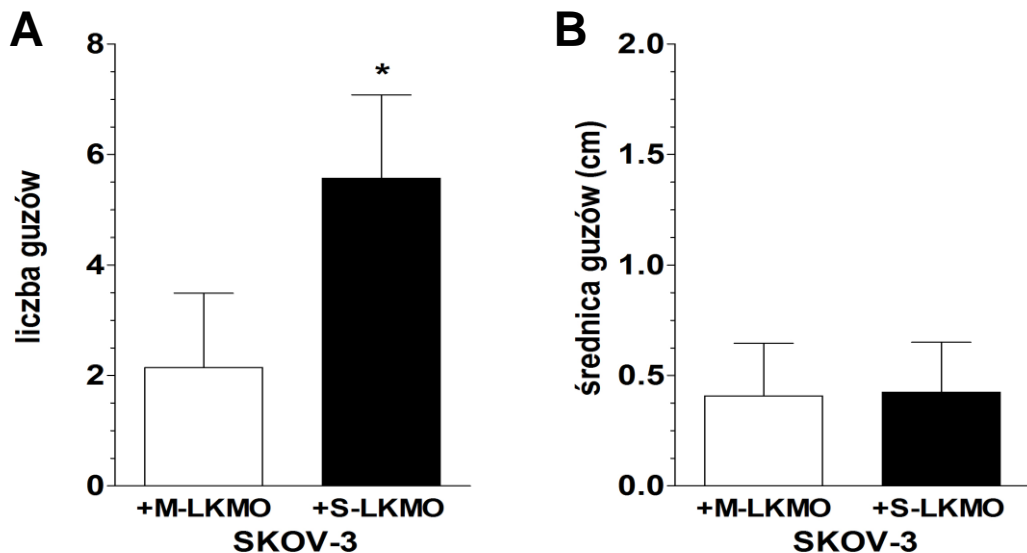
Rycina 57. Porównanie sygnału bioluminescencyjnego, emitowanego przez komórki raka jajnika SKOV-3 wszczone dootrzewnowo myszom doświadczalnym w obecności młodych i starych LKMO. Na rycinie przedstawiono obrazy uzyskane podczas monitoringu rozwoju zmian nowotworowych u 3 reprezentatywnych osobników w każdej z grup.

4.15.6. Histopatologiczna ocena zmian nowotworowych, wytworzonych w otrzewnej po wszczepieniu komórek SKOV-3 z młodymi lub starymi LKMO

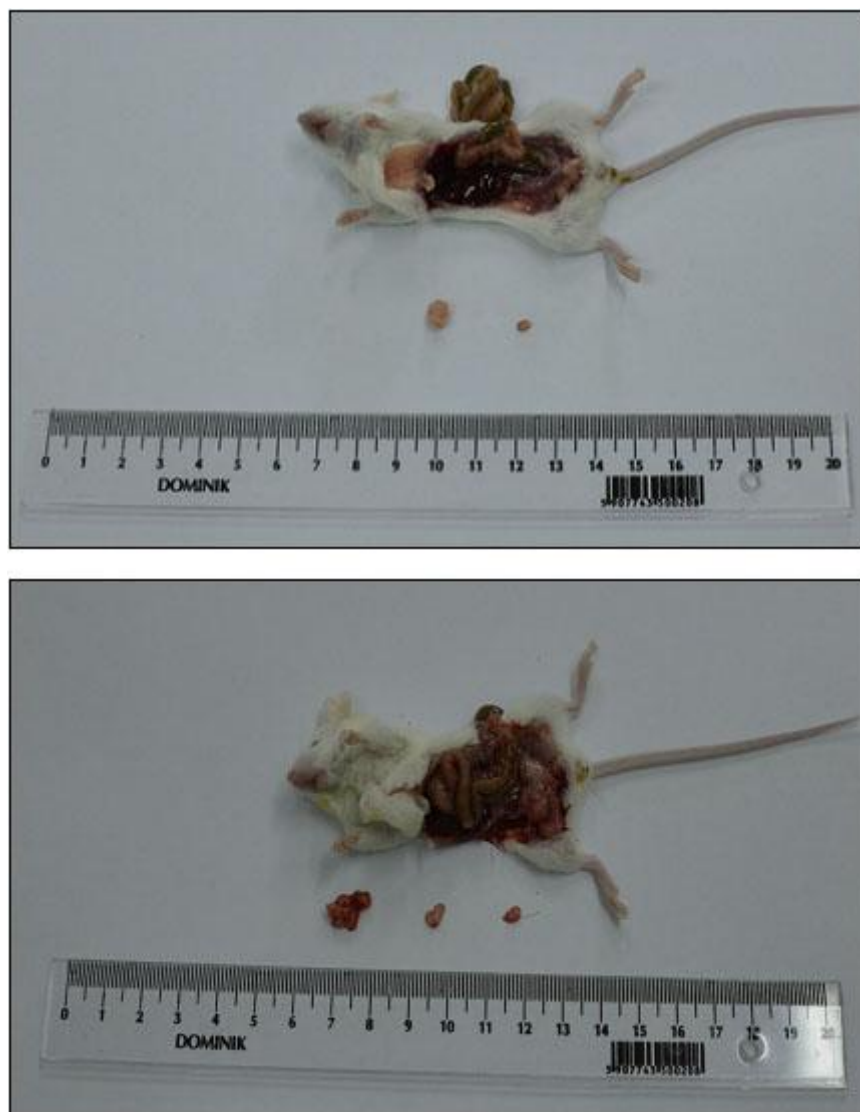
Inspekcja otrzewnej po eutanazji zwierząt wykazała obecność guzów, które zostały następnie zidentyfikowane mikroskopowo, po wybarwieniu przygotowanych z nich preparatów metodą h+e, jako zmiany nowotworowe. Najczęstszym miejscem lokalizacji guzów w obu grupach była sieć większa. Część guzów przylegała także do jelit i wątroby. W większości przypadków, guzy cechowały się silnym otorebkowaniem.

Porównanie liczby guzów rozwiniętych w otrzewnej myszy po wszczepieniu komórek nowotworowych wraz z młodymi lub starymi LKMO wykazało, że w drugiej grupie eksperymentalnej jest ich ponad dwukrotnie więcej ($2,1 \pm 1,3$ vs. $5,6 \pm 3,9$; $P < 0,04$). Badania średnicy guzów dowiodły z kolei, że zmiany wytworzone w obecności młodych LKMO były pod tym względem identyczne ze zmianami, powstałymi w obecności komórek starych ($0,4 \pm 0,2$ cm) (**Rycina 58**).

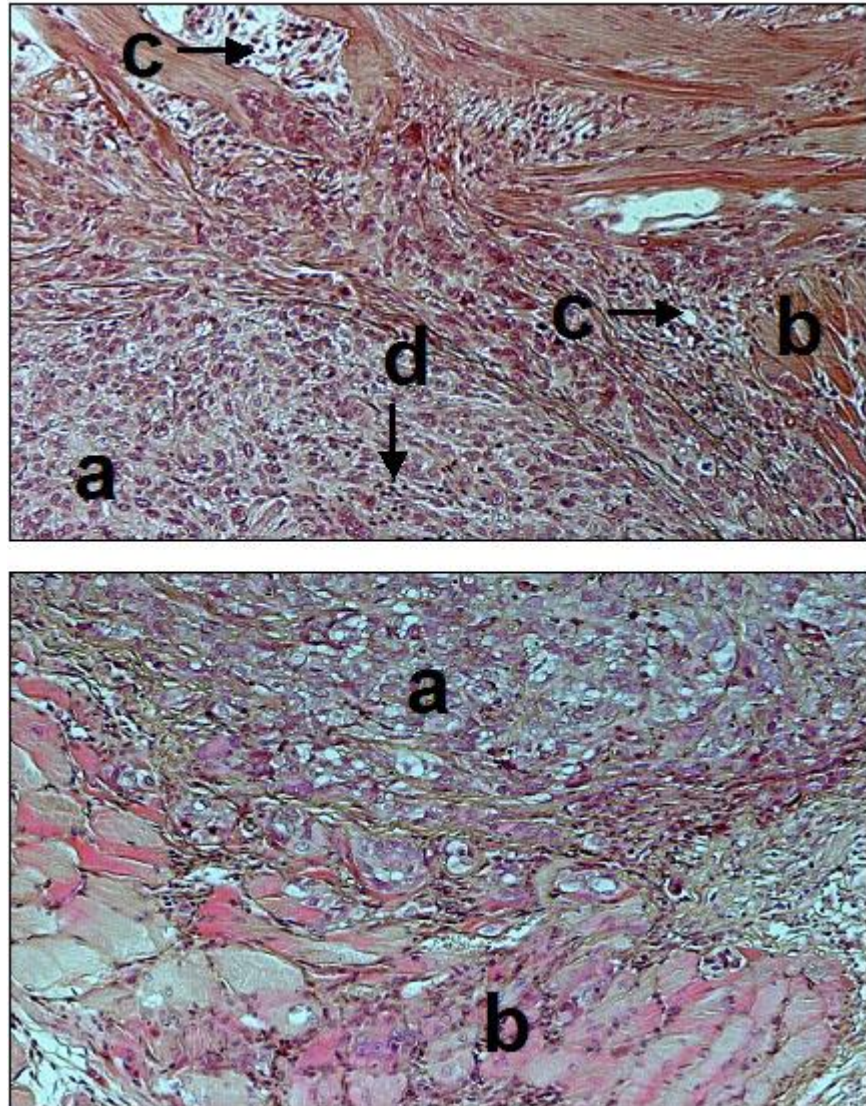
Reprezentatywne zdjęcia makroskopowe i mikroskopowe (barwienie h+e) guzów, usuniętych z otrzewnej myszy po wszczepieniu im komórek SKOV-3 z młodymi lub starymi LKMO przedstawione zostały na **Rycinach 59 i 60**.



Rycina 58. Porównanie liczby (A) i średnicy (B) guzów rozwiniętych w otrzewnej myszy po wszczepieniu komórek SKOV-3 z młodymi (M, □) i starymi (S, ■) LKMO. W przypadku zmian nie mających formy kulistej, jako średnicę traktowano uśredniony wynik pomiaru dwóch najdłuższych osi guza. Dane przedstawiają wartości średnie \pm SD. Wyniki pochodzą z badań przeprowadzonych na 6 osobnikach w każdej grupie. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie w porównaniu z guzami, wytworzonymi w obecności komórek młodych.



Rycina 59. Morfologia guzów usuniętych z jamy otrzewnej reprezentatywnego osobnika, któremu wszczepiono mieszaninę komórek raka jajnika SKOV-3 z młodymi (zdjęcie górne) i starymi (zdjęcie dolne) LKMO.



Rycina 60. Reprezentatywne zdjęcia ilustrujące wynik barwienia h+e preparatów, przygotowanych z guzów usuniętych z otrzewnej myszy, którym wszczepiono mieszaniny komórek SKOV-3 z młodymi (zdjęcie górne) lub starymi (zdjęcie dolne) LKMO. Opis preparatu: komórki nowotworowe (a), mięsień szkieletowy (b), odczyn zapalny (limfocytarny) wokół guza (c), ogniska zapalne w obrębie guza (d).

5. DYSKUSJA

Częstość zachorowania na raka jajnika, jak również stopień agresywności, w tym wewnątrztrzewnowej, komórek złośliwych rosną wykładniczo wraz z wiekiem, czego odzwierciedleniem jest m.in. fakt, że ponad 50% przypadków tego nowotworu występuje u kobiet w wieku 65 lat lub starszych [246;247]. Co ciekawe jednak, poza samą konstatacją tego faktu, dane literaturowe nie dostarczają satysfakcjonującej odpowiedzi na pytanie o powód towarzyszącej starzeniu eskalacji choroby nowotworowej jajnika. Można odnieść wrażenie, że kwestia ta jest nawet nieco bagatelizowana, czego przykładem jest m.in. praca Lukanovej i Kaaksa, w której autorzy przytaczają dane demograficzne i prezentują szkic obrazujący wzrost częstości zachorowań na różne histologicznie typy raków jajnika wraz z wiekiem, nie odnosząc się w treści swej publikacji do przyczyny takiego stanu rzeczy [4]. Inni badacze powołują się z kolei na „niewyjaśniony związek” między starzeniem a biologią komórek nowotworowych lub wręcz na pewne zaniechania terapeutyczne, których mogą doświadczać osoby starsze [248]. Z punktu widzenia wiedzy, jaką dysponujemy odnośnie roli układu hormonalnego w etiologii raka jajnika, za wysoce prawdopodobną można także uznać towarzyszącą procesowi starzenia dysfunkcję tego układu, w tym występujący w okresie około- i postmenopauzalnym wzrost poziomu gonadotropin [162;249]. Duże znaczenie ma z pewnością również czas, niezbędny do nagromadzenia się odpowiedniej liczby onkogennych mutacji [153].

W kontekście powyższych rozważań, daje się zauważyć niedostatek wiedzy na temat znaczenia mikrośrodowiska tkankowego, jako czynnika mogącego determinować tempo progresji raka jajnika. Przemawia za tym m.in. szereg doniesień (zebranych w pracy przeglądowej Karagiannis i wsp. [250]), stanowiących o niebagatelnej roli, jaką fibroblasty związane z rakiem (ang. *cancer-associated fibroblasts*, CAFs) odgrywają w rozwoju nowotworów złośliwych, szczególnie raka piersi. W ostatnich latach, upatruje się coraz większego znaczenia mikrośrodowiska i heterogennych oddziaływań międzykomórkowych także w patogenezie raka jajnika [251]. Koncepcja mówiąca o istotnej roli mikrośrodowiska tkankowego nabrała dodatkowego znaczenia, gdy zespół kierowany przez Judith Campisi wykazał, że stare fibroblasty, które jak wiadomo gromadzą się w tkankach wraz z wiekiem [89], mogą pobudzać proliferację komórek raka piersi *in vitro* oraz rozwój guzów nowotworowych u zwierząt doświadczalnych *in vivo* znacząco silniej niż komórki młode [136]. Odkrycie to, potwierdzone następnie przez inne zespoły [137;252], skłoniło nas do

postawienia hipotezy, że stare komórki mezotelium otrzewnowego (LKMO), które także gromadzą się w obrębie sieci większej wraz z wiekiem [91], mogą przyczyniać się do nasilenia tempa wewnątrzotrzewnowej progresji raka jajnika. Przyjęcie tego założenia było o tyle zasadne, że sieć większa jest miejscem szczególnie często zasiedlanym przez komórki rakowe, co utożsamiane jest z obecnością tam tzw. *milky spots*, tj. struktur bogatych w komórki układu odpornościowego i podścieliska, o bogatym unaczynieniu, wysyłających w kierunku komórek nowotworowych sygnały chemotaktyczne [253]. Rola LKMO w powstawaniu i funkcjonowaniu *milky spots* w obrębie sieci większej nie jest jasna, jednak biologiczne znaczenie tych struktur wpisuje się w obserwację, że stare LKMO wydzielają do środowiska zwiększone ilości czynników angiogennych, które efektywnie pobudzają proliferację komórek śródbłonna naczyniowego [254]. Potwierdzeniem związku między starzeniem się LKMO a progresją raka jajnika była także obserwacja, iż zmiany fenotypowe zachodzące w komórkach starych sprzyjają adhezji komórek nowotworowych w warunkach *in vitro* [229].

Trzeba jednak mieć na uwadze, że adhezja jest tylko jednym z elementów złożonego zjawiska, jakim jest powstawanie przerzutów nowotworowych [255], a pobudzenie tego procesu przez stare LKMO nie uprawnia do stwierdzenia, że ostateczny efekt działania tych komórek w złożonym układzie biologicznym będzie się przejawiał nasileniem progresji nowotworu. W związku z tym, aby jednoznacznie odpowiedzieć na pytanie, czy stare LKMO mogą pobudzać rozwój przerzutów raka jajnika w jamie otrzewnej, przeprowadzono kompleksowe badania, w których oceniono wpływ tych komórek na proliferację, migrację i inwazyjność *in vitro* trzech najbardziej uznawanych w literaturze (wg [256]) komórkowych modeli raka jajnika (tj. A2780, OVCAR-3, SKOV-3) oraz ich wpływ na rozwój guzów nowotworowych w jamie otrzewnej zwierząt laboratoryjnych *in vivo*. Fenomenologiczną ocenę zjawisk modelowanych w warunkach hodowlanych uzupełniono dodatkowo o badania mechanistyczne, ukierunkowane na identyfikację mediatorów działania starych LKMO.

Pierwszym elementem przeprowadzonych badań *in vitro* było określenie wpływu starzenia się LKMO na proliferację komórek nowotworowych. Badanie to, przeprowadzone z użyciem techniki radioizotopowej, cytometrycznej i fluorescencyjnej, jednoznacznie potwierdziło, że stare LKMO pobudzają tempo podziałów komórek raka jajnika dużo bardziej wydajnie niż czynią to komórki młode. Co istotne, stymulujący wpływ starych komórek mezotelialnych następował zarówno poprzez parakrynnie działanie czynników rozpuszczalnych, wydzielanych przez nie do środowiska hodowlanego, jak również poprzez

bezpośrednie oddziaływania typu komórka prawidłowa-komórka nowotworowa. Prócz przywołanych wcześniej wyników doświadczeń na starych fibroblastach i komórkach raka piersi [136], uzyskane w niniejszej rozprawie dane są zgodne z doniesieniem innych zespołów, w tym Papadopoulou i Kletsas, którzy dowiedli, że fibroblasty których przedwczesne starzenie wywołano ekspozycją na promieniowanie jonizujące promują proliferację raka płuca linii A549 i H1299 efektywniej od komórek młodych [257]. Co jednak ważne, autorzy drugiej z przywołanych publikacji dowodzą, że pronowotworowe działanie komórek starych zachodzi wyłącznie wskutek bezpośrednich interakcji między komórkami prawidłowymi i nowotworowymi, co w kontekście wyników uzyskanych w niniejszej rozprawie, jak również badań Krtolicy i wsp. [136] może sugerować, że mechanizm, poprzez który komórki stare mogą wpływać na komórki nowotworowe może być uzależniony od typu nowotworu. Warto także wspomnieć o wynikach Lawrenson i wsp., którzy dowiedli, że stare fibroblasty pobudzają transformację neoplastyczną oraz aktywność podziałową unieśmiertelnionych komórek nabłonka jajnika (iOSE), czyniąc to zarówno w sposób zależny od oddziaływań międzykomórkowych, jak również od wpływu czynników obecnych w medium [258].

Porównując siłę efektów wywieranych za pośrednictwem obu w.w. mechanizmów można stwierdzić, że wzrost proliferacji, wynikający z bezpośredniej interakcji komórek nowotworowych ze starymi LKMO był silniejszy od wzrostu mediowanego działaniem czynników rozpuszczalnych. Obserwacja ta jest zgodna z danymi, uzyskanymi wcześniej przez Krtolice i wsp., którzy badając wpływ starych fibroblastów na komórki raka piersi stwierdzili, że efekty bezpośrednich oddziaływań typu komórka-komórka są nawet dziesięciokrotnie silniejsze od wpływu czynników zawartych w medium [136]. W przypadku testowanych w niniejszej rozprawie komórek raka jajnika, różnica między efektami bezpośrednich oddziaływań między komórkami a wpływem medium nie była aż tak duża (przeciętnie była to różnica dwukrotna), czego przyczyny można upatrywać przede wszystkim w różnych modelach komórkowych, wykorzystanych w przywołanej pracy oraz niniejszej rozprawie.

Odrębną kwestią jest natomiast, iż badając działanie czynników rozpuszczalnych dało się zauważyć, że choć wpływ komórek starych był ewidentny w każdej z testowanych linii komórek rakowych, reakcja poszczególnych linii na pobudzające działanie czynników generowanych przez stare LKMO była w swej skali dość zróżnicowana. Najsilniejszą odpowiedź stwierdzono dla komórek A2780, umiarkowaną dla SKOV-3, a najsłabszą dla

komórek OVCAR-3, co jest o tyle interesujące, że efekty te ściśle korespondują z dynamiką proliferacji, typową dla danego typu komórek nowotworowych. Innymi słowy, komórki które dzielą się najszybciej, w najwyższym stopniu zareagowały na pobudzające działanie mitogenów wydzielonych przez stare LKMO, natomiast komórki które dzielą się najwolniej, zareagowały w sposób najmniej spektakularny. Choć powodów takiego stanu rzeczy jest z pewnością wiele, prawdopodobnym jest, że jednym z nich może być zróżnicowana ekspresja receptorów dla czynników, mogących modulować zjawisko proliferacji, np. CXCL8/IL-8 lub IL-6 [204]. Odrębną kwestią jest specyfika molekularna danej linii nowotworowej, na którą składają się m.in. mutacje w genach kontrolujących progresję cyklu komórkowego, np. mutacje genów *BRAF* i *PTEN*, obecne w komórkach A2780 i SKOV-3, lecz nie w OVCAR-3 lub mutacja genu *TP53*, cechująca z kolei tylko linię OVCAR-3 [256].

Drugim wykładnikiem progresji komórek raka jajnika, który poddano ocenie był proces ich migracji przez błony poliwęglanowe w kierunku chemotaktycznego działania medium kondycjonowanego, generowanego przez komórki mezotelialne. Pobudzający migrację komórek raka jajnika A2780 i SKOV-3 wpływ medium pochodzenia mezotelialnego opisywany był w literaturze już wcześniej [211], jednak w niniejszych badaniach obserwację tę rozszerzono o fakt, że medium wytworzone przez stare LKMO wywiera silniejsze działanie chemotaktyczne w stosunku do komórek nowotworowych niż medium pochodzących z hodowli komórek młodych. Wcześniej, pobudzające migrację działanie komórek starych (fibroblastów) opisano także w odniesieniu do unieśmiertelnionych komórek nabłonka gruczołu piersiowego, a efekt ten powiązano przyczynowo z nasiloną wewnątrzkomórkową degradacją białka Tiam1 i wzrostem wydzielania do środowiska białka osteopontyny [259].

Zarówno autorzy przywołanej wyżej pracy, jak również zespół zajmujący się współzależnością między starymi fibroblastami a progresją neoplastyczną komórek OSE [258] odnotowali, że komórki stare, prócz działania chemotaktycznego, mają także zdolność pobudzania procesu bezpośredniej inwazyjności komórek nowotworowych. Zjawisko to bowiem, w odróżnieniu od procesu migracji, napędzanego głównie gradientem chemotaktycznym, wymaga zdolności komórek nowotworowych do degradowania struktur macierzy pozakomórkowej i ich aktywnego ruchu poprzez warstwy biologiczne, m.in. utworzone przez komórki nabłonkowe lub komórkowe i niekomórkowe elementy podścieliska [260]. Oceny inwazyjności komórek raka jajnika dokonano i w niniejszej rozprawie, porównując efektywność penetracji przez te komórki monowarstwy młodych lub

starych LKMO oraz spoczywającej pod nimi warstwy białek ECM – Matrigelu. I w tym przypadku przeprowadzone badania wykazały, że inwazyjność komórek nowotworowych poprzez stare LKMO jest bardziej efektywna niż przez komórki młode. Efekt ten można częściowo tłumaczyć obniżeniem „szczelności” połączeń międzykomórkowych pomiędzy starymi LKMO, wynikającego ze zmniejszenia ekspresji białka połączeń szczelinowych, koneksyny 43 (nieopublikowane dane z zasobów Katedry i Zakładu Patofizjologii). Jest także prawdopodobne, że pewną rolę może także odgrywać zdolność starych LKMO do wydzielania do środowiska zwiększonych ilości transformującego czynnika wzrostu $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), uznawanego za jeden z głównych mediatorów transdiferencjacji epitelialno-mezenchymalnej (EMT) [261]. Mając jednak na uwadze, że czas kontaktu LKMO z komórkami rakowymi w trakcie prowadzenia testu wnosił tylko 24 godziny, znaczenie czynników wydzielanych lokalnie do środowiska przez komórki prawidłowe wydaje się być jednak mocno ograniczone.

Zwiększona progresja (proliferaacja/migracja/inwazyjność) komórek raka jajnika pod wpływem działania starych LKMO może być jednak związana nie tylko ze specyfiką medium generowanego przez stare LKMO lub z określonymi cechami komórek starych, lecz także ze zmianami zachodzącymi na poziomie ekspresji genów oraz syntezy ich białkowych produktów w samych komórkach nowotworowych. Udało się bowiem wykazać, że komórki nowotworowe, poddawane działaniu mediów kondycjonowanych z hodowli starych LKMO cechują się wzrostem poziomu ekspresji szeregu genów, zaangażowanych w przebieg cyklu komórkowego, adhezję, chemotaksję, migrację, przebieg reakcji zapalnej, angiogenezę oraz syntezę i przebudowę struktur ECM. Co więcej, wiele z tych czynników (chemokiny CXCL1/GRO-1, CXCL8/IL-8 oraz mitogeny HGF oraz VEGF) jest następnie wydzielanych w zwiększonych stężeniach do środowiska przez komórki nowotworowe, co może przyczyniać się do amplifikacji określonych elementów ich progresji na drodze autokrynej. Przykładowo, HGF, którego wydzielanie przez komórki A2780 wzrosło w sposób znaczący w wyniku działania medium, generowanego przez stare LKMO, jest czynnikiem mogącym zwiększać proliferację [262] i inwazyjność komórek raka jajnika [263]. Z kolei zwiększone wydzielanie CXCL8/IL-8 może przyczyniać się do wzrostu oporności komórek rakowych (szczególnie A2780 i SKOV-3) na działanie kluczowych chemioterapeutyków, tj. paklitakselu i cisplatyny [264]. Z punktu widzenia postępu choroby, omawiane zjawisko zapewnia komórkom nowotworowym swoistą autonomię względem otaczających je komórek prawidłowych [265]. W kontekście patogenezy wewnątrzotrzewnowych

przerzutów raka jajnika można je wręcz rozpatrywać jako element pewnej celowej kaskady zdarzeń, która została zainicjowana parakrynnym działaniem starych LKMO, a której celem jest utrwalenie w komórkach nowotworowych określonych wykładników progresji, na wypadek ustania pobudzającego wpływu komórek starych, np. wskutek ich apoptozy i eliminacji z tkanki otrzewnej. Dane literaturowe wskazują, że autokrynną stymulacja rozwoju raka jajnika jest zjawiskiem istotnym dla niemal każdego elementu progresji choroby [266].

Wracając natomiast do kwestii zasadniczej, tj. pronowotworowego wpływu medium, generowanego przez stare LKMO, wydaje się być prawdopodobnym, że działanie to jest pochodną zmienionej czynności komórek starych, a konkretnie rozwoju tzw. fenotypu wydzielniczego (SASP), opisanego wcześniej w starych fibroblastach [267], keratynocytach [268] i komórkach nabłonka dróg żółciowych [269]. Wg niedawnych badań, przeprowadzonych na ludzkich fibroblastach, to właśnie SASP, wywoływany indukcją szlaków odpowiedzi na uszkodzenia DNA (ang. *DNA damage response*; DDR) [102] i/lub specyficznymi dla procesu starzenia zmianami konformacji chromatyny jądrowej [103], leży u podłoża nasilonej dynamiki rozwoju zmian nowotworowych *in vivo*. W niniejszej rozprawie, istnienie SASP w starych LKMO oceniono w sposób kompleksowy, analizując zarówno zmiany ekspresji genów (metodą mikromacierzy potwierdzaną ilościową metodą PCR), jak również stężenie rozpuszczalnych form ich białkowych produktów w medium kondycjonowanym (metodą immunoenzymatyczną). Przeprowadzone badania wykazały, że stare LKMO cechują się podwyższoną ekspresją szerokiego wachlarza genów, kodujących czynniki mogące nasilać progresję choroby nowotworowej, w tym mediatory adhezji z grupy integryn, czynniki proangiogenne (np. CXCL8/IL-8, VEGF) i prozapalne (np. CCL2/MCP-1, ICAM-1, IL-6), jak również białka zaangażowane w syntezę i przebudowę struktur ECM (np. MMP-3, TGF- β 1, t-PA). Profil genów, których ekspresja uległa podwyższeniu w trakcie replikacyjnego starzenia się LKMO jest zgodny z danymi, uzyskanymi dla innych typów komórek, w tym fibroblastów, komórek nabłonka barwnikowego siatkówki i komórek śródbłonka naczyniowego [270].

Kluczowym z punktu widzenia interakcji między komórką mezotelialną a komórką nowotworową jest natomiast spostrzeżenie, że białkowe produkty wielu genów, o których mowa powyżej są wydzielane do środowiska hodowlanego (i prawdopodobnie także tkankowego *in vivo*) w zwiększonych stężeniach przez stare LKMO, przyczyniając się tym samym do pobudzenia omówionych wcześniej wykładników progresji raka jajnika na drodze

parakrynej. Do grupy tych czynników należą: CCL2/MCP-1, CXCL1/GRO-1, CXCL8/IL-8, fibronektyna, IL-6, MMP-3, PAI-1, TGF- β 1, TSP-1, ICAM-1, u-PA i VEGF. Wzrost sekrecji tych białek przez komórki stare jest zgodny z obserwacjami innych zespołów, które opisały m.in. wzmożone wydzielanie do środowiska CXCL8/IL-8 i IL-6 [271], fibronektyny [272], MMP-3 i u-PA [273] oraz VEGF [140] przez stare fibroblasty, jak również nasiloną sekrecję CCL2/MCP-1 [274], CXCL1/GRO-1, CXCL8/IL-8 i IL-6 [275] przez stare komórki nabłonkowe.

Koniecznym jest w tym miejscu także stwierdzenie, że niemal każdy z wyżej wymienionych czynników został uprzednio rozpoznany jako mediator określonych cech komórek nowotworowych, w tym proliferacji (CXCL1/GRO-1 [276], CXCL8/IL-8, IL-6 [204], u-PA [277], VEGF [278]), migracji (fibronektyna [279]) i inwazyjności (CCL2/MCP-1 [280], PAI-1 [208], TGF- β 1 [281]) różnych linii komórek raka jajnika. Niektóre z nich działają w sposób synergistyczny, jak na przykład TGF- β 1, który stymuluje produkcję PAI-1 [208], lub TSP-1, aktywująca latentną formę TGF- β 1 [282]. Tylko w przypadku niektórych z omawianych czynników, ich wpływ na rozwój choroby nowotworowej jajnika jest niejednoznaczny, czego przykładem może być IL-6, która według części autorów może pobudzać podziały komórek [283], a według innych, jej neutralizacja pozostaje bez wpływu na tempo proliferacji [284].

Odnosząc się do kwestii ścieżki sygnałowej, mogącej leżeć u podłoża rozwoju SASP w komórkach mezotelialnych można spekulować, że funkcję tę może pełnić aktywacja kinazy p38 MAPK, będącej jednym z niedawno odkrytych stymulatorów SASP w fibroblastach [105]. Pewne znaczenie może odgrywać także aktywność RFT, zidentyfikowanych jako induktory aktywności p38 MAPK [229], czego potwierdzeniem było obniżenie sekrecji fibronektyny, TGF- β 1 i VEGF przez stare LKMO po ich ekspozycji na substancje o właściwościach antyoksydacyjnych [229;244;285].

Zidentyfikowawszy czynniki, mogące przyczyniać się do nasilonej proliferacji i migracji komórek raka jajnika pod wpływem medium kondycjonowanego, wygenerowanego przez stare LKMO, przeprowadzono eksperymenty, których celem było określenie wpływu egzogennych, rekombinowanych form tych czynników na efektywność proliferacji i migracji komórek A2780, OVCAR-3 i SKOV-3. W toku tych badań oceniono odpowiedź komórek zależną od dawki czynnika (ang. *dose-response*), stosując stężenia korespondujące z wartościami stwierdzonymi w próbkach medium, jak również oceniono reakcję komórek na badany czynnik w funkcji czasu (ang. *time-course*), wykorzystując jako najdłuższy przedział

czasowy wartość 72 godzin, odpowiadającą całkowitemu czasowi ekspozycji komórek na medium kondycjonowane. Przeprowadzone badania wykazały, że wpływ analizowanych czynników ma charakter komórkowo-specyficzny, czego odzwierciedleniem była inna dla każdej linii komórkowej kompozycja mediatorów nasilających oba wykładniki ich progresji. I tak, w przypadku komórek A2780, proliferacja wzrosła pod wpływem: CXCL1/GRO-1 [286], CXCL8/IL-8 [287], fibronektyny, IL-6 [288] i u-PA, natomiast migracja, pod wpływem: CXCL1/GRO-1, TGF- β 1 i fibronektyny. Proliferację komórek OVCAR-3 pobudzały: CXCL1/GRO-1 [276], CXCL8/IL-8 [204], fibronektyna, IL-6 [204], sICAM-1 i VEGF, natomiast migrację: CCL2/MCP-1, CXCL1/GRO-1, CXCL8/IL-8 i fibronektyna [289]. W odniesieniu do komórek SKOV-3, wzrost proliferacji wywoływały: CCL2/MCP-1, CXCL1/GRO-1 [276], CXCL8/IL-8 [287], fibronektyna, PAI-1, TGF- β 1 i u-PA, natomiast wzrost migracji: CCL2/MCP-1 [280], CXCL8/IL-8, IL-6 [290], TGF- β 1 i u-PA [291].

Jak wynika z powyższego zestawienia, prócz znanych już z literatury mediatorów proliferacji i migracji komórek A2780, OVCAR-3 i SKOV-3 (czynniki opatrzone referencją), w niniejszych badaniach udało się zidentyfikować kolejne czynniki, mogące pobudzać te zjawiska. W niektórych przypadkach, uzyskane wyniki były odmienne od danych literaturowych, jak na przykład miało to miejsce w odniesieniu do pobudzającego migrację komórek A2780 działania chemokiny CXCL1/GRO-1 [286]. Także wykazane w niniejszej rozprawie pobudzające działanie fibronektyny na proliferację komórek SKOV-3 przeczy wcześniejszym doniesieniom, stanowiącym o braku wpływu tego czynnika na proliferację tej właśnie linii komórek nowotworowych [279]. Część z zaobserwowanych różnic może wynikać z odmiennych technik oceny działania poszczególnych czynników, czego przykładem może być m.in. użycie w niniejszej rozprawie ich egzogennych, rekombinowanych form, w przeciwieństwie do wykorzystanej przez innych autorów techniki transfekcji lentiwirusowej [286]. Inną przyczyną stwierdzonych różnic mogą być też odmienne zakresy stężeń testowanych czynników [279].

Udokumentowanie pobudzającego proliferację i/lub migrację wpływu egzogennych, rekombinowanych form wyszczególnionych wyżej czynników nie uprawnia jednak do wysunięcia wniosku, że to właśnie one, w takiej a nie innej konfiguracji, są odpowiedzialne za pobudzający oba zjawiska wpływ medium kondycjonowanego z hodowli starych LKMO. Aby ostatecznie wyjaśnić tę kwestię, przeprowadzono dalsze badania interwencyjne, których istotą było określenie zmian efektywności proliferacji i migracji komórek rakowych w wyniku ich ekspozycji na rzeczone media, po ich uprzednim wzbogaceniu w specyficzne

przeciwciała, neutralizujące potencjalne mediatory proliferacji i migracji. Efektem tych badań było zidentyfikowanie właściwych, rozpuszczalnych mediatorów działania starych LKMO. Dla proliferacji komórek okazały się nimi, odpowiednio: CXCL1/GRO-1, CXCL8/IL-8, IL-6 i fibronektyna (dla A2780); CXCL8/IL-8, IL-6 i fibronektyna (dla OVCAR-3) i CXCL1/GRO-1, CXCL8/IL-8 i fibronektyna (dla SKOV-3). W odniesieniu do procesu migracji, wpływ starych LKMO odbywał się poprzez: CXCL1/GRO-1 i TGF- β 1 (dla A2780); CXCL1/GRO-1, CXCL8/IL-8 i fibronektynę (dla OVCAR-3) oraz CXCL8/IL-8 i IL-6 (dla SKOV-3). W kontekście powyższej obserwacji należy podkreślić, że wymienione mediatory działają w sposób synergistyczny, gdyż tylko jednoczesne unieczynnienie wszystkich z nich (specyficznych dla danego procesu i linii komórkowej) spowodowało całkowite zniesienie pobudzającego wpływu komórek starych.

Na koniec rozważań, poświęconych pronowotworowemu wpływowi czynników, wydzielanych do środowiska przez stare LKMO warto zwrócić uwagę, że opisany efekt był ograniczony tylko do komórek nowotworowych. Aby bowiem ocenić, czy nasilające proliferację działanie medium kondycjonowanego, generowanego przez stare LKMO ma charakter uniwersalny, czy komórkowo specyficzny, działaniu tego medium poddano dwie populacje prawidłowych komórek otrzewnej, tj. młode LKMO i fibroblasty. Badania te wykazały, że w obu przypadkach, ekspozycja komórek na media pochodzące ze starych LKMO hamuje ich proliferację oraz nasila komórkowe starzenie. Co ciekawe, mediatorem tych efektów okazał się być TGF- β 1, który uległ aktywacji dzięki aktywności TSP-1 [227]. Uzyskany wynik jest zgodny z danymi literaturowymi, w tym pochodzącymi z badań na fibroblastach, które wykazały, że komórki stare pobudzają proliferację pre-neoplastycznych komórek nabłonkowych oraz komórek raka piersi, jednak pozostają bez wpływu na komórki prawidłowe [136].

Istotą kolejnej części badań, przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy, była próba potwierdzenia wyników uzyskanych na modelach komórkowych *in vitro* z wykorzystaniem modelu zwierzęcego *in vivo*. W swej istocie doświadczenia te polegały na dootrzewnowej implantacji myszom Scid specjalnie dobranych mieszanin komórkowych, w skład których wchodziły młode lub stare LKMO oraz badane linie komórek raka jajnika w stosunku 1:1. Następnie, rozwój guzów nowotworowych w otrzewnej monitorowano za pomocą nieinwazyjnego systemu obrazowania IVIS Spectrum, a po upływie 21 dni eksperymentu, zwierzęta poddawano eutanazji, a usunięte guzy poddawano ocenie histopatologicznej. Zastosowany model badawczy, zarówno w zakresie wykorzystanych

myszy, jak również dootrzewnowej drogi wszczepiania komórek był zgodny z istniejącymi w tym zakresie danymi literaturowymi [292;293]. Jednoczesne dootrzewnowe wszczepienie młodych lub starych komórek mezotelialnych wraz z komórkami raka jajnika, dokonane celem monitoringu progresji tych drugich było natomiast podejściem nowatorskim. Do tej pory, podobny zabieg wykonywano z użyciem starych fibroblastów, które wszczepiano podskórnym zwierzętom modelowym wraz z komórkami raka piersi [137;252] lub raka płuca [257].

Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że różnice w tempie progresji komórek nowotworowych obserwowane *in vitro* przekładają się na dynamikę rozwoju guzów w otrzewnej zwierząt laboratoryjnych *in vivo*. Najlepszym tego przykładem były komórki A2780, które dawały guzy o największych rozmiarach i rozwijające się w najkrótszym czasie, co było prawdopodobnie związane z najwyższym tempem ich proliferacji [294]. Także wpływ starych komórek mezotelialnych na rozwój zmian nowotworowych był najbardziej zauważalny w ksenograftach, wykształconych po wszczepieniu komórek A2780 i SKOV-3. Dla tych bowiem linii komórkowych, dynamika rozwoju guza (A2780, SKOV-3), jak również liczba rozwiniętych zmian (SKOV-3) pod wpływem starych LKMO były istotnie wyższe w porównaniu z działaniem komórek młodych. W przypadku komórek linii OVCAR-3 daje się zauważyć analogiczną tendencję, jednak mniejsza liczebność zwierząt w tej grupie doświadczalnej uniemożliwiła przeprowadzenie pełnej analizy statystycznej zaobserwowanych różnic.

Wydaje się bardzo prawdopodobne, że nasilony rozwój zmian nowotworowych w otrzewnej może być związany z wykazanim w badaniach *in vitro* fenotypem sekrecyjnym starych LKMO. Przemawiać mogą za tym m.in. badania zespołu Studebaker i wsp., którzy wykazali, że efektywność rozwoju guzów piersi w podskórnym modelu kancerogenezy u myszy jest determinowana zdolnością starych fibroblastów do wydzielania do środowiska IL-6 [295]. Do podobnych wniosków doszli także Liu i Hornsby, którzy dowiedli, że wpływ starych fibroblastów na wielkość wykształconych guzów piersi u myszy zależy od wydzielania przez nie białek z grupy metaloproteaz [137]. Nie do przecenienia wydaje się być także zwiększona zdolność starych LKMO do wydzielania do środowiska szeregu aktywnych biologicznie mediatorów angiogenezy (CCL2/MCP-1, CXCL1/GRO-1, CXCL8/IL-8, VEGF) [227;254], umożliwiających neowaskularyzację tkanki objętej procesem nowotworowym i dalszy postęp choroby. Wydaje się to być szczególnie istotne w kontekście wyników badań Gerber i wsp., którzy wykazali, że implantacja różnego typu

komórek nowotworowych, w tym raka jajnika, w otrzewnej dotyczy przede wszystkim rejonów o wysokiej gęstości naczyń krwionośnych [296].

Podsumowując przeprowadzone w niniejszej rozprawie badania należy podkreślić, że są one pierwszym tak kompleksowym opracowaniem, dotyczącym współzależności między procesem starzenia się prawidłowego mezotelium otrzewnego a wewnątrzotrzewnąą progresją raka jajnika. Dzięki spójności wyników uzyskanych w badaniach *in vitro* i *in vivo* można wysunąć szereg wniosków na temat przyczynowej roli starzenia komórkowego we wzroście wewnątrzotrzewnowej agresywności nowotworu u osób starszych. Uzyskane dane wydają się być dobrym punktem wyjścia do dalszej, pogłębionej analizy molekularnych współzależności między starzeniem się mezotelium a chorobą nowotworową, w tym analizy ścieżek sygnałowych łączących oba zjawiska. Istotnym wydaje się być także podjęcie próby udokumentowania obecności starych komórek mezotelialnych w bliskim sąsiedztwie komórek raka jajnika w tkance otrzewnej, jak również określenie znaczenia starych komórek mezotelialnych w powstawaniu płynu puchlinowego, którego gromadzenie się jest cechą dużej części pacjentów w zaawansowanych stadiach choroby [297]. Wymienione zagadnienia staną się treścią kolejnych projektów badawczych, zaplanowanych do realizacji w Katedrze i Zakładzie Patofizjologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

6. WNIOSKI

1. Wzrost proliferacji, migracji i inwazyjności komórek raka jajnika pod wpływem starych komórek mezotelium otrzewnowego *in vitro*, jak również pobudzający wpływ tych komórek na rozwój guzów nowotworowych w otrzewnej zwierząt doświadczalnych *in vivo* sugerują, że nasilenie wewnątrzotrzewnowej progresji komórek raka jajnika u osób starszych może być przyczynowo związane z gromadzeniem się i aktywnością w otrzewnej starych komórek mezotelialnych.
2. Pronowotworowy wpływ starych komórek mezotelialnych jest związany zarówno z ich właściwościami wydzielniczymi, jak również z ich bezpośrednimi oddziaływaniami z komórkami rakowymi.
3. Ponieważ kompozycja rozpuszczalnych mediatorów, za pośrednictwem których stare mezotelium pobudza progresję raka jajnika jest uzależniona od użytej do badań linii komórek nowotworowych, można stwierdzić, że pronowotworowe działanie komórek starych nie ma charakteru uniwersalnego, lecz komórkowo-specyficzny.
4. Wykazanie wpływu starzenia się mezotelium otrzewnowego na progresję raka jajnika jest przesłanką do podjęcia poszukiwań nowych strategii terapeutycznych, które pozwolą na ograniczenie inwazyjności komórek nowotworowych w otrzewnej poprzez modulowanie tempa starzenia się oraz określonych cech fenotypowych komórek mezotelialnych.

Część wyników badań, ujętych w niniejszej rozprawie została opublikowana w pracy: „*Bystander senescence in human peritoneal mesothelium and fibroblasts is related to thrombospondin-1-dependent activation of transforming growth factor- β 1*”, autorstwa Mikuła-Pietrasik J, **Sosińska P**, Janus J, Rubiś B, Brewińska-Olchowik M, Piwocka K, Książek K., opublikowanej w czasopiśmie *Int J Biochem Cell Biol* 2013, 45(9): 2087-2096

Ponadto, wyniki tych badań zostały zaprezentowane w formie prezentacji plakatowej pt. "*Senescent human peritoneal mesothelial cells promote the intraperitoneal development of ovarian cancer metastasis*", przedstawionej podczas 3rd World Congress on Reproduction, Oxidative Stress and Antioxidants (Paryż, 2014) (autorzy: **Sosińska P.**, Mikuła-Pietrasik J., Kucińska M., Piotrowska H., Murias M., Książek K.).

7. PIŚMIENNICTWO

1. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell* 2013; 153: 1194-217
2. Naylor RM, Baker DJ, van Deursen JM. Senescent cells: a novel therapeutic target for aging and age-related diseases. *Clin Pharmacol Ther* 2013; 93: 105-16
3. Davies AM. Epidemiology and the challenge of ageing. *Int J Epidemiol* 1985; 14: 9-21
4. Lukanova A, Kaaks R. Endogenous hormones and ovarian cancer: epidemiology and current hypotheses. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 98-107
5. Rader JS, Neuman RJ, Brady J *et al.* Cancer among first-degree relatives of probands with invasive and borderline ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 1998; 92: 589-95
6. Carrel A, Ebeling AH. AGE AND MULTIPLICATION OF FIBROBLASTS. *J Exp Med* 1921; 34: 599-623
7. Witkowski JA. Dr. Carrel's immortal cells. *Med Hist* 1980; 24: 129-42
8. HAYFLICK L, MOORHEAD PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961; 25: 585-621
9. HAYFLICK L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965; 37: 614-36
10. Shay JW, Wright WE. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature* 2000; 1: 72-76
11. Broccoli D. Function, replication and structure of the mammalian telomere. *Cytotechnology* 2004; 45: 3-12
12. Martinez P, Ferrara-Romeo I, Flores JM, Blasco MA. Essential role for the TRF2 telomere protein in adult skin homeostasis. *Aging Cell* 2014;
13. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS *et al.* A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 6622-26
14. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990; 345: 458-60
15. Olovnikov AM. [Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides]. *Dokl Akad Nauk SSSR* 1971; 201: 1496-99
16. Watson JD. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol* 1972; 239: 197-201

17. Allsopp RC, Harley CB. Evidence for a critical telomere length in senescent human fibroblasts. *Exp Cell Res* 1995; 219: 130-136
18. Greider CW. Telomeres and senescence: the history, the experiment, the future. *Curr Biol* 1998; 8: R178-R181
19. Olovnikov AM. Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory. *Exp Gerontol* 1996; 31: 443-48
20. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 1985; 43: 405-13
21. Forsyth NR, Wright WE, Shay JW. Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation* 2002; 69: 188-97
22. Greider CW. Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem* 1996; 65: 337-65
23. Collins K, Mitchell JR. Telomerase in the human organism. *Oncogene* 2002; 21: 564-79
24. Kang MK, Guo W, Park NH. Replicative senescence of normal human oral keratinocytes is associated with the loss of telomerase activity without shortening of telomeres. *Cell Growth Differ* 1998; 9: 85-95
25. Książek K., Passos JF, Olijslagers S, Saretzki G, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T. Premature senescence of mesothelial cells is associated with non-telomeric DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 362: 707-11
26. Belair CD, Yeager TR, Lopez PM, Reznikoff CA. Telomerase activity: a biomarker of cell proliferation, not malignant transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 13677-82
27. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266: 2011-15
28. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33: 787-91
29. Nabetani A, Ishikawa F. Alternative lengthening of telomeres pathway: recombination-mediated telomere maintenance mechanism in human cells. *J Biochem* 2011; 149: 5-14
30. Draskovic I, Londono VA. Telomere recombination and alternative telomere lengthening mechanisms. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2013; 18: 1-20
31. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S *et al.* Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 1999; 97: 503-14

32. Li GZ, Eller MS, Firoozabadi R, Gilchrest BA. Evidence that exposure of the telomere 3' overhang sequence induces senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 527-31
33. von Zglinicki T. Telomeres and replicative senescence: Is it only length that counts? *Cancer Lett* 2001; 168: 111-16
34. Saretzki G, Sitte N, Merkel U, Wurm RE, von ZT. Telomere shortening triggers a p53-dependent cell cycle arrest via accumulation of G-rich single stranded DNA fragments. *Oncogene* 1999; 18: 5148-58
35. Barascu A, Le CC, Pennarun G *et al.* Oxidative stress induces an ATM-independent senescence pathway through p38 MAPK-mediated lamin B1 accumulation. *EMBO J* 2012; 31: 1080-1094
36. Nogueira V, Park Y, Chen CC *et al.* Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis. *Cancer Cell* 2008; 14: 458-70
37. von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* 2002; 27: 339-44
38. von Zglinicki T, Pilger R, Sitte N. Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 64-74
39. von Zglinicki T, Saretzki G, Docke W, Lotze C. Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp Cell Res* 1995; 220: 186-93
40. Itahana K, Dimri G, Campisi J. Regulation of cellular senescence by p53. *Eur J Biochem* 2001; 268: 2784-91
41. Junttila MR, Evan GI. p53--a Jack of all trades but master of none. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 821-29
42. Grossman SR. p300/CBP/p53 interaction and regulation of the p53 response. *Eur J Biochem* 2001; 268: 2773-78
43. Moll UM, Petrenko O. The MDM2-p53 interaction. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 1001-8
44. Haupt Y, Rowan S, Shaulian E, Kazaz A, Vousden K, Oren M. p53 mediated apoptosis in HeLa cells: transcription dependent and independent mechanisms. *Leukemia* 1997; 11 Suppl 3: 337-39
45. Shirangi TR, Zaika A, Moll UM. Nuclear degradation of p53 occurs during down-regulation of the p53 response after DNA damage. *FASEB J* 2002; 16: 420-422
46. Artandi SE, Attardi LD. Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331: 881-90

47. von Zglinicki T, Saretzki G, Ladhoff J, d'Adda di Fagagna F, Jackson SP. Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech Ageing Dev* 2005; 126: 111-17
48. Herbig U, Jobling WA, Chen BP, Chen DJ, Sedivy JM. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell* 2004; 14: 501-13
49. Roninson IB. Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Lett* 2002; 179: 1-14
50. Herbig U, Sedivy JM. Regulation of growth arrest in senescence: telomere damage is not the end of the story. *Mech Ageing Dev* 2006; 127: 16-24
51. Datto MB, Li Y, Panus JF, Howe DJ, Xiong Y, Wang XF. Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 5545-49
52. Alpan RS, Pardee AB. p21WAF1/CIP1/SDI1 is elevated through a p53-independent pathway by mimosine. *Cell Growth Differ* 1996; 7: 893-901
53. Gartel AL, Tyner AL. Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res* 1999; 246: 280-289
54. Macleod KF, Sherry N, Hannon G *et al.* p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev* 1995; 9: 935-44
55. Kiyono T, Foster SA, Koop JI, McDougall JK, Galloway DA, Klingelhutz AJ. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 1998; 396: 84-88
56. Ramirez RD, Morales CP, Herbert BS *et al.* Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes Dev* 2001; 15: 398-403
57. Lowe SW, Sherr CJ. Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr Opin Genet Dev* 2003; 13: 77-83
58. Lin AW, Barradas M, Stone JC, van AL, Serrano M, Lowe SW. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev* 1998; 12: 3008-19
59. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997; 88: 593-602
60. Robles SJ, Adami GR. Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* 1998; 16: 1113-23

61. Smogorzewska A, de LT. Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *EMBO J* 2002; 21: 4338-48
62. Jacobs JJ, de Lange T. Significant role for p16INK4a in p53-independent telomere-directed senescence. *Curr Biol* 2004; 14: 2302-8
63. Stein GH, Drullinger LF, Soulard A, Dulic V. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 2109-17
64. Narita M, Nunez S, Heard E *et al.* Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 2003; 113: 703-16
65. Ohtani N, Zebedee Z, Huot TJ *et al.* Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature* 2001; 409: 1067-70
66. Jacobs JJ, Kieboom K, Marino S, DePinho RA, van LM. The oncogene and Polycomb-group gene *bmi-1* regulates cell proliferation and senescence through the *ink4a* locus. *Nature* 1999; 397: 164-68
67. Guney I, Wu S, Sedivy JM. Reduced c-Myc signaling triggers telomere-independent senescence by regulating *Bmi-1* and p16(INK4a). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 3645-50
68. Beausejour CM, Krtolica A, Galimi F *et al.* Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* 2003; 22: 4212-22
69. Holliday R. Strong effects of 5-azacytidine on the in vitro lifespan of human diploid fibroblasts. *Exp Cell Res* 1986; 166: 543-52
70. Ogryzko VV, Hirai TH, Russanova VR, Barbie DA, Howard BH. Human fibroblast commitment to a senescence-like state in response to histone deacetylase inhibitors is cell cycle dependent. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 5210-5218
71. Venable ME, Lee JY, Smyth MJ, Bielawska A, Obeid LM. Role of ceramide in cellular senescence. *J Biol Chem* 1995; 270: 30701-8
72. Rubin H. Cell aging in vivo and in vitro. *Mech Ageing Dev* 1997; 98: 1-35
73. Sherr CJ, DePinho RA. Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell* 2000; 102: 407-10
74. Courtois-Cox S, Jones SL, Cichowski K. Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene* 2008; 27: 2801-9
75. Cahill MA, Janknecht R, Nordheim A. Signalling pathways: jack of all cascades. *Curr Biol* 1996; 6: 16-19
76. Lee AC, Fenster BE, Ito H *et al.* Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 1999; 274: 7936-40

77. Wu C, Miloslavskaya I, Demontis S, Maestro R, Galaktionov K. Regulation of cellular response to oncogenic and oxidative stress by Seladin-1. *Nature* 2004; 432: 640-645
78. Campisi J. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol* 2001; 11: S27-S31
79. Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* 2011; 192: 547-56
80. Johnson JE, Jr. Fine structure of IMR-90 cells in culture as examined by scanning and transmission electron microscopy. *Mech Ageing Dev* 1979; 10: 405-43
81. Brandes D, Murphy DG, Anton EB, Barnard S. Ultrastructural and cytochemical changes in cultured human lung cells. *J Ultrastruct Res* 1972; 39: 465-83
82. Nuss JE, Choksi KB, Deford JH, Papaconstantinou J. Decreased enzyme activities of chaperones PDI and BiP in aged mouse livers. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 365: 355-61
83. Rabek JP, Boylston WH, III, Papaconstantinou J. Carbonylation of ER chaperone proteins in aged mouse liver. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305: 566-72
84. Passos JF, von Zglinicki T, Saretzki G. Mitochondrial dysfunction and cell senescence: cause or consequence? *Rejuvenation Res* 2006; 9: 64-68
85. Terman A, Gustafsson B, Brunk UT. Autophagy, organelles and ageing. *J Pathol* 2007; 211: 134-43
86. Sitte N, Merker K, Grune T, von ZT. Lipofuscin accumulation in proliferating fibroblasts in vitro: an indicator of oxidative stress. *Exp Gerontol* 2001; 36: 475-86
87. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* 2000; 113 (Pt 20): 3613-22
88. Lee BY, Han JA, Im JS *et al.* Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* 2006; 5: 187-95
89. Dimri GP, Lee X, Basile G *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 9363-67
90. Severino J, Allen RG, Balin S, Balin A, Cristofalo VJ. Is beta-galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo? *Exp Cell Res* 2000; 257: 162-71
91. Sosinska P, Mikula-Pietrasik J, Ryzek M, Naumowicz E, Ksiazek K. Specificity of cytochemical and fluorescence methods of senescence-associated beta-galactosidase detection for ageing driven by replication and time. *Biogerontology* 2014; 15: 407-13
92. d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L *et al.* A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 2003; 426: 194-98

93. Zhang R, Poustovoitov MV, Ye X *et al.* Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell* 2005; 8: 19-30
94. Rodier F, Munoz DP, Teachenor R *et al.* DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J Cell Sci* 2011; 124: 68-81
95. Wolf FI, Torsello A, Covacci V *et al.* Oxidative DNA damage as a marker of aging in WI-38 human fibroblasts. *Exp Gerontol* 2002; 37: 647-56
96. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 729-40
97. Hampel B, Wagner M, Teis D, Zwerschke W, Huber LA, Jansen-Durr P. Apoptosis resistance of senescent human fibroblasts is correlated with the absence of nuclear IGFBP-3. *Aging Cell* 2005; 4: 325-30
98. Coppe JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* 2010; 5: 99-118
99. Coppe JP, Patil CK, Rodier F *et al.* Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* 2008; 6: 2853-68
100. Pascal T, bacq-Chainiaux F, Chretien A *et al.* Comparison of replicative senescence and stress-induced premature senescence combining differential display and low-density DNA arrays. *FEBS Lett* 2005; 579: 3651-59
101. Yoon IK, Kim HK, Kim YK *et al.* Exploration of replicative senescence-associated genes in human dermal fibroblasts by cDNA microarray technology. *Exp Gerontol* 2004; 39: 1369-78
102. Rodier F, Coppe JP, Patil CK *et al.* Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 973-79
103. Pazolli E, Alspach E, Milczarek A, Prior J, Piwnica-Worms D, Stewart SA. Chromatin remodeling underlies the senescence-associated secretory phenotype of tumor stromal fibroblasts that supports cancer progression. *Cancer Res* 2012; 72: 2251-61
104. Chien Y, Scuoppo C, Wang X *et al.* Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF-kappaB promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev* 2011; 25: 2125-36
105. Freund A, Patil CK, Campisi J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J* 2011; 30: 1536-48

106. Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity. *Immunol Rev* 2009; 227: 95-105
107. Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T *et al.* A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol* 2013; 15: 978-90
108. Liu F, Wu S, Ren H, Gu J. Klotho suppresses RIG-I-mediated senescence-associated inflammation. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 254-62
109. Książek K., Winckiewicz M, Staniszewski R, Breborowicz A, Witowski J. Correlation between the donor age and the proliferative lifespan of human peritoneal mesothelial cells in vitro: is TGF-beta1 a link? *Exp Gerontol* 2007; 42: 840-843
110. Hoshi H, McKeenan WL. Isolation, growth requirements, cloning, prostacyclin production and life-span of human adult endothelial cells in low serum culture medium. *In Vitro Cell Dev Biol* 1986; 22: 51-56
111. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975; 6: 331-43
112. Ressler S, Bartkova J, Niederegger H *et al.* p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell* 2006; 5: 379-89
113. Matthews C, Gorenne I, Scott S *et al.* Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: effects of telomerase and oxidative stress. *Circ Res* 2006; 99: 156-64
114. Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Ishida Y, Yoshida H, Komuro I. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation* 2002; 105: 1541-44
115. Xiao X, Wang Y, Gong H, Chen P, Xie L. Molecular evidence of senescence in corneal endothelial cells of senescence-accelerated mice. *Mol Vis* 2009; 15: 747-61
116. Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. Accelerated cellular senescence in degenerate intervertebral discs: a possible role in the pathogenesis of intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther* 2007; 9: R45
117. Campisi J, Andersen JK, Kapahi P, Melov S. Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease? *Semin Cancer Biol* 2011; 21: 354-59
118. Krtolica A, Campisi J. Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34: 1401-14
119. Parrinello S, Coppe JP, Krtolica A, Campisi J. Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J Cell Sci* 2005; 118: 485-96

120. Nouredine H, Gary-Bobo G, Alifano M *et al.* Pulmonary artery smooth muscle cell senescence is a pathogenic mechanism for pulmonary hypertension in chronic lung disease. *Circ Res* 2011; 109: 543-53
121. Wang JC, Bennett M. Aging and atherosclerosis: mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence. *Circ Res* 2012; 111: 245-59
122. Tchkonja T, Morbeck DE, von ZT *et al.* Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell* 2010; 9: 667-84
123. Finkel T, Serrano M, Blasco MA. The common biology of cancer and ageing. *Nature* 2007; 448: 767-74
124. Zimmerman JA, Trombetta LD, Carter TH, Weisbroth SH. Pancreatic carcinoma induced by N-methyl-N'-nitrosourea in aged mice. *Gerontology* 1982; 28: 114-20
125. McCullough KD, Coleman WB, Smith GJ, Grishan JW. Age-dependent regulation of the tumorigenic potential of neoplastically transformed rat liver epithelial cells by the liver microenvironment. *Cancer Res* 1994; 54: 3668-71
126. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010; 60: 277-300
127. DePinho RA. The age of cancer. *Nature* 2000; 408: 248-54
128. Balducci L, Lyman GH. Cancer in the elderly. Epidemiologic and clinical implications. *Clin Geriatr Med* 1997; 13: 1-14
129. Deng G, Lu Y, Zlotnikov G, Thor AD, Smith HS. Loss of heterozygosity in normal tissue adjacent to breast carcinomas. *Science* 1996; 274: 2057-59
130. Jonason AS, Kunala S, Price GJ *et al.* Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 14025-29
131. Dolle ME, Snyder WK, Gossen JA, Lohman PH, Vijg J. Distinct spectra of somatic mutations accumulated with age in mouse heart and small intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 8403-8
132. Park CC, Bissell MJ, Barcellos-Hoff MH. The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. *Mol Med Today* 2000; 6: 324-29
133. Kleinerman DI, Dinney CP, Zhang WW, Lin SH, Van NT, Hsieh JT. Suppression of human bladder cancer growth by increased expression of C-CAM1 gene in an orthotopic model. *Cancer Res* 1996; 56: 3431-35
134. Campisi J. Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo* 2000; 14: 183-88
135. Campisi J. Cancer and ageing: rival demons? *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 339-49

136. Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY, Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 12072-77
137. Liu D, Hornsby PJ. Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res* 2007; 67: 3117-26
138. Bavik C, Coleman I, Dean JP, Knudsen B, Plymate S, Nelson PS. The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms. *Cancer Res* 2006; 66: 794-802
139. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag* 2006; 2: 213-19
140. Coppe JP, Kauser K, Campisi J, Beausejour CM. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem* 2006; 281: 29568-74
141. Ledermann JA, Raja FA, Fotopoulou C, Gonzalez-Martin A, Colombo N, Sessa C. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2013; 24 Suppl 6: vi24-vi32
142. Sarojini S, Tamir A, Lim H *et al.* Early detection biomarkers for ovarian cancer. *J Oncol* 2012; 2012: 709049
143. Jelovac D, Armstrong DK. Recent progress in the diagnosis and treatment of ovarian cancer. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 183-203
144. Shimizu Y, Kamoi S, Amada S, Hasumi K, Akiyama F, Silverberg SG. Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma. I. Prognostic significance of histopathologic features--problems involved in the architectural grading system. *Gynecol Oncol* 1998; 70: 2-12
145. Goff BA, Mandel L, Muntz HG, Melancon CH. Ovarian carcinoma diagnosis. *Cancer* 2000; 89: 2068-75
146. Odicino F, Pecorelli S, Zigliani L, Creasman WT. History of the FIGO cancer staging system. *Int J Gynaecol Obstet* 2008; 101: 205-10
147. Hamilton TC. Ovarian cancer, Part I: Biology. *Curr Probl Cancer* 1992; 16: 1-57
148. Nowak-Markwitz E, Jankowska A, Spaczynski M. [Gonadotropins and ovarian cancer]. *Ginekol Pol* 2005; 76: 153-62
149. Nowak-Markwitz E, Spaczynski M. [Ovarian cancer--modern approach to its origin and histogenesis]. *Ginekol Pol* 2012; 83: 454-57
150. Fathalla MF. Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 1971; 2: 163

151. Cheng W, Liu J, Yoshida H, Rosen D, Naora H. Lineage infidelity of epithelial ovarian cancers is controlled by HOX genes that specify regional identity in the reproductive tract. *Nat Med* 2005; 11: 531-37
152. Ahmed AA, Becker CM, Bast RC, Jr. The origin of ovarian cancer. *BJOG* 2012; 119: 134-36
153. Cho KR, Shih I. Ovarian cancer. *Annu Rev Pathol* 2009; 4: 287-313
154. Dubeau L. The cell of origin of ovarian epithelial tumors and the ovarian surface epithelium dogma: does the emperor have no clothes? *Gynecol Oncol* 1999; 72: 437-42
155. Dubeau L. The cell of origin of ovarian epithelial tumours. *Lancet Oncol* 2008; 9: 1191-97
156. Kurman RJ, Shih I. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol* 2010; 34: 433-43
157. Piek JM, van Diest PJ, Zweemer RP, Kenemans P, Verheijen RH. Tubal ligation and risk of ovarian cancer. *Lancet* 2001; 358: 844
158. Narod SA, Sun P, Ghadirian P *et al.* Tubal ligation and risk of ovarian cancer in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations: a case-control study. *Lancet* 2001; 357: 1467-70
159. Finch A, Shaw P, Rosen B, Murphy J, Narod SA, Colgan TJ. Clinical and pathologic findings of prophylactic salpingo-oophorectomies in 159 BRCA1 and BRCA2 carriers. *Gynecol Oncol* 2006; 100: 58-64
160. Ortiz BH, Ailawadi M, Colitti C *et al.* Second primary or recurrence? Comparative patterns of p53 and K-ras mutations suggest that serous borderline ovarian tumors and subsequent serous carcinomas are unrelated tumors. *Cancer Res* 2001; 61: 7264-67
161. De GC, Lichtman SM. Care of elderly women with ovarian cancer. *Geriatr Nurs* 2004; 25: 329-35
162. Chudecka-Glaz A, Rzepka-Gorska I, Kosmowska B. Gonadotropin (LH, FSH) levels in serum and cyst fluid in epithelial tumors of the ovary. *Arch Gynecol Obstet* 2004; 270: 151-56
163. Hightower RD, Nguyen HN, Averette HE, Hoskins W, Harrison T, Steren A. National survey of ovarian carcinoma. IV: Patterns of care and related survival for older patients. *Cancer* 1994; 73: 377-83
164. Pieta B, Chmaj-Wierzchowska K, Opala T. Past obstetric history and risk of ovarian cancer. *Ann Agric Environ Med* 2012; 19: 385-88

165. Franceschi S, La VC, Booth M *et al.* Pooled analysis of 3 European case-control studies of ovarian cancer: II. Age at menarche and at menopause. *Int J Cancer* 1991; 49: 57-60
166. Bristow RE, Karlan BY. Ovulation induction, infertility, and ovarian cancer risk. *Fertil Steril* 1996; 66: 499-507
167. Rossing MA, Daling JR, Weiss NS, Moore DE, Self SG. Ovarian tumors in a cohort of infertile women. *N Engl J Med* 1994; 331: 771-76
168. Trabert B, Wentzensen N, Yang HP *et al.* Ovarian cancer and menopausal hormone therapy in the NIH-AARP diet and health study. *Br J Cancer* 2012; 107: 1181-87
169. Purdie DM, Bain CJ, Siskind V, Webb PM, Green AC. Ovulation and risk of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer* 2003; 104: 228-32
170. Mosgaard BJ, Lidegaard O, Kjaer SK, Schou G, Andersen AN. Infertility, fertility drugs, and invasive ovarian cancer: a case-control study. *Fertil Steril* 1997; 67: 1005-12
171. Narod SA. Hormonal prevention of hereditary breast cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 952: 36-43
172. Gronwald J, Byrski T, Huzarski T *et al.* Influence of selected lifestyle factors on breast and ovarian cancer risk in BRCA1 mutation carriers from Poland. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 95: 105-9
173. Key TJ. Hormones and cancer in humans. *Mutat Res* 1995; 333: 59-67
174. Narod SA, Risch H, Moslehi R *et al.* Oral contraceptives and the risk of hereditary ovarian cancer. Hereditary Ovarian Cancer Clinical Study Group. *N Engl J Med* 1998; 339: 424-28
175. Alsop K, Fereday S, Meldrum C *et al.* BRCA mutation frequency and patterns of treatment response in BRCA mutation-positive women with ovarian cancer: a report from the Australian Ovarian Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 2012; 30: 2654-63
176. Bewtra C, Watson P, Conway T, Read-Hippee C, Lynch HT. Hereditary ovarian cancer: a clinicopathological study. *Int J Gynecol Pathol* 1992; 11: 180-187
177. Lynch HT, Casey MJ, Snyder CL *et al.* Hereditary ovarian carcinoma: heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management. *Mol Oncol* 2009; 3: 97-137
178. Colombo N, Van GT, Parma G *et al.* Ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006; 60: 159-79
179. Harris R, Whittemore AS, Itnyre J. Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. III. Epithelial tumors of low malignant potential in white women. Collaborative Ovarian Cancer Group. *Am J Epidemiol* 1992; 136: 1204-11

180. Fairfield KM, Willett WC, Rosner BA, Manson JE, Speizer FE, Hankinson SE. Obesity, weight gain, and ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 2002; 100: 288-96
181. Zhang M, Lee AH, Binns CW. Physical activity and epithelial ovarian cancer risk: a case-control study in China. *Int J Cancer* 2003; 105: 838-43
182. Cozen W, Peters R, Reichardt JK *et al.* Galactose-1-phosphate uridyl transferase (GALT) genotype and phenotype, galactose consumption, and the risk of borderline and invasive ovarian cancer (United States). *Cancer Causes Control* 2002; 13: 113-20
183. Huncharek M, Kupelnick B. Dietary fat intake and risk of epithelial ovarian cancer: a meta-analysis of 6,689 subjects from 8 observational studies. *Nutr Cancer* 2001; 40: 87-91
184. Konishi I, Kuroda H, Mandai M. Review: gonadotropins and development of ovarian cancer. *Oncology* 1999; 57 Suppl 2: 45-48
185. Kowalska E, Narod SA, Huzarski T *et al.* Increased rates of chromosome breakage in BRCA1 carriers are normalized by oral selenium supplementation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1302-6
186. Bosetti C, Negri E, Franceschi S *et al.* Olive oil, seed oils and other added fats in relation to ovarian cancer (Italy). *Cancer Causes Control* 2002; 13: 465-70
187. Romero I, Bast RC, Jr. Minireview: human ovarian cancer: biology, current management, and paths to personalizing therapy. *Endocrinology* 2012; 153: 1593-602
188. Amadori D, Sansoni E, Amadori A. Ovarian cancer: natural history and metastatic pattern. *Front Biosci* 1997; 2: g8-10
189. Gardner MJ, Jones LM, Catterall JB, Turner GA. Expression of cell adhesion molecules on ovarian tumour cell lines and mesothelial cells, in relation to ovarian cancer metastasis. *Cancer Lett* 1995; 91: 229-34
190. Iwanicki MP, Davidowitz RA, Ng MR *et al.* Ovarian cancer spheroids use myosin-generated force to clear the mesothelium. *Cancer Discov* 2011; 1: 144-57
191. Kenny HA, Nieman KM, Mitra AK, Lengyel E. The first line of intra-abdominal metastatic attack: breaching the mesothelial cell layer. *Cancer Discov* 2011; 1: 100-102
192. Niedbala MJ, Crickard K, Bernacki RJ. Interactions of human ovarian tumor cells with human mesothelial cells grown on extracellular matrix. An in vitro model system for studying tumor cell adhesion and invasion. *Exp Cell Res* 1985; 160: 499-513
193. Heath RM, Jayne DG, O'Leary R, Morrison EE, Guillou PJ. Tumour-induced apoptosis in human mesothelial cells: a mechanism of peritoneal invasion by Fas Ligand/Fas interaction. *Br J Cancer* 2004; 90: 1437-42

194. Mierke CT, Frey B, Fellner M, Herrmann M, Fabry B. Integrin alpha5beta1 facilitates cancer cell invasion through enhanced contractile forces. *J Cell Sci* 2011; 124: 369-83
195. Cannistra SA, Kansas GS, Niloff J, DeFranzo B, Kim Y, Ottensmeier C. Binding of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro is partly mediated by CD44H. *Cancer Res* 1993; 53: 3830-3838
196. Gardner MJ, Catterall JB, Jones LM, Turner GA. Human ovarian tumour cells can bind hyaluronic acid via membrane CD44: a possible step in peritoneal metastasis. *Clin Exp Metastasis* 1996; 14: 325-34
197. Strobel T, Swanson L, Cannistra SA. In vivo inhibition of CD44 limits intra-abdominal spread of a human ovarian cancer xenograft in nude mice: a novel role for CD44 in the process of peritoneal implantation. *Cancer Res* 1997; 57: 1228-32
198. Bourguignon LY, Zhu H, Shao L, Chen YW. CD44 interaction with c-Src kinase promotes cortactin-mediated cytoskeleton function and hyaluronic acid-dependent ovarian tumor cell migration. *J Biol Chem* 2001; 276: 7327-36
199. Kanazashi SI, Sharma CP, Arnaout MA. Integrin-ligand interactions: scratching the surface. *Curr Opin Hematol* 1997; 4: 67-74
200. Heyman L, Kellouche S, Fernandes J, Dutoit S, Poulain L, Carreiras F. Vitronectin and its receptors partly mediate adhesion of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro. *Tumour Biol* 2008; 29: 231-44
201. Tozer EC, Hughes PE, Loftus JC. Ligand binding and affinity modulation of integrins. *Biochem Cell Biol* 1996; 74: 785-98
202. Rump A, Morikawa Y, Tanaka M *et al.* Binding of ovarian cancer antigen CA125/MUC16 to mesothelin mediates cell adhesion. *J Biol Chem* 2004; 279: 9190-9198
203. Stoeck A, Schlich S, Issa Y *et al.* L1 on ovarian carcinoma cells is a binding partner for Neuropilin-1 on mesothelial cells. *Cancer Lett* 2006; 239: 212-26
204. Wang Y, Yang J, Gao Y *et al.* Regulatory effect of e2, IL-6 and IL-8 on the growth of epithelial ovarian cancer cells. *Cell Mol Immunol* 2005; 2: 365-72
205. Kajiyama H, Shibata K, Terauchi M, Ino K, Nawa A, Kikkawa F. Involvement of SDF-1alpha/CXCR4 axis in the enhanced peritoneal metastasis of epithelial ovarian carcinoma. *Int J Cancer* 2008; 122: 91-99
206. Carpenter PM, Dao AV. The role of hyaluronan in mesothelium-induced motility of ovarian carcinoma cells. *Anticancer Res* 2003; 23: 3985-90
207. Ren J, Xiao YJ, Singh LS *et al.* Lysophosphatidic acid is constitutively produced by human peritoneal mesothelial cells and enhances adhesion, migration, and invasion of ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2006; 66: 3006-14

208. Hirashima Y, Kobayashi H, Suzuki M, Tanaka Y, Kanayama N, Terao T. Transforming growth factor-beta1 produced by ovarian cancer cell line HRA stimulates attachment and invasion through an up-regulation of plasminogen activator inhibitor type-1 in human peritoneal mesothelial cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 26793-802
209. Konecny G, Untch M, Pihan A *et al.* Association of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor with disease progression and prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1743-49
210. Sako A, Kitayama J, Yamaguchi H *et al.* Vascular endothelial growth factor synthesis by human omental mesothelial cells is augmented by fibroblast growth factor-2: possible role of mesothelial cell on the development of peritoneal metastasis. *J Surg Res* 2003; 115: 113-20
211. Rieppi M, Vergani V, Gatto C *et al.* Mesothelial cells induce the motility of human ovarian carcinoma cells. *Int J Cancer* 1999; 80: 303-7
212. Spaczyński M, Nowak-Markwitz E, Kędzia W: *Praktyczna ginekologia onkologiczna. Podręcznik dla lekarzy.* 2012
213. Bristow E, Tomacruz R, Armstrong D., *et al.* Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era; a meta-analysis. *J Clin Oncol* 2002; 1248-59
214. Eisenhauer EL, bu-Rustum NR, Sonoda Y, Aghajanian C, Barakat RR, Chi DS. The effect of maximal surgical cytoreduction on sensitivity to platinum-taxane chemotherapy and subsequent survival in patients with advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2008; 108: 276-81
215. Markman M, Bundy BN, Alberts DS *et al.* Phase III trial of standard-dose intravenous cisplatin plus paclitaxel versus moderately high-dose carboplatin followed by intravenous paclitaxel and intraperitoneal cisplatin in small-volume stage III ovarian carcinoma: an intergroup study of the Gynecologic Oncology Group, Southwestern Oncology Group, and Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1001-7
216. Markman M, Walker JL. Intraperitoneal chemotherapy of ovarian cancer: a review, with a focus on practical aspects of treatment. *J Clin Oncol* 2006; 24: 988-94
217. Di PN, Sacchi G. Atlas of peritoneal histology. *Perit Dial Int* 2000; 20 Suppl 3: S5-96
218. Yung S, Li FK, Chan TM. Peritoneal mesothelial cell culture and biology. *Perit Dial Int* 2006; 26: 162-73
219. Yung S, Chan TM. Mesothelial cells. *Perit Dial Int* 2007; 27 Suppl 2: S110-S115
220. Di PN, Sacchi G. Anatomy and physiology of the peritoneal membrane. *Contrib Nephrol* 1990; 84: 10-26

221. Di PN, Garosi G, Carrera A *et al.* Evaluation of exercise testing for subjects with isolated proteinuria and/or hematuria of unclear significance. *Eur J Intern Med* 2007; 18: 135-40
222. Mutsaers SE. Mesothelial cells: their structure, function and role in serosal repair. *Respirology* 2002; 7: 171-91
223. Mutsaers SE. The mesothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 9-16
224. Mutsaers SE, Whitaker D, Papadimitriou JM. Stimulation of mesothelial cell proliferation by exudate macrophages enhances serosal wound healing in a murine model. *Am J Pathol* 2002; 160: 681-92
225. Ksiazek K, Piwocka K, Brzezinska A *et al.* Early loss of proliferative potential of human peritoneal mesothelial cells in culture: the role of p16INK4a-mediated premature senescence. *J Appl Physiol* 2006; 100: 988-95
226. Ksiazek K, Mikula-Pietrasik J, Jorres A, Witowski J. Oxidative stress-mediated early senescence contributes to the short replicative life span of human peritoneal mesothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2008; 45: 460-467
227. Mikula-Pietrasik J, Sosinska P, Janus J *et al.* Bystander senescence in human peritoneal mesothelium and fibroblasts is related to thrombospondin-1-dependent activation of transforming growth factor-beta1. *Int J Biochem Cell Biol* 2013; 45: 2087-96
228. Książek K., Korybalska K, Jorres A, Witowski J. Accelerated senescence of human peritoneal mesothelial cells exposed to high glucose: the role of TGF-beta1. *Lab Invest* 2007; 87: 345-56
229. Ksiazek K, Mikula-Pietrasik J, Korybalska K, Dworacki G, Jorres A, Witowski J. Senescent peritoneal mesothelial cells promote ovarian cancer cell adhesion: the role of oxidative stress-induced fibronectin. *Am J Pathol* 2009; 174: 1230-1240
230. Ksiazek K. Mesothelial cell: A multifaceted model of aging. *Ageing Res Rev* 2013; 12: 595-604
231. van Bronswijk H, Verbrugh HA, Bos HJ *et al.* Cytotoxic effects of commercial continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) fluids and of bacterial exoproducts on human mesothelial cells in vitro. *Perit Dial Int* 1989; 9: 197-202
232. Hjelle JT, Golinska BT, Waters DC, Steidley KR, McCarroll DR, Dobbie JW. Isolation and propagation in vitro of peritoneal mesothelial cells. *Perit Dial Int* 1989; 9: 341-47
233. Burbridge MF, Kraus-Berthier L, Naze M, Pierre A, Atassi G, Guilbaud N. Biological and pharmacological characterisation of three models of human ovarian carcinoma established in nude mice: use of the CA125 tumour marker to predict antitumour activity. *Int J Oncol* 1999; 15: 1155-62

234. Hamilton TC, Young RC, McKoy WM *et al.* Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer Res* 1983; 43: 5379-89
235. Egawa-Takata T, Endo H, Fujita M *et al.* Early reduction of glucose uptake after cisplatin treatment is a marker of cisplatin sensitivity in ovarian cancer. *Cancer Sci* 2010; 101: 2171-78
236. Behrens BC, Hamilton TC, Masuda H *et al.* Characterization of a cis-diamminedichloroplatinum(II)-resistant human ovarian cancer cell line and its use in evaluation of platinum analogues. *Cancer Res* 1987; 47: 414-18
237. Yu W, Shun MC, Anderson K, Chen H, Sanders BG, Kline K. alpha-TEA inhibits survival and enhances death pathways in cisplatin sensitive and resistant human ovarian cancer cells. *Apoptosis* 2006; 11: 1813-23
238. Bruynzeel AM, bou El Hassan MA, Torun E, Bast A, van d, V, Kruyt FA. Caspase-dependent and -independent suppression of apoptosis by monoHER in Doxorubicin treated cells. *Br J Cancer* 2007; 96: 450-456
239. Bast A, Kaiserova H, den Hartog GJ, Haenen GR, van d, V. Protectors against doxorubicin-induced cardiotoxicity: flavonoids. *Cell Biol Toxicol* 2007; 23: 39-47
240. Wei X, Dombkowski D, Meirelles K *et al.* Mullerian inhibiting substance preferentially inhibits stem/progenitors in human ovarian cancer cell lines compared with chemotherapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 18874-79
241. Hamilton TC, Young RC, Ozols RF. Experimental model systems of ovarian cancer: applications to the design and evaluation of new treatment approaches. *Semin Oncol* 1984; 11: 285-98
242. Fogh J, Wright WC, Loveless JD. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst* 1977; 58: 209-14
243. Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 1977; 59: 221-26
244. Ksiazek K, Breborowicz A, Jorres A, Witowski J. Oxidative stress contributes to accelerated development of the senescent phenotype in human peritoneal mesothelial cells exposed to high glucose. *Free Radic Biol Med* 2007; 42: 636-41
245. Xie B, Laouar A, Huberman E. Fibronectin-mediated cell adhesion is required for induction of 92-kDa type IV collagenase/gelatinase (MMP-9) gene expression during macrophage differentiation. The signaling role of protein kinase C-beta. *J Biol Chem* 1998; 273: 11576-82
246. Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ. Cancer statistics, 2003. *CA Cancer J Clin* 2003; 53: 5-26

247. Yancik R, Ries LA. Aging and cancer in America. Demographic and epidemiologic perspectives. *Hematol Oncol Clin North Am* 2000; 14: 17-23
248. Efstathiou E, Dimopoulos MA, Bozas G *et al.* Advanced epithelial ovarian cancer in the elderly: chemotherapy tolerance and outcome. *Anticancer Res* 2007; 27: 611-17
249. Rzepka-Gorska I, Chudecka-Glaz A, Kosmowska B. FSH and LH serum/tumor fluid ratios and malignant tumors of the ovary. *Endocr Relat Cancer* 2004; 11: 315-21
250. Karagiannis GS, Poutahidis T, Erdman SE, Kirsch R, Riddell RH, Diamandis EP. Cancer-associated fibroblasts drive the progression of metastasis through both paracrine and mechanical pressure on cancer tissue. *Mol Cancer Res* 2012; 10: 1403-18
251. Naora H. Heterotypic Cellular Interactions in the Ovarian Tumor Microenvironment: Biological Significance and Therapeutic Implications. *Front Oncol* 2014; 4: 18
252. Martens JW, Sieuwerts AM, Bolt-deVries J *et al.* Aging of stromal-derived human breast fibroblasts might contribute to breast cancer progression. *Thromb Haemost* 2003; 89: 393-404
253. Clark R, Krishnan V, Schoof M *et al.* Milky spots promote ovarian cancer metastatic colonization of peritoneal adipose in experimental models. *Am J Pathol* 2013; 183: 576-91
254. Ksiazek K, Jorres A, Witowski J. Senescence induces a proangiogenic switch in human peritoneal mesothelial cells. *Rejuvenation Res* 2008; 11: 681-83
255. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science* 2011; 331: 1559-64
256. Domcke S, Sinha R, Levine DA, Sander C, Schultz N. Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nat Commun* 2013; 4: 2126
257. Papadopoulou A, Kletsas D. Human lung fibroblasts prematurely senescent after exposure to ionizing radiation enhance the growth of malignant lung epithelial cells in vitro and in vivo. *Int J Oncol* 2011; 39: 989-99
258. Lawrenson K, Grun B, Benjamin E, Jacobs IJ, Dafou D, Gayther SA. Senescent fibroblasts promote neoplastic transformation of partially transformed ovarian epithelial cells in a three-dimensional model of early stage ovarian cancer. *Neoplasia* 2010; 12: 317-25
259. Liu J, Xu K, Chase M, Ji Y, Logan JK, Buchsbaum RJ. Tiam1-regulated osteopontin in senescent fibroblasts contributes to the migration and invasion of associated epithelial cells. *J Cell Sci* 2012; 125: 376-86
260. Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 362-74

261. Witowski J, Ksiazek K, Jorres A. New insights into the biology of peritoneal mesothelial cells: the roles of epithelial-to-mesenchymal transition and cellular senescence. *Nephron Exp Nephrol* 2008; 108: e69-e73
262. Parrott JA, Skinner MK. Expression and action of hepatocyte growth factor in human and bovine normal ovarian surface epithelium and ovarian cancer. *Biol Reprod* 2000; 62: 491-500
263. Wei W, Kong B, Yang Q, Qu X. Hepatocyte growth factor enhances ovarian cancer cell invasion through downregulation of thrombospondin-1. *Cancer Biol Ther* 2010; 9: 79-87
264. Wang Y, Qu Y, Niu XL, Sun WJ, Zhang XL, Li LZ. Autocrine production of interleukin-8 confers cisplatin and paclitaxel resistance in ovarian cancer cells. *Cytokine* 2011; 56: 365-75
265. Sporn MB, Roberts AB. Autocrine growth factors and cancer. *Nature* 1985; 313: 745-47
266. Langdon SP, Smyth JF. Growth factors and ovarian cancer. *Endocrine-Related Cancer* 1998; 5: 283-91
267. Fumagalli M, dda di FF. SASPense and DDRama in cancer and ageing. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 921-23
268. Kim RH, Lee RS, Williams D *et al.* Bisphosphonates induce senescence in normal human oral keratinocytes. *J Dent Res* 2011; 90: 810-816
269. Sasaki M, Miyakoshi M, Sato Y, Nakanuma Y. Modulation of the microenvironment by senescent biliary epithelial cells may be involved in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2010; 53: 318-25
270. Shelton DN, Chang E, Whittier PS, Choi D, Funk WD. Microarray analysis of replicative senescence. *Curr Biol* 1999; 9: 939-45
271. Orjalo AV, Bhaumik D, Gengler BK, Scott GK, Campisi J. Cell surface-bound IL-1alpha is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 17031-36
272. Shevitz J, Jenkins CS, Hatcher VB. Fibronectin synthesis and degradation in human fibroblasts with aging. *Mech Ageing Dev* 1986; 35: 221-32
273. Zhou Q, Yang L, Qu M *et al.* Role of senescent fibroblasts on alkali-induced corneal neovascularization. *J Cell Physiol* 2012; 227: 1148-56
274. Sasaki M, Miyakoshi M, Sato Y, Nakanuma Y. Autophagy mediates the process of cellular senescence characterizing bile duct damages in primary biliary cirrhosis. *Lab Invest* 2010; 90: 835-43
275. Acosta JC, O'Loughlen A, Banito A *et al.* Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* 2008; 133: 1006-18

276. Bolitho C, Hahn MA, Baxter RC, Marsh DJ. The chemokine CXCL1 induces proliferation in epithelial ovarian cancer cells by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Endocr Relat Cancer* 2010; 17: 929-40
277. Fischer K, Lutz V, Wilhelm O *et al.* Urokinase induces proliferation of human ovarian cancer cells: characterization of structural elements required for growth factor function. *FEBS Lett* 1998; 438: 101-5
278. Said N, Socha MJ, Olearczyk JJ, Elmarakby AA, Imig JD, Motamed K. Normalization of the ovarian cancer microenvironment by SPARC. *Mol Cancer Res* 2007; 5: 1015-30
279. Zand L, Qiang F, Roskelley CD, Leung PC, Auersperg N. Differential effects of cellular fibronectin and plasma fibronectin on ovarian cancer cell adhesion, migration, and invasion. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2003; 39: 178-82
280. Furukawa S, Soeda S, Kiko Y *et al.* MCP-1 promotes invasion and adhesion of human ovarian cancer cells. *Anticancer Res* 2013; 33: 4785-90
281. Cheng JC, Auersperg N, Leung PC. TGF-beta induces serous borderline ovarian tumor cell invasion by activating EMT but triggers apoptosis in low-grade serous ovarian carcinoma cells. *PLoS One* 2012; 7: e42436
282. Murphy-Ullrich JE, Poczatek M. Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000; 11: 59-69
283. Wang Y, Yang J, Gao Y, Dong LJ, Liu S, Yao Z. Reciprocal regulation of 5alpha-dihydrotestosterone, interleukin-6 and interleukin-8 during proliferation of epithelial ovarian carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2007; 6: 864-71
284. Rabinovich A, Medina L, Piura B, Segal S, Huleihel M. Regulation of ovarian carcinoma SKOV-3 cell proliferation and secretion of MMPs by autocrine IL-6. *Anticancer Res* 2007; 27: 267-72
285. Witowski J, Ksiazek K., Jorres A. Glucose-induced mesothelial cell senescence and peritoneal neoangiogenesis and fibrosis. *Perit Dial Int* 2008; 28: S34-S37
286. Zhang W, Huang N, Wang Q, Yang ZJ, Li L. [Effect of CXCL1 gene expression on the biological function of epithelial ovarian carcinoma cells in vitro]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2013; 35: 109-13
287. Wang Y, Xu RC, Zhang XL *et al.* Interleukin-8 secretion by ovarian cancer cells increases anchorage-independent growth, proliferation, angiogenic potential, adhesion and invasion. *Cytokine* 2012; 59: 145-55
288. Wang Y, Li L, Guo X *et al.* Interleukin-6 signaling regulates anchorage-independent growth, proliferation, adhesion and invasion in human ovarian cancer cells. *Cytokine* 2012; 59: 228-36

289. Yousif NG. Fibronectin promotes migration and invasion of ovarian cancer cells through up-regulation of FAK-PI3K/Akt pathway. *Cell Biol Int* 2014; 38: 85-91
290. Obata NH, Tamakoshi K, Shibata K, Kikkawa F, Tomoda Y. Effects of interleukin-6 on in vitro cell attachment, migration and invasion of human ovarian carcinoma. *Anticancer Res* 1997; 17: 337-42
291. Kenny HA, Leonhardt P, Ladanyi A *et al.* Targeting the urokinase plasminogen activator receptor inhibits ovarian cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 459-71
292. Wu H, Han T, Lam JT *et al.* Preclinical evaluation of a class of infectivity-enhanced adenoviral vectors in ovarian cancer gene therapy. *Gene Ther* 2004; 11: 874-78
293. Hemminki A, Zinn KR, Liu B *et al.* In vivo molecular chemotherapy and noninvasive imaging with an infectivity-enhanced adenovirus. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 741-49
294. Friberg S, Mattson S. On the growth rates of human malignant tumors: implications for medical decision making. *J Surg Oncol* 1997; 65: 284-97
295. Studebaker AW, Storci G, Werbeck JL *et al.* Fibroblasts isolated from common sites of breast cancer metastasis enhance cancer cell growth rates and invasiveness in an interleukin-6-dependent manner. *Cancer Res* 2008; 68: 9087-95
296. Gerber SA, Rybalko VY, Bigelow CE *et al.* Preferential attachment of peritoneal tumor metastases to omental immune aggregates and possible role of a unique vascular microenvironment in metastatic survival and growth. *Am J Pathol* 2006; 169: 1739-52
297. Puiiffe ML, Le PC, Filali-Mouhim A *et al.* Characterization of ovarian cancer ascites on cell invasion, proliferation, spheroid formation, and gene expression in an in vitro model of epithelial ovarian cancer. *Neoplasia* 2007; 9: 820-829

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, iż jestem autorem pracy pt.: „**Wpływ procesu starzenia się ludzkiego mezotelium otrzewnowego na wykładniki progresji raka jajnika w modelu komórkowym i zwierzęcym**”. Praca ta została przeze mnie napisana samodzielnie (bez jakiegokolwiek udziału osób trzecich), przy wykorzystaniu wykazanej w pracy literatury przedmiotu i materiałów źródłowych, stanowi ona pracę oryginalną nie narusza praw autorskich oraz dóbr osobistych osób trzecich i jest wolna od jakichkolwiek zapożyczeń.

Oświadczam również, że wymieniona praca nie zawiera danych i informacji, które zostały uzyskane w sposób niedozwolony prawem oraz nie była dotychczas przedmiotem żadnej urzędowej procedury związanej z uzyskaniem tytułu doktora nauk medycznych, a złożona przeze mnie płyta CD zawiera elektroniczny zapis przedstawionej przeze mnie pracy.

Jednocześnie oświadczam, że nieodpłatnie udzielam Uniwersytetowi Medycznemu im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu licencji do korzystania z wyżej wymienionej pracy bez ograniczeń czasowych i terytorialnych w zakresie obrotu nośnikami, na których pracę utrwalono przez: wprowadzanie do obrotu, użyczenie lub najem egzemplarzy w postaci elektronicznej, a nadto upoważniam Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu do przechowywania i archiwizowania pracy w zakresie wprowadzania jej do pamięci komputera oraz do jej zwielokrotniania i udostępniania w formie elektronicznej oraz drukowanej.

Imię i nazwisko **Patrycja Sosińska**

Data, podpis.....

