

Mgr Małgorzata Łagiedo-Żelazowska

**Wpływ aktywnego biologicznie białka A związanego  
z surfaktantem płucnym (SP-A) na komórki raka płuca  
A549, Calu-3 oraz fibroblasty płucne CCD-39Lu**

**Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych**

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Jan Sikora

Promotor pomocniczy: Dr hab. n. med. Mariusz Kaczmarek

Katedra Patomorfologii i Immunologii Klinicznej

Zakład Immunologii



Wydział Lekarski I

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 2019





*Serdeczne podziękowania składam*

***Panu Prof. dr hab. n med. Janowi Sikorze***

*Za przekazaną wiedzę oraz wyrozumiałość w trakcie  
przygotowywania pracy doktorskiej*

***Panu Prof. dr hab. n. med. Grzegorzowi Dworackiemu***

*Za umożliwienie realizacji pracy naukowej*

***Panu dr hab. Mariuszowi Kaczmarkowi***

*Za nieocenioną pomoc na każdym etapie powstawania pracy  
doktorskiej*



*Kochanemu Mężowi*

*Rodzinie, Przyjaciółom oraz Koleżankom i Kolegom  
z Zakładu Immunologii*

*Za codzienną motywację do stworzenia niniejszej pracy*



## SPIS TREŚCI

|  |    |
|--|----|
| SPIS STOSOWANYCH SKRÓTÓW .....   | 11 |
| WSTĘP.....   | 15 |
| 1. Rak płuca.....  | 15 |
| 1.1. Epidemiologia.....  | 15 |
| 1.2. Charakterystyka choroby i jej postaci histopatologiczne.....            | 15 |
| 1.3. Podstawowe możliwości terapeutyczne.....                                | 17 |
| 1.4. Nowe terapie NDRP.....  | 17 |
| 1.4.1. Leczenie ukierunkowane molekularnie.....                              | 17 |
| 1.4.2. Immunoterapia.....  | 18 |
| 2. Nowotworowy wysięk opłucnowy.....   | 19 |
| 2.1. Charakterystyka ogólna.....   | 19 |
| 2.2. Aspekt immunologiczny.....  | 20 |
| 3. Receptory rozpoznające wzorce.....  | 21 |
| 3.1. Receptory Toll-podobne.....   | 21 |
| 3.1.1. Receptory TLR związane z rakiem płuca.....                            | 22 |
| 4. Ligandy dla receptorów rozpoznających wzorce.....                         | 24 |
| 4.1. Wzorce molekularne związane z zagrożeniem (PAMP).....                   | 25 |
| 4.2. Wzorce molekularne związane z uszkodzeniem (DAMP).....                  | 25 |
| 4.3. Ligandy dla receptorów rozpoznających wzorce w przebiegu raka płuc..... | 26 |
| 5. Wybrane geny zaangażowane w kancerogenezę.....                            | 27 |
| 5.1. Białka regulujące apoptozę – BAX i BCL2.....                            | 27 |
| 5.2. TTF-1.....  | 27 |
| 5.3. Cytokiny.....   | 28 |
| 6. Surfaktant.....   | 29 |
| 6.1. Funkcja i struktura surfaktantu płucnego.....                           | 29 |
| 6.2. Kolektyny.....  | 30 |
| 6.3. Białko A związane z surfaktantem płucnym.....                           | 30 |
| 6.3.1. Struktura SP-A.....   | 30 |
| 6.3.2. Warianty genetyczne białka SP-A.....                                  | 32 |
| 6.3.3. Receptory komórkowe dla białka SP-A.....                              | 32 |
| 6.3.3.1. Receptor C1q dla fagocytozy (C1qRp, CD93).....                      | 32 |

|                        |   |    |
|------------------------|---|----|
| 6.3.3.2.               | Regulatorowe białko sygnałowe SIRP $\alpha$ oraz kompleks<br>CD9-kalretikulina.....           | 33 |
| 6.3.3.3.               | Receptory TLR2 i TLR4.....  | 33 |
| 6.4.                   | Związek SP-A z rakiem płuca.....  | 34 |
| CELE PRACY.....        |   | 37 |
| MATERIAŁ I METODY..... |   | 39 |
| 1.                     | Aktywne biologicznie białko A związane z surfaktanetem płucnym (SP-A).....                    | 39 |
| 1.1.                   | Wysięki opłucnowe.....  | 39 |
| 1.2.                   | Oczyszczenie białka SP-A z wysięku opłucnego metodą<br>chromatografii powinowactwa.....       | 41 |
| 1.3.                   | Identyfikacja białka SP-A za pomocą techniki Western Blot.....                                | 46 |
| 1.4.                   | Próbka ostateczna otrzymanego SP-A.....   | 47 |
| 2.                     | Hodowle komórkowe.....  | 48 |
| 2.1.                   | Linia A549 (ATCC® CCL-185™).....  | 49 |
| 2.2.                   | Linia Calu-3 (ATCC® HTB-55™).....   | 50 |
| 2.3.                   | Linia CCD-39Lu (ATCC® CRL-1498™).....   | 51 |
| 2.4.                   | Hodowla komórek w obecności białka SP-A, ligandów oraz inhibitorów<br>dla receptorów TLR..... | 52 |
| 3.                     | Badania cytometryczne.....  | 53 |
| 3.1.                   | Analiza cyklu komórkowego z użyciem jodku propidyny.....                                      | 53 |
| 3.2.                   | Ocena ekspresji receptorów TLR2, TLR3 i TLR4 na liniach komórkowych.....                      | 54 |
| 4.                     | Badania molekularne.....  | 56 |
| 4.1.                   | Izolacja RNA z hodowli komórkowych.....   | 57 |
| 4.2.                   | Pomiar stężenia uzyskanego całkowitego RNA.....   | 57 |
| 4.3.                   | Amplifikacja cDNA z użyciem metody qRT-PCR.....   | 57 |
| 5.                     | Analiza statystyczna wyników.....   | 61 |
| WYNIKI.....            |   | 63 |
| 1.                     | Wpływ stężenia białka SP-A na cykl komórkowy.....   | 63 |
| 1.1.                   | Linia A549.....   | 63 |
| 1.2.                   | Linia Calu-3.....   | 67 |
| 1.3.                   | Linia CCD-39Lu.....   | 71 |
| 2.                     | Wpływ stężenia białka SP-A na ekspresję receptorów TLR.....                                   | 75 |
| 2.1.                   | Linia A549.....   | 75 |
| 2.2.                   | Linia Calu-3.....   | 78 |

|   |     |
|---|-----|
| 2.3. Linia CCD-39Lu.....                              | 81  |
| 3. Poziom transkryptu wybranych genów linii A549..... | 84  |
| 3.1. PBGD.....  | 84  |
| 3.2. TLR2.....  | 86  |
| 3.3. TLR3.....  | 88  |
| 3.4. TLR4.....  | 90  |
| 3.5. BAX.....   | 92  |
| 3.6. BCL-2.....                                       | 94  |
| 3.7. TTF-1.....                                       | 96  |
| 3.8. IL-6.....  | 98  |
| 3.9. INF- $\gamma$ .....                              | 100 |
| 3.10. TNF- $\alpha$ .....                             | 102 |
| DYSKUSJA.....   | 105 |
| WNIOSKI.....  | 109 |
| SPIS TABEL I RYCIN.....                               | 111 |
| PIŚMIENNICTWO.....                                    | 117 |
| STRESZCZENIE.....                                     | 127 |
| SUMMARY.....  | 129 |





## SPIS STOSOWANYCH SKRÓTÓW

|               |   |
|---------------|---|
| APC           | komórka prezentująca antygen (ang. <i>antigen presenting cell</i> )                               |
| BAL           | płukanie oskrzelikowo-pęcherzykowe (ang. <i>bronchoalveolar lavage</i> )                          |
| BAX           | białko X związane z Bcl-2 (ang. <i>bcl-2 associated X protein</i> )                               |
| BCL-2         | antygen chłoniaka z limfocytów B (ang. <i>B-cell lymphoma antigen 2</i> )                         |
| BCL-xL        | antygen chłoniaka z limfocytów B (ang. <i>B-cell lymphoma-extra large</i> )                       |
| cDNA          | komplementarny kwas deoksyrybonukleinowy (ang. <i>complementary deoxyribonucleic acid</i> )       |
| CRD           | domena bogata w cysteinę (ang. <i>cystein-rich domain</i> )                                       |
| CTLA-4        | antygen 4 cytotoksycznych limfocytów T (ang. <i>cytotoxic T lymphocyte-associated protein-4</i> ) |
| DAMP          | wzorce molekularne związane z zagrożeniem (ang. <i>danger-associated molecular patterns</i> )     |
| DRP           | drobnokomórkowy rak płuca   |
| EGFR          | receptor naskórkowego czynnika wzrostu (ang. <i>epidermal growth factor receptor</i> )            |
| HMGB1         | białko o dużej ruchliwości elektroforetycznej (ang. <i>high-mobility group protein 1</i> )        |
| HSP           | białko szoku cieplnego (ang. <i>heat-shock protein</i> )  |
| IFN- $\gamma$ | interferon gamma (ang. <i>interferon gamma</i> )  |

|               |   |
|---------------|---|
| IL            | interleukina (ang. <i>interleukin</i> )   |
| IL-1 $\beta$  | interleukina 1 beta (ang. <i>interleukin 1-beta</i> )   |
| IRAK          | kinaza związana z receptorem interleukiny-1 (ang. <i>interleukin-1 receptor- associated kinase</i> )              |
| LRR           | domeny bogate w reszty leucynowe (ang. <i>leucine rich repeats</i> )  |
| M-CSF         | czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów (ang. <i>macrophage colony stimulating factor</i> )              |
| MAPK          | kinazy białkowe aktywowane przez mitogeny (ang. <i>mitogen- activated protein kinases</i> )                       |
| MD-2          | mieloidalne białko różnicowania 2 (ang. <i>myeloid differentiation protein 2</i> )                                |
| MDA5          | białko typu 5 związane z różnicowaniem się czerniaka (ang. <i>melanoma differentiation-associated protein 5</i> ) |
| mRNA          | matrycowy RNA (ang. <i>messenger ribonucleic acid</i> )   |
| MyD88         | białko adaptorowe MyD88 (ang. <i>myeloid differentiation primary response gene 88</i> )                           |
| NDRP          | niedrobnokomórkowy rak płuca  |
| NF $\kappa$ B | czynnik transkrypcyjny $\kappa$ B (ang. <i>nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells</i> )     |
| NK            | komórki naturalni zabójcy (ang. <i>natural killer</i> )   |
| NLR           | receptory nod-podobne (ang. <i>nod-like receptors</i> )   |
| NOD           | domena oligomeryzacyjna wiążąca nukleotyd (ang. <i>nucleotide-binding oligomerization domain</i> )                |

|               |   |
|---------------|---|
| NSCLC         | niedrobnokomórkowy rak płuca (ang. <i>non small-cell lung carcinoma</i> )   |
| PAMP          | wzorce molekularne związane z patogenami (ang. <i>pathogen-associated molecular patterns</i> )  |
| PBGD          | deaminaza porfobilinogenu (ang. <i>porphobilinogen deaminase</i> )  |
| PD-1          | receptor programowanej śmierci 1 (ang. <i>programmed death-1</i> )  |
| PE            | fikoerytryna (ang. <i>phycoerythrin</i> )   |
| PRM           | cząsteczki rozpoznające wzorce (ang. <i>pattern recognition molecules</i> )   |
| PRR           | receptory rozpoznające wzorce (ang. <i>pattern recognition receptors</i> )  |
| qRT-PCR       | łańcuchowa reakcja polimerazy z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym (ang. <i>quantitative real time polymerase chain reaction</i> ) |
| RIG           | białko dla genu kodującego kwas retinowy (ang. <i>retinoic acid inducible gene</i> )  |
| RLRs          | receptory RIG-I-podobne (ang. <i>RIG-I-like receptors</i> )   |
| RNA           | kwas rybonukleinowy (ang. <i>ribonucleic acid</i> )   |
| SCLC          | drobnokomórkowy rak płuca (ang. <i>small-cell lung carcinoma</i> )  |
| SFTPA1        | gen kodujący białko SP-A  |
| SIRP $\alpha$ | białko sygnałowe alfa (ang. <i>signal regulatory protein <math>\alpha</math></i> )  |
| SP-A          | białko A związane z surfaktantem płucnym (ang. <i>surfactant-associated protein A</i> )   |
| TAM           | makrofagi związane z nowotworem (ang. <i>tumor associated macrophages</i> )   |
| TANK          | aktywator czynnika NF $\kappa$ B związany z TRAF (ang. <i>TRAF-associated NF<math>\kappa</math>B activator</i> )                              |

|               |  |
|---------------|--|
| TGF- $\beta$  | transformujący czynnik wzrostu beta (ang. <i>transforming growth factor beta</i> )   |
| TIR           | domena receptora Toll/IL-1 (ang. <i>toll/IL-1 receptor domain</i> )  |
| TIRAP         | białko adaptorowe zawierające domenę TIR (ang. <i>toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adapter protein</i> )                          |
| TLR           | receptory toll-podobne (ang. <i>toll-like receptors</i> )  |
| TNF- $\alpha$ | czynnik martwicy nowotworu $\alpha$ (ang. <i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> )   |
| TRAF          | czynnik związany z receptorem TNF (ang. <i>tumor necrosis factor receptor-associated factor</i> )  |
| TRAM          | cząsteczka adaptorowa zbliżona do TRIF (ang. <i>TRIF-related adapter molecule</i> )  |
| TRIF          | białko adaptorowe zawierające domenę TIR indukującą IFN- $\beta$ (ang. <i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-<math>\beta</math></i> ) |
| TTF-1         | tarczycowy czynnik transkrypcyjny typu 1 (ang. <i>thyroid transcription factor type 1</i> )  |
| VEGF          | czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (ang. <i>vascular endothelial growth factor</i> )  |
| WHO           | Światowa Organizacja Zdrowia (ang. <i>World Health Organization</i> )  |

## **WSTĘP**

### **1. Rak płuca**

#### **1.1. Epidemiologia**

Wśród wszystkich nowotworów, rak płuca odpowiada za największą liczbę zgonów pacjentów onkologicznych w krajach wysokorozwiniętych. W 2012 roku na całym świecie zdiagnozowano ok. 1,8 mln nowych przypadków raka płuc - stanowi to 12,9% wszystkich zachorowań na nowotwory złośliwe [1].

Rak płuca jest również najczęstszym nowotworem złośliwym w Polsce. Rocznie z jego powodu umiera ponad 20 tys. osób. Z danych Krajowego Rejestru Nowotworów za 2013 rok wynika, iż zachorowania na raka płuc stanowiły 14% ze wszystkich 156,5 tys. przypadków nowotworów złośliwych wśród polskich pacjentów. Co istotne, od kilku lat rak płuca jest również pierwszą przyczyną zgonów nowotworowych wśród kobiet, a także obserwuje się zwiększenie zachorowań u osób niepalących [2].

Według szacunków autorów raportu Polskiego Towarzystwa Onkologicznego pt. *"Obecny stan zwalczania nowotworów w Polsce"*, który ukazał się w maju 2014, za 10 lat liczba zgonów z powodu raka płuca może wynieść już ponad 30 tys. przypadków rocznie [3].

#### **1.2. Charakterystyka choroby i jej postaci histopatologiczne**

Rak płuca jest nowotworem pochodzącym z komórek nabłonkowych dróg oddechowych. Rozwija się najczęściej w dużych oskrzelach lub obwodowo (lokalizując się na obwodzie płuca, bliżej ściany klatki piersiowej), rozprzestrzenia się także poprzez miejscowe naciekanie anatomicznych struktur śródpiersia, przepony, opłucnej oraz ściany klatki piersiowej. Przerzuty raka płuca pojawiają się najczęściej w węzłach chłonnych umiejscowionych regionalnie, a w dalszej kolejności w drugim płucu, wątrobie, mózgu oraz szpiku kostnym [4].

W praktyce wyróżnia się dwa podstawowe podtypy histologiczne raka płuca. Pierwszy podtyp, który rozpoznawany jest w ok. 15% wszystkich przypadków nowotworów złośliwych płuc, to drobnokomórkowy rak płuca (*DRP*, ang. *small-cell lung carcinoma, SCLC*). Jest to nowotwór zbudowany z drobnych komórek o charakterystycznym wyglądzie jąder komórkowych [5]. Wyróżnia go bardzo agresywny przebieg kliniczny. Wykazuje silny związek z paleniem tytoniu - do jego rozwoju rzadko dochodzi u kogoś, kto nigdy nie palił i nie był narażony na bierne palenie [6]. Drugi podtyp to niedrobnokomórkowy rak płuca (*NDRP*, ang. *non small-cell lung carcinoma, NSCLC*) rozpoznawany w 4 na 5 przypadków raka płuca. NDRP ze względu na histogenezę jest dzielony na 3 typy:

Rak płaskonabłonkowy - jest to najczęściej centralnie zlokalizowany nowotwór wykazujący silny związek z wieloletnim paleniem tytoniu. Ten typ histologiczny jest spotykany u ok. 30% chorych na raka płuca w Polsce [7]. Jego rozwój jest zazwyczaj poprzedzony stanami przednowotworowymi, takimi jak dysplazja nabłonka oddechowego, czyli zmiana jego wyglądu i funkcji.

Rak gruczołowy - może występować u osób niepalących lub o niewielkiej ekspozycji na dym tytoniowy, częściej u kobiet, nierzadko u chorych w wieku 30-40 lat [8]. W Polsce stanowi ok. 30% rozpoznań mikroskopowych raka płuca a jego częstość rośnie najprawdopodobniej wskutek powszechnego stosowania filtrów w papierosach. Postać raka płuca najczęściej występująca obwodowo, charakteryzująca się w badaniu mikroskopowym tendencją do tworzenia struktur przypominających gruczoły oraz obecnością śluzu.

Rak wielkokomórkowy - nowotwór przypominający typem wzrostu dwa powyższe typy mikroskopowe, zbudowany z dużych komórek niewykazujących cech typowych dla raków płaskonabłonkowych ani raków gruczołowych. Stanowi ok. 5-10% rozpoznań mikroskopowych raka płuc i może być zlokalizowany zarówno centralnie, jak i obwodowo [9].

### **1.3. Podstawowe możliwości terapeutyczne**

Główną metodą leczenia pacjentów z NDRP w przypadku, „korzystnej” lokalizacji nowotworu i jego nierozprzestrzenieniu, jest leczenie chirurgiczne. Operacja polega na całkowitej resekcji guza, wraz z otaczającym mięszem płucnym. Zabiegiem wykonywanym w ramach chirurgii onkologicznej jest lobektomia, czyli usunięcie płata płuca, w którym zlokalizowany jest nowotwór. Radykalne leczenie chirurgiczne daje najlepsze wyniki, jednak możliwe jest do przeprowadzenia tylko u 15–20% chorych [10]. U pozostałych pacjentów, którzy nie kwalifikują się do leczenia operacyjnego (np. z uwagi na bardziej zaawansowane stadium nowotworu) stosuje się radioterapię. Cytostatyki stasowane są najczęściej jako uzupełnienie zabiegu operacyjnego lub radioterapii – rzadziej jako chemioterapia przedoperacyjna. W chemioterapii NDRP stosowane są leki należące do grupy pochodnych platyny: cisplatyna lub karboplatyna oraz alkaloidy barwinka różyczkowego: winblastyna i winorelbina. Obecnie w ramach chemioterapii stosuje się kilka leków podawanych łącznie (chemioterapia wielolekowa). Skuteczność schematów wielolekowych jest o wiele większa od terapii jednolekowej, jednak możliwość zastosowania takiej złożonej metody zależy od ogólnego stanu zdrowia pacjenta, kondycji i tolerancji dla danego schematu leczenia [11].

### **1.4. Nowe terapie NDRP**

Chemioterapia stosowana obecnie w leczeniu chorych na raka płuca osiągnęła lub zbliża się do pułapu swoich możliwości. Odkrycia mutacji genetycznych oraz immunologicznych punktów kontroli spowodowało szybki rozwój metod leczenia ukierunkowanego molekularnie i immunoterapii. Metody te, powoli zastępują chemioterapię u niektórych chorych i w niektórych liniach leczenia [12].

#### **1.4.1. Leczenie ukierunkowane molekularnie**

W ciągu ostatniej dekady, postęp w zakresie biologii molekularnej zmienił wiedzę na temat zaburzeń molekularnych w patogenezie raka płuca. Identyfikacja genetycznej specyfiki nowotworu i określenie celów molekularnych stanowi istotny krok w optymalizacji leczenia tego schorzenia.

Odkrycie roli mutacji w genie receptora naskórkowego czynnika wzrostu (*EGFR*) w komórkach nowotworowych jako czynnika predykcyjnego dla leczenia inhibitorami kinazy tyrozynowej, stanowiło przełom w podejściu do indywidualizacji leczenia niedrobnokomórkowego raka płuca. Zależność ta, pozwoliła na wyodrębnienie grupy chorych odnoszących rzeczywiste korzyści kliniczne z zastosowanego leczenia ukierunkowanego na receptory EGFR. Przyczyniła się również do badań nad kolejnymi generacjami molekularnie ukierunkowanych terapii, które stanowią dalszy krok w indywidualizacji postępowania terapeutycznego i prowadzą do poprawy wyników leczenia przy akceptowalnym profilu toksyczności. U pacjentów z obecnością mutacji aktywującej EGFR stosuje się inhibitory kinaz białkowych, głównie: gefitynib, erlotynib i afatynib [13].

#### **1.4.2. Immunoterapia**

Immunoterapia stanowi przełom w leczeniu onkologicznym, ponieważ wykorzystuje naturalny system obronny organizmu do walki z rakiem. Komórki nowotworowe mają wiele cech wspólnych ze zdrowymi komórkami, dlatego często układ odpornościowy nie może odróżnić komórek prawidłowych od atypowych [14]. Dane literaturowe wykazują, iż wydłużenie przeżycia chorego jest silnie związane z przeciwnowotworową odpowiedzią immunologiczną. Wyższa liczba limfocytów T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, komórek NK i/lub komórek dendrytycznych jest ściśle związana z lepszym rokowaniem pacjenta [15,16]. Nowe strategie immunoterapeutyczne raka płuca są głównie ukierunkowane na szlaki punktów kontrolnych. Jednym z przykładów jest blokada receptora CTLA-4. Receptor CTLA-4 to transmembranowe białko, odpowiadające za hamowanie funkcji limfocytów T. Działa przede wszystkim poprzez konkurowanie z cząsteczką kostymulatorową CD28 o wiązanie cząsteczek CD80 i CD86 na komórkach APC, blokując tym samym aktywujący limfocyty sygnał kostymulatorowy. CTLA-4 wykazuje większe powinowactwo do CD80/CD86 niż CD28, co umożliwia skuteczną supresję limfocytów. CTLA-4 ulega ekspresji na konwencjonalnych limfocytach T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> po stymulacji receptora TCR, zapobiegając zbyt silnej reakcji odpornościowej na wczesnych etapach aktywacji. Odpowiada także za supresyjne funkcje regulatorowych limfocytów T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>. Ważną rolę CTLA-4 w regulacji układu odpornościowego potwierdza silnie autoimmunizacyjny, letalny fenotyp myszy knock-out CTLA-4<sup>-/-</sup> [17]. Zgodnie z teorią, blokada receptora CTLA-4 przez przeciwciała monoklonalne powinna utrzymywać limfocyty T w stanie aktywacji i doprowadzić do amplifikacji odpowiedzi odpornościowej

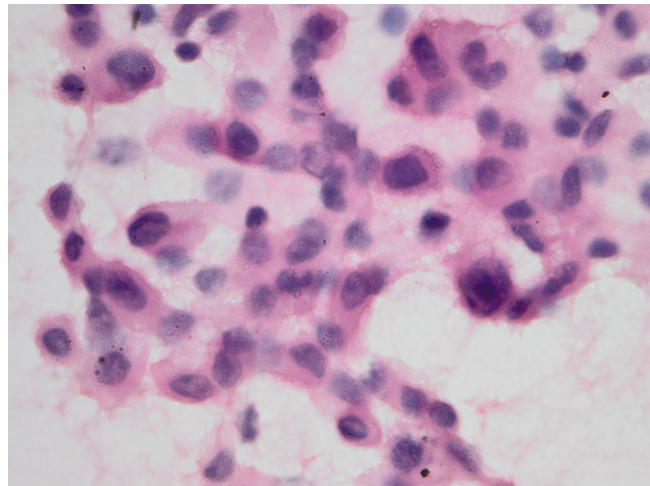


w organizmie. Tym samym wzmocnieniu powinna ulec odpowiedź przeciwnowotworowa, co stanowi podstawę klinicznego zastosowania przeciwciał monoklonalnych anti-CTLA-4 w immunoterapii nowotworów. Przykładowym przeciwciałem anti-CTLA-4 jest Ipilimumab, który w badaniach klinicznych, stosowany był u pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca w stopniu zaawansowania IIIb lub IV. Ipilimumab w skojarzeniu z chemioterapią znacząco wydłużał całkowite przeżycie chorych oraz czas wolny od progresji choroby [18]. Podobne wyniki naukowcy otrzymali stosując u chorych z gruczolakorakiem płuc Nivolumab, który jest przeciwciałem monoklonalnym przeciwko receptorowi PD-1 [19]. Podobnie jak w przypadku CTLA-4, podstawową rolą receptora PD-1 jest hamowanie funkcji limfocytów T na skutek związania jednego z ligandów na komórce APC, co doprowadza do spowolnienia metabolizmu komórki, tym samym pozbawiając limfocyty ich funkcji efektorowych [20]. Zahamowaniu ulega wytwarzanie takich cytokin jak IFN- $\gamma$ , IL-2 czy TNF- $\alpha$ , obniżeniu ulega ilość antyapoptotycznego białka Bcl-xL [21].

## **2. Nowotworowy wysięk opłucnowy**

### **2.1. Charakterystyka ogólna**

W fizjologicznych warunkach w jamie opłucnej znajduje się około 10 ml płynu opłucnowego [22]. Płyn ten wytwarzany jest jako przesącz z naczyń mikrokrażenia opłucnej ściennej zaopatrywanej w krew przez krążenie systemowe. Przepływ płynu pomiędzy przestrzenią wewnątrznaczyniową a jamą opłucnej zależy od różnicy ciśnienia hydrostatycznego i onkotycznego w tych przestrzeniach [23]. Nowotworowy wysięk opłucnowy jest powikłaniem, które występuje w 30% przypadków raka płuca, ale może pojawić się też w przypadku innych nowotworów, takich jak rak piersi czy chłoniaki. Nowotworowy wysięk opłucnowy może być pierwszą oznaką choroby lub pojawić się dopiero w stadium terminalnym, lecz zawsze wiąże się ze złym rokowaniem. Średni czas przeżycia chorego na raka płuca od momentu pojawienia się wysięku to około pół roku [24] (Ryc.1).



Rycina 1. Wysiłek opłucnowy z komórkami niedrobnokomórkowego raka płuca. (H+E x1000).

## 2.2. Aspekt immunologiczny

Pod względem cytologicznym wysięki możemy podzielić na bogatokomórkowe i skąpokomórkowe, a w zależności od rodzaju występujących w nich populacji na monomorficzne lub polimorficzne [25]. W fizjologicznym płynie opłucnowym zdecydowana większość komórek to makrofagi (ok. 3/4) oraz limfocyty (ok. 1/4), obecne są też komórki międzybłonna [26]. Natomiast w stanach patologicznych, w płynie znajdują się: makrofagi, monocyty, granulocyty obojętnochłonne, granulocyty kwasochłonne, limfocyty oraz komórki międzybłonna [27]. Obecność tak licznych i różnorodnych komórek układu immunologicznego sprawia, że w mikrośrodku wysięku zwiększa się wytwarzanie wielu mediatorów międzykomórkowych takich jak:  $TNF-\alpha$ ,  $TGF-\beta$ , VEGF,  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $IL-10$  czy  $IL-12p70$ . Ważną rolę w aktywacji ekspresji genów cytokin prozapalnych w tym mikrośrodku odgrywają komórkowe receptory rozpoznające wzorce. Wysiłek ze względu na płynne, pozbawione barier łącznotkankowych środowisko, stanowi dogodne miejsce do przeżycia, wzrostu i rozprzestrzeniania się komórek pochodzących z przerzutów nowotworu z ogniska pierwotnego [28].

### 3. Receptory rozpoznające wzorce

Na przełomie dwóch ostatnich dekad, wiele badań wykazało istnienie sieci receptorów rozpoznających wzorce (ang. *Pattern Recognition Receptors*, PRRs). Receptory te regulują wrodzoną odporność immunologiczną oraz determinują funkcje odporności immunologicznej nabytej [29]. PRRs wpływają również na utrzymanie homeostazy tkanek poprzez ich naprawę i regenerację [30]. Receptory rozpoznające wzorce można podzielić na trzy główne grupy: receptory rozpuszczalne (wydzielnicze), receptory powierzchniowe oraz receptory wewnątrzkomórkowe. Wydzielane receptory rozpoznające wzorce to najczęściej opsoniny, które przyłączając się do powierzchni drobnoustrojów wspomagają proces fagocytozy. Najlepiej poznanymi przykładami tych receptorów są kolektyny oraz pentraksyny [31]. Powierzchniowe receptory rozpoznające wzorce to głównie receptory makrofagów uczestniczące w fagocytozie: receptory zmiatacze (ang. *scavenger receptors*), receptory lektynowe oraz niektóre integryny [32]. Wewnątrzkomórkowe receptory rozpoznające wzorce występują w cytoplazmie oraz w połączeniu z błonami siateczki śródplazmatycznej. Ich funkcja to przede wszystkim wykrywanie zakażeń drobnoustrojami wewnątrzkomórkowymi. Do tej grupy należą receptory rozpoznające bakterie NOD-podobne (ang. *nod-like receptors*, NLRs), głównie cytozolowe białka NOD1 i NOD2, znane jako aktywatory kaspaz oraz czynnika transkrypcyjnego NFκB. Drugą ważną grupą wewnątrzkomórkowych receptorów rozpoznających wzorce tworzą receptory RIG-podobne (ang. *rig-like receptors*, RLRs) rozpoznające podwójną nić wirusowego RNA. Przedstawicielami RLRs są białka RIG-1 i MDA5 [33, 34]. Największą a zarazem najlepiej poznaną grupą receptorów rozpoznających wzorce są receptory TOLL-podobne (ang. *toll-like receptors*, TLRs), które mogą być zarówno receptorami powierzchniowymi jak i wewnątrzkomórkowymi [35].

#### 3.1. Receptory Toll-podobne

Po raz pierwszy receptory Toll zidentyfikowano u muszki owocowej (łac. *Drosophila melanogaster*). Nazwę „Toll” nadano zmutowanemu genowi, który koduje receptor uczestniczący w rozwoju embrionalnym owada. Kilkanaście lat później, immunolodzy Bruce A. Beutler oraz Jules A. Hoffmann odkryli na komórkach ssaków receptory o podobnej budowie i funkcjach, za co w 2011 roku zostali uhonorowani nagrodą Nobla [36]. Receptory Toll-podobne zalicza się do grupy glikoproteinowych receptorów transbłonowych o masie 90-115 kDa [37], posiadających części: zewnątrzkomórkową, transbłonową oraz cytoplazmatyczną. Część zewnątrzkomórkowa receptora zbudowana jest z domen bogatych

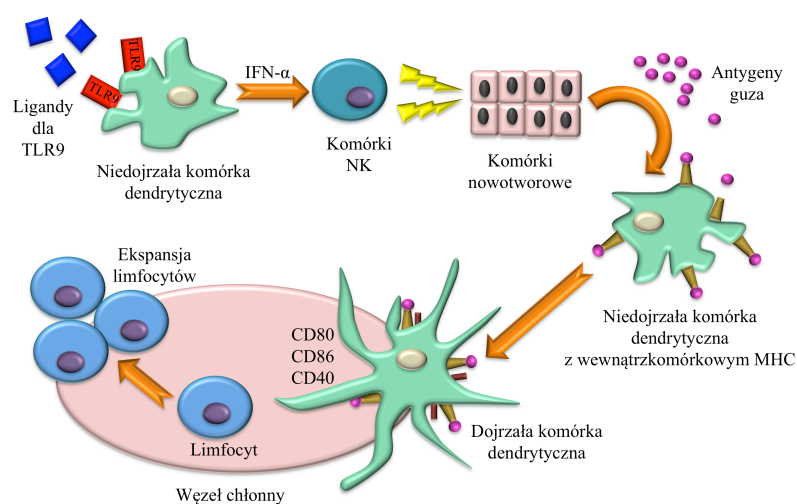
w reszty leucynowe (LRR), natomiast część cytoplazmatyczna zawiera domenę wykazującą wysoką homologię z receptorem IL-1R1, przez co nazwano ją domeną TIR (Toll-IL-1 receptor) [38]. Receptory TLR występują na powierzchni błony komórkowej (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10, TLR11), jednakże niektóre zakotwiczone są wewnątrz błony pęcherzyków cytoplazmatycznych (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) [39]. Pod względem strukturalnym receptory Toll-podobne mogą tworzyć homodimery (dwa identyczne receptory TLR) lub heterodimery (para różnych receptorów TLR) [40]. Ekspresja receptorów TLR wykazana została na powierzchni komórek dendrytycznych, komórek tucznych, makrofagów, limfocytów B, eozynofiliów, neutrofilów, a także na komórkach nabłonkowych, adipocytach, fibroblastach, komórkach śródbłonna naczyń, kardiomiocytach oraz keratynocytach [41]. Obecność receptorów TLR potwierdzono również na powierzchni komórek nowotworowych [42,43]. Połączenie liganda z receptorem TLR, zapoczątkowuje proces transdukcji sygnału w kierunku genów, w których promotorach znajdują się sekwencje pobudzone przez odpowiednie czynniki transkrypcyjne aktywujące proces ekspresji tych genów. W pierwszym etapie dochodzi do dimeryzacji receptora, następnie do domeny TIR przyłącza się jedno z czterech białek adaptorowych: MyD88, TIRAP/Mal, TRIF/TICAM lub TRAM/TICAM2. Rodzaj przyłączanego białka zależy od rodzaju receptora TLR, a także od rodzaju aktywacji czynników transkrypcyjnych szlaku MyD88-zależnego lub MyD88-niezależnego [44].

### **3.1.1. Receptory TLR związane z rakiem płuca**

Dostępne są wyniki obszernych badań na temat zależności pomiędzy receptorami Toll-podobnymi a rakiem płuca. Wykazano związek pomiędzy wysoką ekspresją mRNA TLR1-10 u pacjentów z NDRP a dłuższym czasem przeżycia chorych [45]. W porównaniu do tkanek kontrolnych, zaobserwowano wyższy sygnał immunohistochemiczny dla TLR3, -4, -7, -8 i -9 w komórkach raka płuca [46,47,48]. Badania *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowych NDRP (A549 i NCI-H1299) wykazały, iż ucieczka komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego, może odbywać się poprzez receptor TLR4, który aktywuje produkcję cytokin immunosupresyjnych [49]. Doniesienie to potwierdziły inne badania wykazujące, iż niski poziom rozpuszczalnej formy TLR4 (sTLR4) w surowicy chorych, jest złym markerem prognostycznym we wczesnej fazie NDRP [50]. Badania nad miRNA również wykazały związek receptorów TLR z rakiem płuca. TLR4 i TLR9 zwiększają ekspresję miR-21 oraz miR26a w komórkach nowotworowych [51, 52]. Jedno z niewielu badań nad TLR1 w raku płuca, wykazało, iż miR15a/16 hamuje TLR1, co prowadzi do

zahamowania rozwoju raka płuca [53]. Zhou i wsp. dowiedli, że brak TLR5 sprzyja wzrostowi komórek linii A549. Natomiast przy obecności TLR5, zastosowanie agonisty tego receptora CBLB502, prowadzi w modelu mysim do zahamowania wzrost komórek A549 [54]. Cherfils-Vicini i wsp. powiązali receptor TLR7 i TLR8 ze stanem zapalnym, rozwojem nowotworu oraz jego chemioopornością. Badacze Ci, wykazali wysoką ekspresją TLR7 i TLR8 w komórkach raka płuca oraz stwierdzili, że ligacja TLR7 z loxorybiną lub TLR8 z polyU aktywuje szlak NF- $\kappa$ B oraz zwiększa ekspresję genu kodującego przeciwapoptyczne białko Bcl-2 [55].

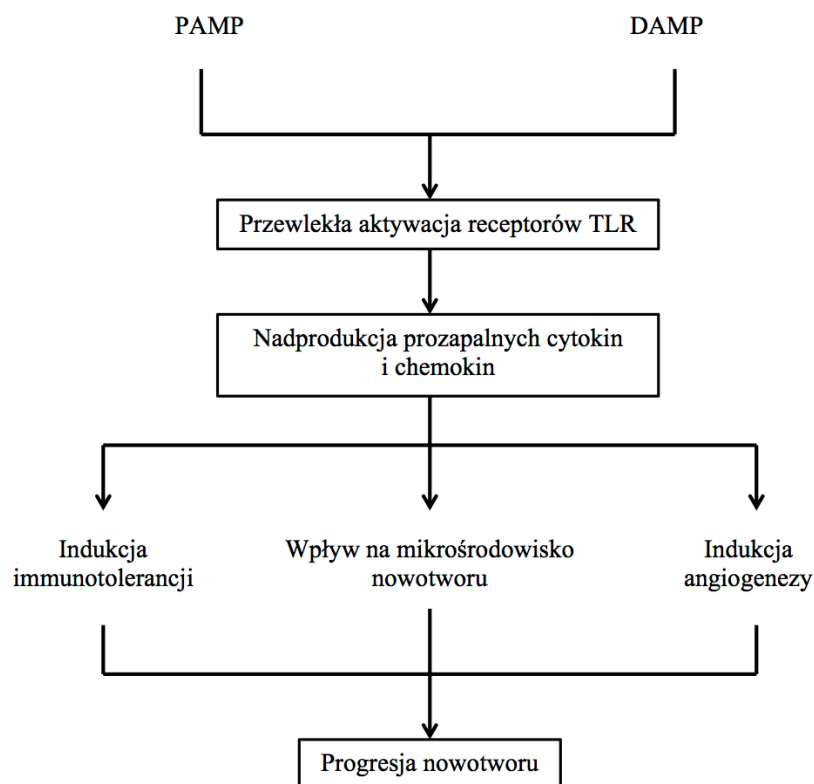
Najnowsze badania kliniczne, skupiają się na pobudzeniu układu odpornościowego chorych na raka płuca poprzez stymulację receptora TLR9. TLR9 ulega silnej ekspresji na ludzkich limfocytach B, monocytach oraz komórkach dendrytycznych a także w niskim stopniu na pneumocytach. Komórki dendrytyczne aktywowane poprzez agonistów dla TLR9, mogą wychwytywać i przetwarzać antygeny nowotworu w wyniku czego, zwiększa się ekspresja cząsteczek MHC oraz cząsteczek kostymulujących. W węzle chłonnym dochodzi do prezentacji antygeny limfocytom, które w krążeniu ogólnoustrojowym mogą szybko i sprawnie rozpoznawać komórki nowotworowe (Ryc.2) [56]. Obecnie prowadzone są próby kliniczne z zastosowaniem dwóch agonistów TLR9: IMO-2055 (faza II) oraz MGN1703 (faza I). Stwierdzono możliwą skuteczność agonistów TLR9 w leczeniu niedrobnokomórkowego raka płuca stosowanych samodzielnie lub w połączeniu z erlotynibem (inhibitor EGFR) i bewacizumabem (inhibitor VEGFA) [57, 58].



Rycina 2. TLR9 stymuluje układ immunologiczny do odpowiedzi przeciwnowotworowej.

#### 4. Ligandy dla receptorów rozpoznających wzorce

Wiązanie się ligandów z receptorami TLR odgrywa znaczącą rolę we wrodzonej oraz nabytej odporności immunologicznej organizmu a także w przebiegu infekcji lub uszkodzenia tkanek [59]. Ligandy receptorów Toll-podobnych można podzielić na egzogenne nazywane wzorcami molekularnymi związanymi z patogenami (ang. *Pathogen-associated molecular patterns* PAMPs) oraz na endogenne, nazywane wzorcami molekularnymi związanymi z uszkodzeniem (ang. *Damage-associated molecular patterns* DAMPs). W trakcie kancerogenezy i niekontrolowanej śmierci komórek, DAMP i PAMP mogą aktywować receptory TLR wywołując przewlekły stan zapalny. Ligacja receptorów Toll-podobnych wywołuje aktywację ekspresji szlaków sygnałowych NF- $\kappa$ B i MAPK. Wynikający z tego wzrost poziomu cytokin oraz chemokin ma istotną rolę w procesie progresji nowotworu (Ryc. 3) [60].



Rycina 3. Odpowiedź mikrośrodowiska nowotworu na ligację receptorów TLR

#### **4.1. Wzorce molekularne związane z zagrożeniem (PAMP)**

Receptory Toll podobne odgrywają bardzo ważną rolę w odpowiedzi odpornościowej organizmu zainfekowanego drobnoustrojami, poprzez rozpoznawanie ich struktur zwanych wzorcami molekularnymi związanymi z patogenami (PAMP). Wśród rozpoznawanych struktur molekularnych mikroorganizmów można wyróżnić: bakteryjne komponenty ściany komórkowej (lipopolisacharyd, peptydoglikan, kwasy lipotejchojowe, lipoproteiny), bakteryjne oraz wirusowe kwasy nukleinowe, komponenty ściany komórkowej grzybów ( $\beta$ -glukan) oraz inne wysoce konserwatywne białka. Rozpoznanie konkretnego PAMP skutkuje aktywacją czynników transkrypcyjnych oraz ekspresją genów kodujących mediatory reakcji zapalnej. Zwiększa się synteza  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1, IL-6 oraz innych czynników o działaniu chemotaktycznym, co w dużej mierze ogranicza szerzenie się powstałej infekcji [61].

#### **4.2. Wzorce molekularne związane z uszkodzeniem (DAMP)**

Elementy nieswoiste i swoiste układu odpornościowego mogą być aktywowane również przez endogenne sygnały pochodzące z uszkodzonych, nekrotycznych czy poddanych na działanie stresu komórek organizmu. Czynniki, które sygnalizują takie „niebezpieczeństwo” to alarminy, nazywane również wzorcami molekularnymi związanymi z zagrożeniem (ang. Danger-associated molecular patterns, DAMPs) [62]. Ligacja DAMP z receptorami TLR wymaga obecności dodatkowych cząsteczek. W zależności od ich rodzaju, możemy wyróżnić cztery grupy DAMP [63]. Pierwsza grupa wymaga do połączenia się z receptorem TLR cząsteczki CD14 oraz MD-2. Zalicza się do niej agonistów receptorów TLR2 i TLR4 jak np. HSP60, HSP70 czy biglikan, a także aktywatory TLR4 jak LDL czy białko S100 [64,65,66]. Druga grupa wymaga jako kocząsteczki wyłącznie CD14 – w ten sposób łączą białka A i D związane z surfaktantem płucnym oraz laktoferryna [67,68,69]. Trzecia grupa obejmuje DAMP, które w celu ich rozpoznania przez receptor angażują tylko MD-2. Przedstawicielem tej grupy jest HMGB1, aktywator TLR2 i TLR4 [70]. Do ostatniej grupy zalicza się wszystkie pozostałe DAMP, które do ligacji potrzebują cząsteczek innych niż CD14 i MD-2. Zadaniem wielu wzorców molekularnych związanych z uszkodzeniem jest pobudzenie układu odpornościowego w stanie rozwijającego się procesu chorobowego. Jednak pojawienie się ich w dużej ilości może spowodować przewlekłą aktywację receptorów TLR, czym przyczyniają się do powstania lokalnych ognisk zapalnych oraz mogą inicjować niektóre choroby [63].

### 4.3. Ligandy dla receptorów rozpoznających wzorce w przebiegu raka płuc

Najlepiej poznane DAMP oraz ich wpływ na rozwój NDRP zostały omówione w poniższej tabeli (Tab.1).

| DAMP                      | TLR           | Mechanizm  | Wpływ na NDRP  |
|---------------------------|---------------|--|--|
| HSP27<br>[71]             | TLR3          | Ligacja znacząco hamuje przekształcenie się monocytów w komórki dendrytyczne, indukuje natomiast polaryzację w kierunku makrofagów M2. Wzrost migracji oraz angiogenezy nowotworu (poprzez VEGF) | <b>Negatywny</b><br>Progresja nowotworu poprzez rozwój sieci naczyniowej guza        |
| HSP60<br>[72]             | TLR2          | Stymulacja TLR2 na ludzkich limfocytach T CD45RO+ oraz CD45RA+, skutkuje zwiększoną adhezją oraz redukcją chemotaksji (obniżenie ekspresji receptorów dla chemokin CXCR4 i CCR7)                 | <b>Negatywny</b><br>Progresja zależna od nieprawidłowego funkcjonowania limfocytów T |
| HSP70<br>[73]             | TLR2/<br>TLR4 | Indukcja cytolitycznej aktywności limfocytów T pomocniczych zależnej od uwalniania granzymu B)   | <b>Pozytywny</b><br>Cytoliza komórek nowotworowych                                   |
| HMGB1<br>[74]             | TLR4          | Stymulacja dojrzałych komórek dendrytycznych do prezentacji antygenów nowotworowych  | <b>Pozytywny</b><br>Immunostymulacja   |
| S100A8/<br>S100A9<br>[75] | TLR4          | Interakcja z TLR4 sprzyja rozwojowi ogólnoustrojowej reakcji autoimmunologicznej, która tworzy niszę pre-nowotworową w mikrośrodkowisku płuc   | <b>Negatywny</b><br>Rozwój nowotworu oraz skłonności do tworzenia się przerzutów     |

Tabela 1. Wybrane DAMPs oraz ich wpływ na rozwój NDRP



## 5. Wybrane geny zaangażowane w kancerogenezę

### 5.1. Białka regulujące apoptozę – BAX i BCL2

Apoptoza to genetycznie kontrolowana śmierć komórek. Proces ten może być wywołany przez zewnętrzne lub endogenne czynniki i jest uruchamiany autonomicznie przez organizm. Główną funkcją apoptozy jest utrzymanie homeostazy w organizmie poprzez umożliwienie eliminacji nieprawidłowych, uszkodzonych lub zainfekowanych komórek. Gdy dochodzi do nieprawidłowej apoptozy, może zainicjować się tworzenie komórek nowotworowych [76]. Proces apoptozy można podzielić na cztery etapy: faza sygnałów wstępnych, faza kontrolno-decyzyjna, faza wykonawcza i faza uprzątnia. Na początku, na powierzchni komórki pojawiają się wypukłości, powodując utratę kontaktu komórki z otaczającymi innymi komórkami i macierzą zewnątrzkomórkową. Następnie komórka kurczy się, a DNA ulega fragmentacji. Powstają ciała apoptotyczne z organellami komórkowymi, które następnie są fagocytowane przez makrofagi [77]. Po wchłonięciu komórki, cytotoksyczność makrofagów zmniejsza się i wydzielają one mediatory ułatwiające wzrost komórek rakowych [78]. Apoptoza regulowana jest przez sieć białek regulatorowych. Istnieją dwie grupy cząsteczek, które charakteryzują się działaniem proapoptotycznym oraz antyapoptotycznym. Najsilniejszym inhibitorem apoptozy jest BCL-2. BCL-2 jest głównym białkiem hamującym apoptozę na szlaku receptora Fas. Jego nadekspresja jest odpowiedzialna za oporność guzów na radioterapię i chemioterapię. BCL-2 może również działać jako protoonkogen promujący rozwój komórek rakowych [79]. Białko BAX przyspiesza apoptozę, poprzez tworzenie porów w błonie zewnętrznej mitochondrium, przez co zwiększa jej przepuszczalność. Ekspresja genu BAX jest regulowana przez białko p53.

### 5.2. TTF-1

Tarczycowy czynnik transkrypcyjny typu 1 jest regulacyjnym czynnikiem transkrypcji dla specyficznych tkankowo genów, np. TG (gen tyroglobuliny) czy TPO (gen peroksydazy tarczycowej). Ulega ekspresji głównie w komórkach nabłonkowych płuc i tarczycy. Wykazano przydatność oznaczania obecności TTF-1 do odróżnienia pierwotnego gruczolaka płuca od innych nowotworów, które dały przerzuty do płuca [80]. Ekspresje TTF-1 częściej stwierdza się w drobnokomórkowym raku płuc i gruczolaku niż w raku płaskonabłonkowym [81]. Dokładna rola TTF-1 w kancerogenezie płuc pozostaje

niewyjaśniona. Uważa się, że TTF-1 może promować rozwój nowotworu poprzez regulację szybkości i aktywności proliferujących komórek.

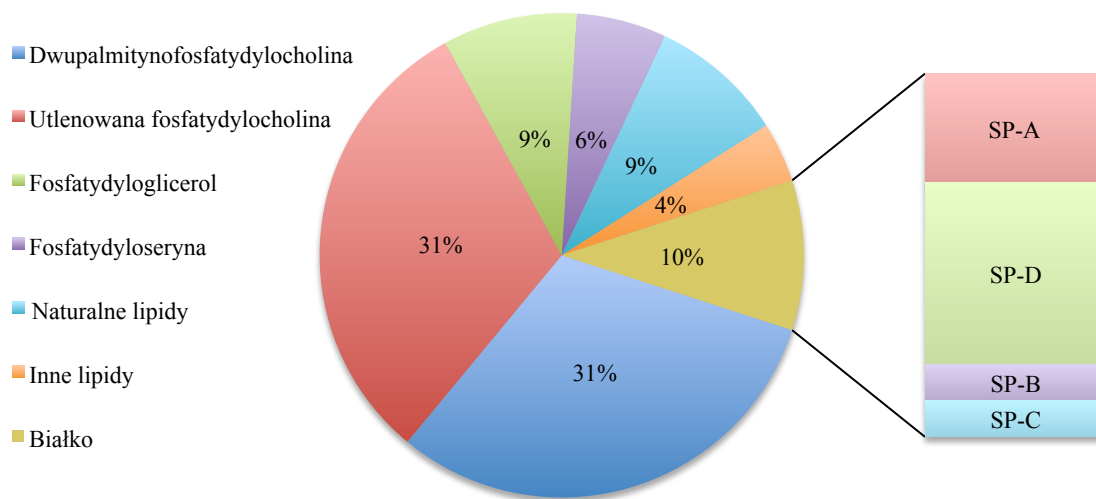
### 5.3. Cytokiny

Cytokiny są białkami, które odgrywają rolę mediatorów w komunikacji międzykomórkowej. Ich głównym zadaniem jest regulacja homeostazy układu odpornościowego. Cytokiny są również odpowiedzialne za indukcję odpowiedzi immunologicznej przeciwko nowotworom. Jedną z najważniejszych cytokin jest interleukina-6. Stymuluje ona wzrost komórek oraz produkcję białek ostrej fazy [30]. Ponadto Interleukina-6 może być autokrynnym lub parakrynnym czynnikiem wzrostu dla komórek wielu linii nowotworów. IL-6 wpływa również na ekspresję białek regulujących apoptozę, głównie zwiększając ekspresję białek z rodziny BCL-2. Cytokina ta stymuluje również angiogenezę oraz jest niezbędnym czynnikiem w tworzeniu się nowotworowych wysięków do opłucnej. Bardzo istotną cytokiną jest również czynnik martwicy nowotworów: TNF- $\alpha$ . Działanie TNF- $\alpha$  na poziomie komórkowym sprowadza się do indukowania syntezy cytokin, zwłaszcza interferonu gamma, IL-1, IL-6. Kolejną rolą TNF- $\alpha$  w organizmie jest aktywowanie cytotoksycznych funkcji monocytów i makrofagów, a także stymulowanie uwalniania neutrofilów ze szpiku oraz stymulowania ich właściwości cytotoksycznych i bakteriobójczych. Niezwykle istotną funkcją TNF- $\alpha$  jest aktywność przeciwnowotworowa. Wykazano, że ludzki czynnik martwicy nowotworu indukuje immunologiczną odpowiedź przeciwko komórkom nowotworowym, a także wykazuje bezpośrednie działanie cytotoksyczne. Jednocześnie czynnik martwicy nowotworów może indukować przerzutowanie komórek rakowych. Takie przeciwstawne działanie TNF- $\alpha$  związane jest ze stężeniem tej cytokiny w mikrośrodowisku guza. Niskie stężenia TNF- $\alpha$  sprzyjają powstawaniu przerzutów, zaś wyższe prowadzą do apoptozy i śmierci komórek nowotworowych [82].

## 6. Surfaktant

### 6.1. Funkcja i struktura surfaktantu płucnego

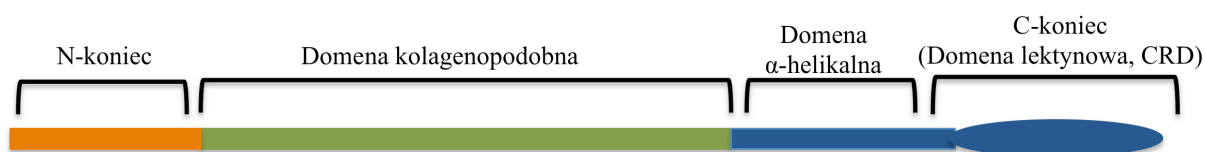
Jednym z DAMP, które wydaje się mieć niezwykle istotny wpływ na rozwój i przebieg niedrobnokomórkowego raka płuca jest białko SP-A. Surfaktant płucny, to endogenna substancja, której główną funkcją jest obniżanie napięcia powierzchniowego i stabilizacja drzewa oskrzelowego. Surfaktant składa się w około 90% z lipidów i 10% białek (około 1/2 to białka specyficzne dla surfaktantu, pozostała 1/2 to zanieczyszczone białka osocza lub inne). Podstawowe klasy fosfolipidów obecnych w surfaktancie endogennym to: dwupalmitynofosfatydylocholina (DPPC), utlenowana fosfatydylocholina (PC), fosfatydyloglicerol i fosfatydyloetanolamina. Specyficzne białka surfaktantu to: SP-A, SP-B, SP-C i SP-D (ryc.4). Białka SP-A i SP-D to duże białka hydrofilowe natomiast SP-B i SP-C to białka małe, silnie hydrofobowe. Białka surfaktantu A oraz D należą do rodziny kolektyn [83].



Rycina 4. Procentowy udział składników tworzących strukturę surfaktantu płucnego

## 6.2. Kolektyny

Kolektyny zalicza się do cząsteczek rozpoznających wzorce molekularne (PRM). Dotychczas najlepiej poznanymi kolektynami są białka wiążące mannozę (MBL), składnik C1q dopełniacza oraz białka surfaktantu A i D. Struktura kolektyn obejmuje cztery regiony (Ryc.5). Region N-końcowy, zawierający mostki dwusiarczkowe, pozwala na przekształcanie monomerów w oligomery wyższych rzędów (dimery, trimery, tetrametry). Domena kolagenopodobna, którą charakteryzuje powtarzalna sekwencja Gly-Xaa-Yaa, zdolna jest do trimeryzacji. Krótka, zwojowa domena  $\alpha$ -helikalna (szyjka), inicjuje trimeryzację. Region C-końcowy to domena lektynowa, określana również jako zależna od wapnia domena rozpoznająca węglowodany CRD (ang. *Carbohydrate recognition domain*). Domeny CRD mogą wiązać się z różnymi węglowodanami znajdującymi się na powierzchni np. bakterii. Interakcja ta prowadzić może do aglutynacji bezpośredniej, opsonizacji, fagocytozy lub aktywacji układu dopełniacza na drodze lektynowej [84].



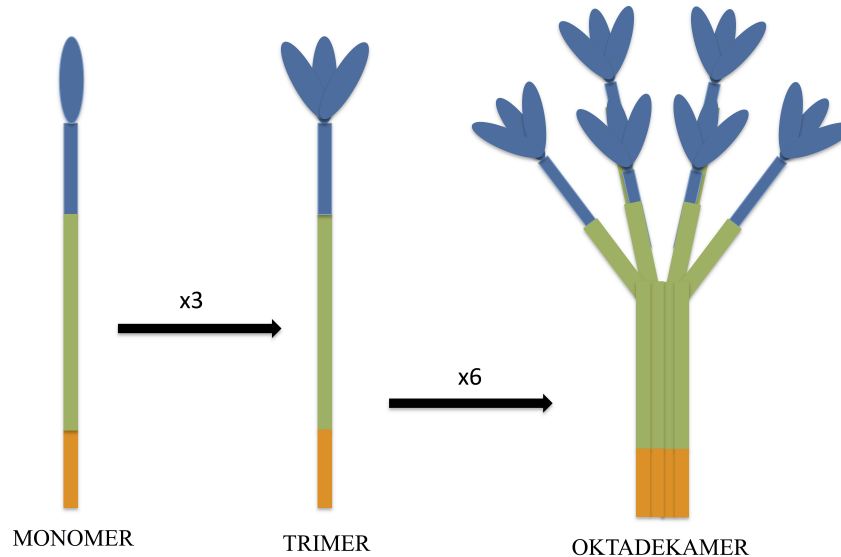
Rycina 5. Struktura kolektyny (monomer)

## 6.3. Białko A związane z surfaktantem płucnym

### 6.3.1. Struktura SP-A

SP-A jest dużym, oligomerycznym białkiem o masie około 650 kDa. Składa się z 18 strukturalnie identycznych podjednostek. Postać monomeryczna ma długość około 228 aminokwasów, przybliżoną masę cząsteczkową wynoszącą 28 000 Da i strukturę kolektyny. Kilka modyfikacji potranslacyjnych, w tym glikozylacja, sulfonilacja i hydroksylacja proliny, daje monomeryczne białko o heterogennej masie cząsteczkowej w zakresie od 30 do 40 kDa. Funkcjonalna postać SP-A jest osiągnięta poprzez łączenie się domen kolagenopodobnych

w złożoną strukturę oktadekameryczną, która wizualnie przypomina „bukiet kwiatów”, w którym N-koniec i domena kolagenopodobną tworzą wspólnie łodygę [85] (Ryc.6).



Rycina 6. Struktura białka SP-A

Prawie wszystkie cząsteczki SP-A są połączone z fosfolipidami. CRD i domena  $\alpha$ -helikalna są ważnymi domenami białkowymi zaangażowanymi w oddziaływanie SP-A z lipidami. SP-A wybiórczo oddziałuje z dwupalmitynofosfatydylocholiną (DPPC), głównym lipidem surfaktantu płucnego. Interakcja DPPC z SP-A prowadzi do zmiany konformacji cząsteczki białka, która skutkuje znaczącą ochroną SP-A przed degradującym wpływem tripsyny. Oddziaływanie SP-A z pęcherzykami fosfolipidowymi indukuje agregację pęcherzyków w obecności  $\text{Ca}^{2+}$  lub  $\text{H}^+$ . SP-A indukuje również agregację liposomów zawierających SP-B lub SP-C. Związek SP-A z lipidami wydaje się być niezbędny do konwersji agregatów lipidowych z postaci wielowarstwowych, obecnych w pęcherzyku egzocytarnym, do zdyspergowanych uporządkowanych układów znanych jako mielina tubularna. Ta fizyczna transformacja wymaga również hydrofobowego białka powierzchniowo czynnego SP-B oraz  $\text{Ca}^{2+}$ . SP-A w połączeniu z SP-B zwiększa adsorpcję lipidów wzdłuż granicy powietrze-ciecz [86].

### **6.3.2. Warianty genetyczne białka SP-A**

Istnieją dwa funkcjonalne geny białka SP-A: *sftpa1* i *sftpa2*, które kodują odpowiednio białko SP-A1 i SP-A2. Choć ludzkie SP-A1 i SP-A2 mają 96% stopień podobieństwa na poziomie białka, geny te są regulowane w różnych mechanizmach [87] i mają niewielką różnicę w swoich funkcjach [88]. SP-A2 wykazuje wyższy poziom aktywności niż SP-A1 pod względem zdolności do indukcji produkcji cytokin prozapalnych, najprawdopodobniej ze względu na większą stabilność tego białka [89,90]. Istnieje wiele wariantów polimorficznych SP-A. Najpopularniejszy, polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP), który charakteryzuje allel 6A4 białka SP-A1, stwierdzono z wysoką częstością w idiopatycznym włóknieniu płuc [91]. Płyn z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BAL) od ludzi heterozygotycznych pod względem mutacji missense w *sftpa2*, która zmienia guaninę w pozycji 231 na walinę (G231V) zawiera więcej transformującego czynnika wzrostu TGF- $\beta$ 1 niż próbki kontrolne. Stwierdzono, iż ekspresja zmutowanego SP-A2 w komórkach nabłonka płucnego prowadzi do wydzielania dodatkowych ilości TGF- $\beta$ 1, zdolnego do autokrynej i parakrynej sygnalizacji [92].

### **6.3.3. Receptory komórkowe dla białka SP-A**

Poszukiwanie receptorów dla SP-A jest przedmiotem badań od przeszło dwóch dekad. Białka surfaktantu są "lepkie" i silnie wiążą lipidy oraz ligandy białkowe, dlatego też istnieje wiele różnych receptorów dla tych struktur (Ryc.7).

#### **6.3.3.1. Receptor C1q dla fagocytozy (C1qRp, CD93)**

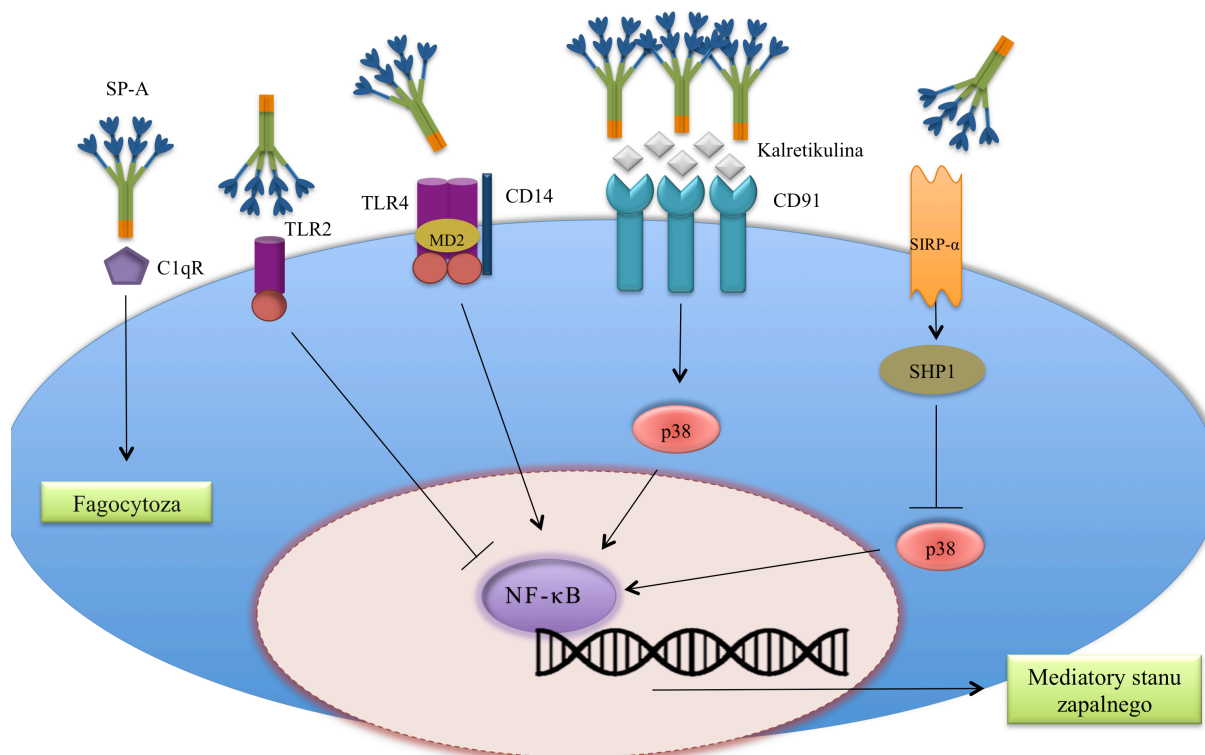
Glikoproteina o masie 126 kDa określona jako C1qRp (CD93), odgrywa ważną rolę w usuwaniu patogenów i kompleksów immunologicznych za pośrednictwem C1q/MBL/SP-A poprzez fagocytozę [93].

### **6.3.3.2. Regulatorowe białko sygnałowe SIRP $\alpha$ oraz kompleks CD91-kalretikulina**

SP-A moduluje funkcje komórkowe poprzez białko SIRP $\alpha$ , a także kompleks CD91-kalretikulina. SP-A różnicowo angażuje albo CD91-kalretikulinę albo SIRP $\alpha$ , w zależności od tego, czy domena lektynowa SP-A jest związana. Na przykład, w nieobecności patogenu, SP-A wiąże się przez swoją domenę lektynową z SIRP $\alpha$ . Natomiast w obecności obcego organizmu lub szczątków komórkowych, do których wiąże się domena lektynowa SP-A, wolny region kolagenopodobny aktywuje układ immunologiczny poprzez kalretikulinę-CD91. Co ważne, zaangażowanie różnych receptorów wywołuje różne reakcje. Kiedy SP-A wiąże się z SIRP $\alpha$ , hamowana jest aktywacja szlaku NF- $\kappa$ B. Natomiast kiedy receptorem jest kompleks CD91-kalretikulina, następuje aktywacja jądrowego czynnika transkrypcyjnego beta [94].

### **6.3.3.3. Receptory TLR2 i TLR4**

Aktywacja receptorów TLR powoduje kaskadę reakcji immunologicznych, których kulminacją jest wytwarzanie cytokin takich jak TNF czy interleukiny. Guillot i wsp. zaobserwowali aktywację TLR4 poprzez dodanie SP-A. Ich badania opierały się na analizie komórek jajnika chomika chińskiego – zarówno z obecnością TLR4 jak i przy jego braku. W komórkach z obecnym TLR4, po dodaniu SP-A następowała aktywacja jądrowego czynnika transkrypcyjnego beta (NF- $\kappa$ B). Takiej odpowiedzi nie uzyskiwano u chomików bez TLR4 [67]. Podobne wnioski dotyczące ligacji SP-A z TLR4 uzyskali badacze pod kierownictwem Yamada. Wykazali oni, że SP-A oddziałuje bezpośrednio z TLR4 i MD-2. SP-A wiąże się z rozpuszczalną formą zewnątrzkomórkowej domeny TLR4 (sTLR4) i MD-2 na drodze zależnej od Ca<sup>2+</sup> [95]. Połączenie SP-A do TLR2 działa odwrotnie. Murakami i wsp. potwierdzili ligację SP-A do TLR2, jednakże ligacja ta osłabia sekrecję cytokin [96].



Rycina 7. Receptory komórkowe dla białka SP-A

#### 6.4. Związek SP-A z rakiem płuca

Dostępna światowa literatura dostarcza niewielką ilość informacji na temat związku białka A związanego z surfaktantem płucnym a rakiem płuca. Bejarano i wsp. przeprowadzili badania immunohistochemiczne i wykazali obecność białka SP-A w około 50% tkanek NDRP. Badania te, dają podstawę do zakwalifikowania SP-A jako specyficznego markera nowotworów wywodzących się z pneumocytów typu II [97]. Doumanov i wsp. wykazali, iż komórki linii raka płuca A549 wydzielają SP-A, a ilość w jakiej białko to jest wydzielane zależy od IL-6 [98]. Tsutsumida i wsp. dowiedli, że pacjenci z gruczolakorakiem płuc wykazującym stosunkowo wysoką ekspresję mucyny (MUC-1) a przy tym z niską ekspresją SP-A, mieli gorsze rokowanie oraz krótszy całkowity czas przeżycia [99].



Najbardziej interesująca kwestia odnośnie białka SP-A i NDRP, polega na jego wpływie na makrofagi opłucnowe w mikrośrodowisku nowotworu (TAM). Mitsuhashi i wsp. przedstawili wyniki swoich badań, wskazujące na białko SP-A jako czynnik hamujący progresję raka płuca poprzez regulację polaryzacji makrofagów z profilu M2 do profilu M1. Rola SP-A polegała na zwiększaniu ilości makrofagów M1 (w mechanizmie nieznanym), które wydzielają cytokiny takie jak: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CCL2 czy CCL5, skutkując aktywacją komórek NK. Aktywowane komórki NK produkują perforyny oraz granzym B, czego rezultatem jest niszczenie komórek nowotworowych w mechanizmie komórkowym. Podkreślić trzeba jednak, iż SP-A nie wpływa bezpośrednio na komórki NK [100]. Związek białka SP-A z makrofagami opłucnowymi potwierdziły również badania innego zespołu naukowców, którzy wykazali korelacje pomiędzy wysokim stężeniem SP-A w wysiękach opłucnowych w przebiegu raka płuca a niskimi wartościami czynnika stymulującego tworzenie się kolonii makrofagów (M-CSF). Zależność ta, może wskazywać na rolę białka SP-A jako czynnika zakłócającego prawidłowy rozwój i formację makrofagów a tym samym zaburzającego prawidłową odpowiedź immunologiczną podczas choroby nowotworowej [101].

W aspekcie molekularnym, delecja genów SP-A w komórkach nabłonka oskrzelowego w przebiegu NDRP, związana jest z progresją nowotworu. Delecje te, mogą być użytecznymi biomarkerami identyfikującymi pacjentów o złym rokowaniu [102].



## **CELE PRACY**

Celem pracy była ocena wpływu białka SP-A na komórki nowotworowe raka płuca.

Cel ten realizowano przez:

1. Określenie czy i jak białko SP-A wpływa na cykl komórkowy komórek ustalonych linii ludzkiego raka płuca A549 i Calu-3 oraz ustalonej linii ludzkich immortalizowanych fibroblastów płucnych CCD-39Lu.
2. Zbadanie czy istnieje zależność pomiędzy stężeniem białka SP-A a ekspresją receptorów TLR4 na komórkach ustalonych linii ludzkiego raka płuca A549 i Calu-3 oraz ustalonej linii ludzkich immortalizowanych fibroblastów płucnych CCD-39Lu.
3. Ocenę ekspresji wybranych genów kodujących białka związane z apoptozą, stanem zapalnym oraz progresją nowotworu w komórkach ustalonej linii ludzkiego raka płuca A549 poddanych stymulacji białkiem SP-A.



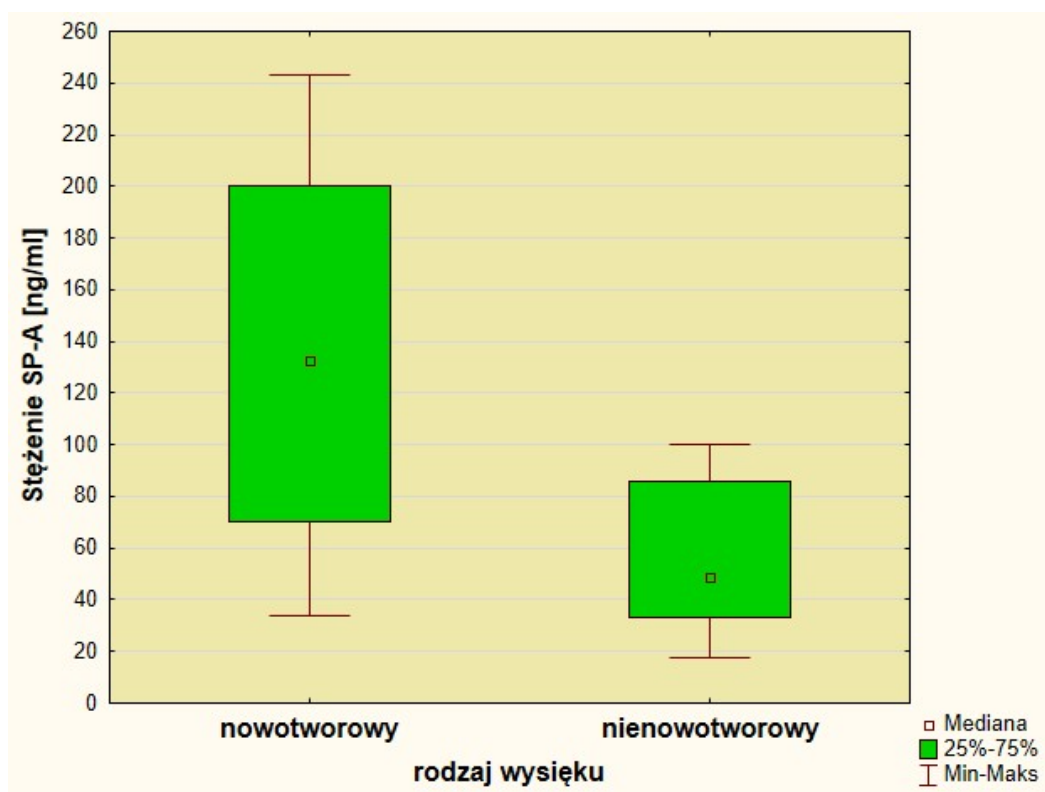
## MATERIAŁ I METODY

### 1. Aktywne biologicznie białko A związane z surfaktanetem płucnym (SP-A)

W celu uzyskania aktywnego biologicznie białka związanego z surfaktanetem płucnym (SP-A), zastosowano procedurę opisaną w publikacji pt. „*Purification of Native Surfactant Protein SP-A from Pooled Amniotic Fluid and Bronchoalveolar Lavage*”, Mihaela Gadjeva (ed.), *The Complement System: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 1100, DOI 10.1007/978-1-62703-724-2\_21, © Springer Science+Business Media New York 2014.

#### 1.1. Wysięki opłucnowe

Wysięki opłucnowe pobrane zostały drogą torakocentezy od 34 pacjentów z Kliniki Pulmonologii, Alergologii i Onkologii Pulmonologicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu oraz Wielkopolskiego Centrum Pulmonologii i Torakochirurgii w Poznaniu. Żaden z pacjentów z nowotworowym wysiękiem opłucnowym nie był poddany terapii przeciwnowotworowej. Bazując na wynikach pracy magisterskiej wykonanej na tych samych wysiękach opłucnowych, najwyższe stężenia białka SP-A stwierdzono w wysiękach opłucnowych od pacjentów z gruczolakorakiem płuca (Ryc.8). Płyny te wybrano, przefiltrowano przez podwójną warstwę sterylnej chirurgicznej gazy a następnie w 50-ml probówkach (BDFalcon™; BD Biosciences) odwirowano przy 300g przez 10 minut, w temperaturze pokojowej. Uzyskane nadsącze w łącznej objętości 1080 ml, zamrożono i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu wykonania planowanych badań



Rycina 8. Stężenie SP-A w wysiękach o różnej etiologii (na podstawie wyników pracy magisterskiej Małgorzaty Łagiedo)

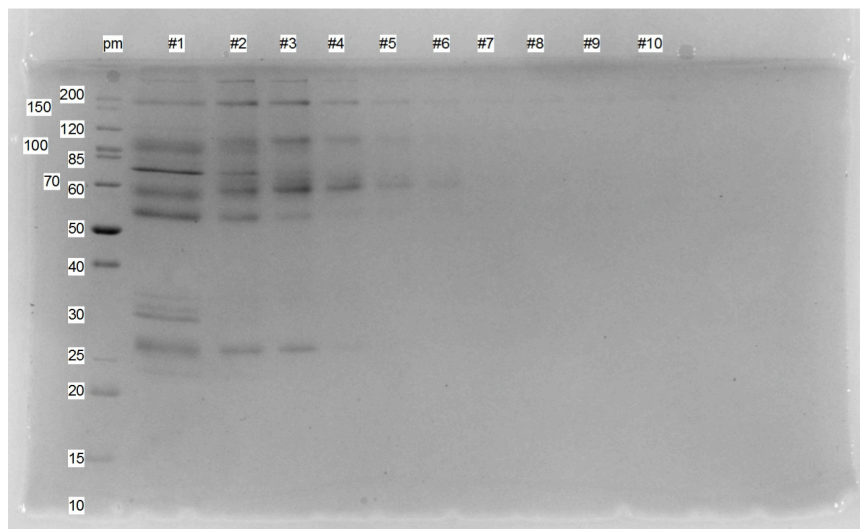
## 1.2. Oczyszczenie białka SP-A z wysięku opłucnego metodą chromatografii powinowactwa

Oczyszczanie białka SP-A przeprowadziła firma Pure Biologics sp. z o.o. z siedzibą we Wrocławiu.

Oczyszczanie zostało przeprowadzone w siedmiu etapach.

Oczyszczanie - etap 01:

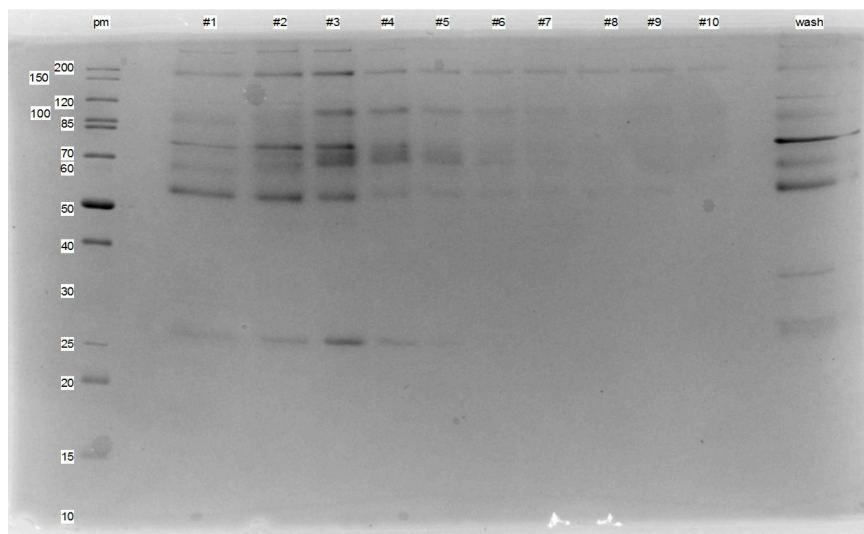
Wysięk opłuczny rozmrożono. Dodano 1M CaCl<sub>2</sub> w takiej objętości, aby jego końcowe stężenie wyniosło 10mM. Przepuszczono 600ml wysięku przez 1 ml złoża mannozowo-agarozowego (wg. Literatury SP-A ma wyższe powinowactwo do mannozy niż do maltozy). Kolumnę przepłukano buforem do przemywania: 20mM Tris pH 7.5, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 1M NaCl. Związane białko z kolumną wymywano przy pomocy buforu do elucji: 20mM Tris pH 7.5, 10mM EDTA. Zebrane frakcje analizowano przy pomocy SDS-PAGE (Ryc.9).



Rycina 9. Analiza SDS-PAGE frakcji uzyskanych po oczyszczaniu nr 1 pm - marker mas, #1-#10 zebrane frakcje po elucji. Widoczne są prążki o masie około 27kDa i 30kDa we frakcjach 1-3, co odpowiada masie SP-A.

## Oczyszczanie - etap 02:

Pozostałe 480ml wysięku przepuszczono przez 1ml świeżego złoża mannozowo-agarozowego. Kolumnę przepłukano buforem do przemywania: 20mM Tris pH 7.5, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 1M NaCl. Związane białko z kolumną wmywano przy pomocy buforu do elucji: 20mM Tris pH 7.5, 10mM EDTA. Zebrane frakcje analizowano przy pomocy SDS-PAGE (Ryc.10).

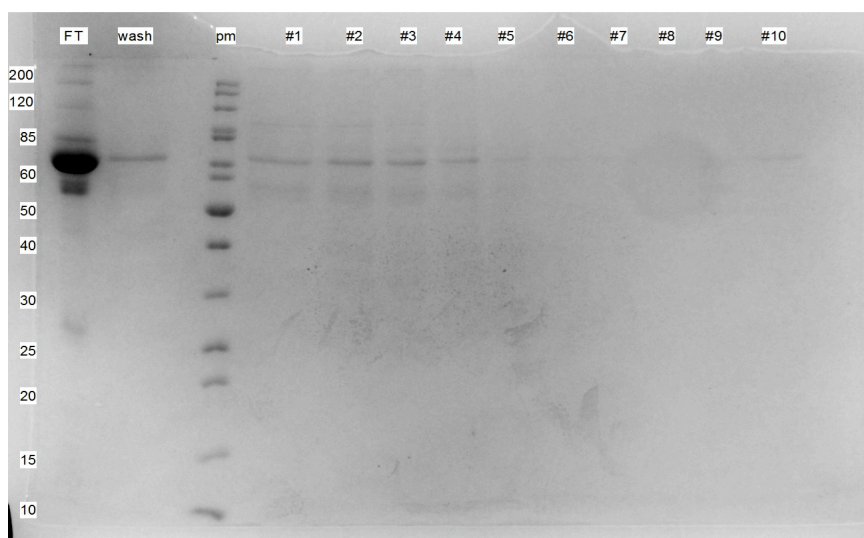


Rycina 10. Analiza SDS-PAGE frakcji uzyskanych po oczyszczeniu nr 2 pm - marker mas, #1-#10 - zebrane frakcje po elucji, wash - frakcja zebrana po płukaniu kolumny buforem do przemywania. Widoczny jest prążek o masie około 27kDa. We frakcji wash widać prążki powyżej 27kDa.



### Oczyszczanie - etap 03:

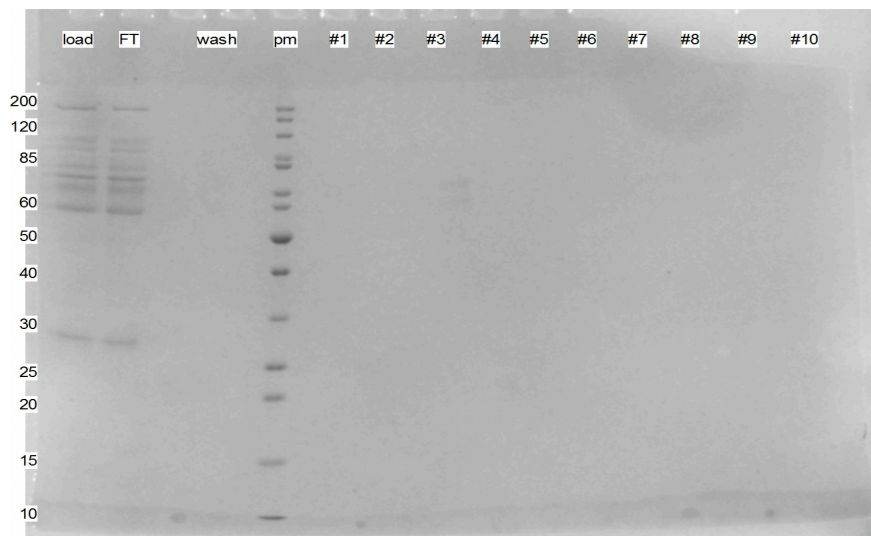
240ml wysięgu opłucnego, uprzednio przepuszczonego przez kolumnę mannozowo-agarozową, nałożono na nową kolumnę z amylozą (polimer maltozy służący do oczyszczania białek specyficznie wiążących maltozę). Kolumnę przepłukano buforem do przemywania: 20mM Tris pH 7.5, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 1M NaCl. Związane białko z kolumną wymywano przy pomocy buforu do elucji: 20mM Tris pH 7.5, 10mM EDTA. Zebrane frakcje analizowano przy pomocy SDS-PAGE (Ryc.11).



Rycina 11. Analiza SDS-PAGE frakcji uzyskanych po oczyszczaniu nr 3 FT - próbka zebrana z kolumny po nakładaniu, wash – frakcja zebrana po płukaniu kolumny buforem do przemywania, pm - marker mas, #1-#10 - zebrane frakcje po elucji. Analiza pokazała obecność wielu prążków o masie powyżej 50kDa, niewidoczne są prążki o masie około 27kDa, we frakcji wash widać główny prążek o masie około 70kDa.

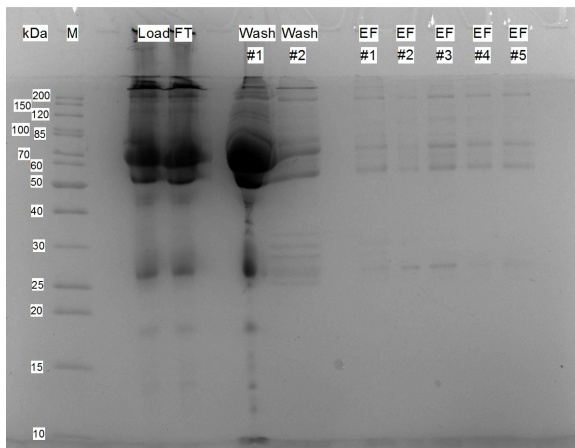
#### Oczyszczanie - etap 04:

Sprawdzono, czy białka zebrane we frakcjach po kolumnie z mannozą, zwiążą się z amylozą. 10ml frakcji po mannozie dializowano do buforu: 20mM Tris pH 7.5, 10mM CaCl<sub>2</sub>. Dializowane frakcje nałożono na kolumnę z amylozą. Kolumnę przepłukano buforem do przemywania: 20mM Tris pH 7.5, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 1M NaCl. Związane białko z kolumną wmywano przy pomocy buforu do elucji: 20mM Tris pH 7.5, 10mM EDTA. Zebrane frakcje analizowano przy pomocy SDS-PAGE (Ryc.12).

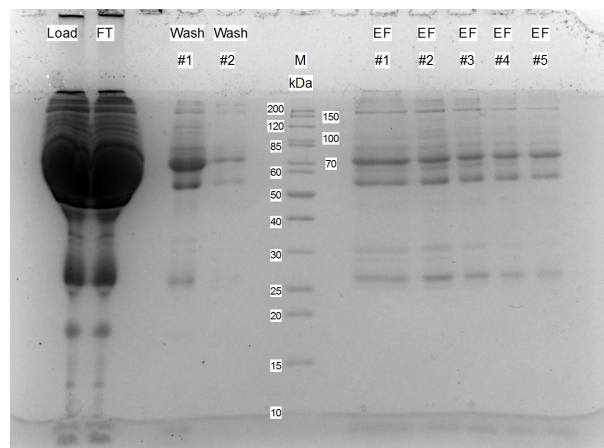


Rycina 12. Analiza SDS-PAGE frakcji uzyskanych po oczyszczaniu-04. Load: próbka nakładana na kolumnę, FT: próbka zebrana z kolumny po nakładaniu, wash: frakcja zebrana po płukaniu kolumny buforem do przemywania, pm: marker mas, #1-#10: zebrane frakcje po elucji. Analiza SDS-PAGE pokazała, że białko wymyte z kolumny mannozowej nie łąpie się na kolumnie amylozowej

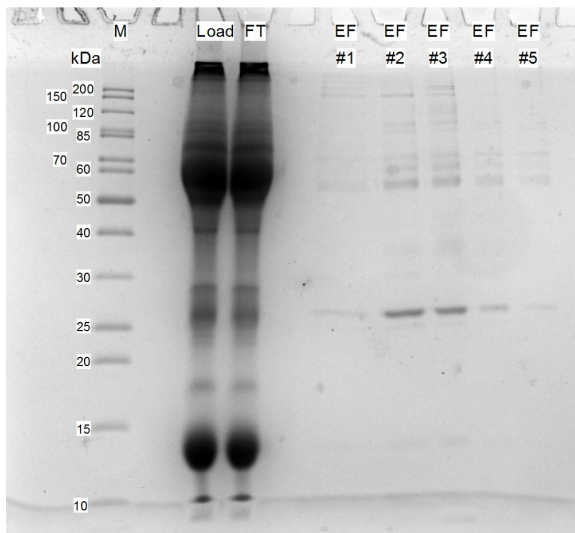
## Oczyszczanie 05-07



A



B



C

Rycina 13. A-C. Analiza SDS-PAGE frakcji uzyskanych po oczyszczaniach #5 do #7. M: marker mas, Load: próbka nakładana na złożę, FT: próbka nie związana ze złożem, Wash: próbka zebrana po płukaniu buforem do przemywania, EF#1-#5: zebrane frakcje po wymyciu ze złoża buforem do elucji.

### 1.3. Identyfikacja białka SP-A za pomocą techniki Western Blot

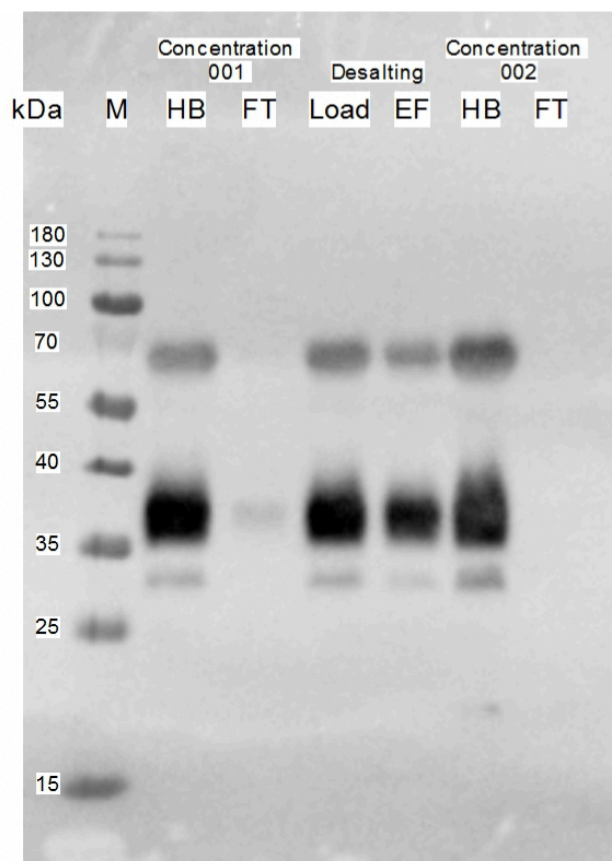
Transfer na membranę nitrocelulozową prowadzono przy stałym napięciu prądu 110V przez 1 godzinę. Po zablokowaniu, membranę inkubowano z I-rz. przeciwciałem, rozcieńczonym 1000 razy, przez 1 godzinę. Przeciwciało II-rz. inkubowano z membranę, w rozcieńczeniu 3000 razy, przez 1 godzinę. Detekcję sygnału fluorescencyjnego wykonano z użyciem reakcji chemiluminescencji (Ryc.14).

Przeciwciało I-rzędowe:

anti SP-A: Rabbit polyclonal anti-Surfactant Protein A (Numer katalogowy: 78651, Abcam)

Przeciwciało II-rzędowe:

anti Rabbit IgG-HRP: Goat polyclonal (Numer katalogowy: 97080, Abcam)



Rycina 14. Analiza Western Blot próbki połączonej. M: marker mas, Concentration 001: próbka zatężona przed odsoleniem, Desalting: odsolenie, Concentration 002: próbka zatężona po odsoleniu, HB: próbka zatężona (retentat), FT: przesącz (permeat), Load: próbka przed odsoleniem, EF: próbka po odsoleniu.

#### 1.4. Próbkę ostateczną otrzymanego SP-A

Główny prążek SP-A jest wykrywany przez przeciwciała na wysokości około 36 kDa. Dwa dodatkowe prążki o znacznie mniejszej intensywności są widoczne na wysokościach 30 kDa i 68 kDa.

Prążki na wysokościach 36 i 68 kDa odpowiadają odpowiednio monomerowi i dimerowi SP-A, opisywanymi w literaturze. Prążek na wysokości 30 kDa jest najprawdopodobniej nieznacznie zdegradowanym białkiem.

Całkowita ilość białka oznaczona metodą Bradford wykazała stężenie 1,78 mg/ml, z czego kilkuprocentową frakcję stanowi SP-A. Białko zostało zatężone tak, aby można było je zidentyfikować na żelu SDS-PAGE. SP-A wędruje w żelu na wysokości około 37kDa (prążek główny) oraz 30kDa i 68kDa (prążki towarzyszące). Uzyskane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi.

Próbka ostateczna:

- bufor PBS (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
- pH 7,4 (z wykorzystaniem wody do iniekcji)
- stężenie wszystkich białek oznaczone metodą Bradford: 1,78 mg/ml
- przefiltrowano w warunkach sterylnych przez filtr 0,22 μm
- rozpipetowano po 100 μl do 9 sterylnych fiolek
- zamrożono w -80°C

## 2. Hodowle komórkowe

Badania aktywności *in vitro* białka SP-A, przeprowadzono z wykorzystaniem trzech linii komórkowych - dwóch nowotworowych A549 oraz CALU-3 i jednej nienowotworowej (CCD39Lu).

Hodowle prowadzono w warunkach jałowych, w sterylnych jednorazowych butelkach hodowlanych (NUNC, 160ml). Media hodowlane były dedykowane specjalnie dla każdej linii komórkowej. Komórki hodowano w warunkach standardowych w inkubatorze CO<sub>2</sub> (temp. 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) do momentu konfluentnego wzrostu na poziomie ok. 80%, następnie pasażowano.

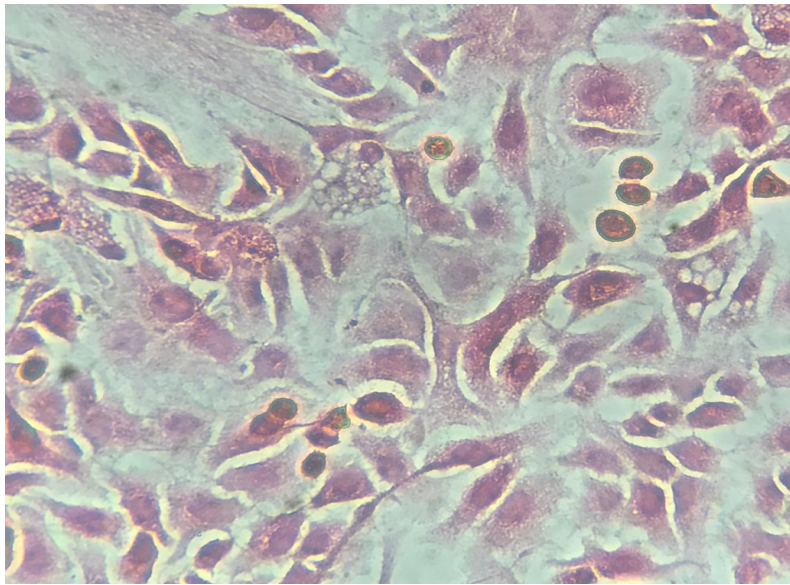
Pasaż przeprowadzano następująco:

- odesano zużyte medium
- dodano około 3ml 0,25% roztworu trypsyny z EDTA (BioWest)
- komórki inkubowano z trypsyną przez około 10 minut w inkubatorze CO<sub>2</sub> (proces trypsynizacji kontrolowano pod mikroskopem świetlnym)
- zakończenie trypsynizacji polegało na dodaniu 5ml płodowej surowicy bydlęcej (BioWest) i przeniesieniu odtrypsynizowanych komórek do jałowej probówki (FALCON, 15ml)
- komórki wirowano przez 5 minut przy 1 000 obr/min
- nadsącz zlewano, a osad komórkowy w ilości około 50µl dodawano do świeżego medium hodowlanego w świeżej butelce hodowlanej.



### 2.1. Linia A549 (ATCC® CCL-185™)

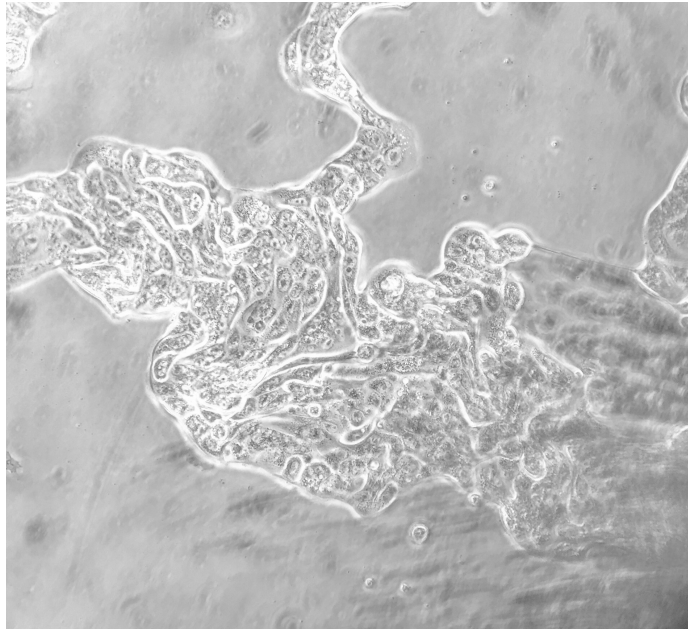
Linia komórkowa A549, to ludzkie komórki niedrobnokomórkowego raka płuca. Zostały wyprowadzone w roku 1972 od 58 letniego mężczyzny odmiany kaukaskiej, bezpośrednio z płuc (guz pierwotny). Komórki wykazują cechy adherentne i rosną w monowarstwie przylegając do podłoża naczynia hodowlanego. Komórki A549 hodowano w obecności medium RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640; LONZA) z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej (BioWest). Pasaż przeprowadzano co trzy dni (Ryc.15).



Rycina 15. Linia A549 barwiona H+E.

## 2.2. Linia Calu-3 (ATCC® HTB-55™)

Linia komórkowa Calu-3, to ludzkie komórki niedrobnokomórkowego raka płuca (gruczolakorak). Zostały pozyskane z wysięku opłucnowego (przerzut do opłucnej) od 25 letniego mężczyzny odmiany kaukaskiej. Komórki wykazują cechy adherentne i rosną w monowarstwie. Komórki CALU-3 hodowano w medium MEM (Eagle's Minimum Essential Medium; Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN) z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej (BioWest). Pasaż przeprowadzano co cztery dni (Ryc.16).

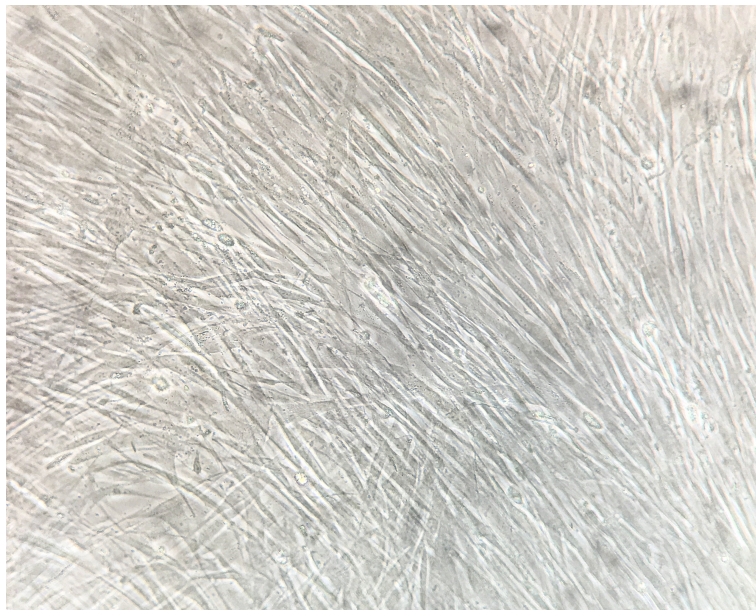


Rycina 16. Linia Calu-3.



### 2.3. Linia CCD-39Lu (ATCC® CRL-1498™)

Linia komórkowa CCD-39Lu, to ludzkie fibroblasty płucne. Zostały wyprowadzone od 8 dniowego dziecka płci żeńskiej, odmiany kaukaskiej. Komórki wykazują cechy adherentne i rosną w monowarstwie przylegającej do podłoża naczynia hodowlanego. Komórki CCD-39Lu hodowano w medium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; SIGMA) z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej (BioWest). Pasaż przeprowadzano co trzy dni (Ryc.17).



Rycina 17. Linia CCD-39Lu.

## 2.4. Hodowla komórek w obecności białka SP-A, ligandów oraz inhibitorów dla receptorów TLR

Komórki przeznaczone do eksperymentów, wysiewano na przezroczyste 24-dołkowe płytki hodowlane. Hodowle zakładano 24 godziny przed planowanym eksperymentem. Przed eksperymentami medium hodowlane wymieniano, a następnie dodawano do dołków odpowiednie substancje.

W trakcie eksperymentów wykorzystano:

- Izolaty białka A związanego z surfaktantem płucnym, w trzech różnych stężeniach:
  - minimalnym (min) 57 ng/ml
  - średnim (med) 137 ng/ml
  - wysokim (max) 2967 ng/ml
- Inhibitory i ligandy receptorów TLR (Tabela nr 2)

| SUBSTANCJA                                      | DZIAŁANIE        | NR KATALOGOWY | FIRMA           | STĘŻENIE ROBOCZE |
|---|------------------|---------------|-----------------|------------------|
| <b>Anti-hTLR2-IgA</b>                           | Inhibitor TLR2   | #maba2-htlr2  | InvivoGen       | 10µg/ml          |
| <b>Calbiochem</b>                               | Inhibitor TLR3   | #614310       | Merck Millipore | 1µg/ml           |
| <b>CLI-095</b>                                  | Inhibitor TLR4   | #tlrl-cli95   | InvivoGen       | 1µg/ml           |
| <b>LPS-EB (lipopolisacharyd E.coli 0111:B4)</b> | Ligand TLR2/TLR4 | #tlrl-ebllps  | InvivoGen       | 1µg/ml           |
| <b>Poly (I:C) HMW</b>                           | Ligand TLR3      | #tlrl-pic     | InvivoGen       | 10µg/ml          |

Tabela 2. Charakterystyka substancji użytych do kondycjonowania mediów hodowlanych.

### 3. Badania cytometryczne

Wszystkie badania cytometryczne zostały przeprowadzone przy użyciu cytometru przepływowego FACS Canto (Becton Dickinson). Analiza uzyskanych danych została wykonana w oparciu o oprogramowanie FACS Diva (Becton Dickinson). Oceniano odsetek komórek dodatnich oraz średnią intensywność fluorescencji określonych kanałów fluorescencji populacji dodatniej, której wynik względem kontroli przeliczano do wartości RFI.

#### 3.1. Analiza cyklu komórkowego z użyciem jodku propidyny

Aktywność proliferacyjną komórek ustalonych linii komórkowych, oceniano w oparciu o analizę frakcji komórek będących w fazie S cyklu komórkowego. W tym celu komórki hodowano z białkiem SP-A w 3 różnych stężeniach oraz z wybranymi inhibitorami i ligandami receptorów TLR. Schemat użytych substancji przedstawia Tabela 3 oraz Tabela 4.

| 6h             | 12h            | 24h            | 48h            |
|----------------|----------------|----------------|----------------|
| kontrola       | kontrola       | kontrola       | kontrola       |
| SP-A 57ng/ml   | SP-A 57ng/ml   | SP-A 57ng/ml   | SP-A 57ng/ml   |
| SP-A 137ng/ml  | SP-A 137ng/ml  | SP-A 137ng/ml  | SP-A 137ng/ml  |
| SP-A 2967ng/ml | SP-A 2967ng/ml | SP-A 2967ng/ml | SP-A 2967ng/ml |

Tabela 3. Schemat stężeń białka SP-A zastosowanych do określenia jego wpływu na cykl komórkowy linii A549, Calu-3 oraz CCD39-Lu.

Po zakończeniu hodowli w kolejnych punktach czasowych komórki zawieszano w 600  $\mu$ l medium hodowlanego zawierającego 1% saponiny (SIGMA). Po 30 minutach inkubacji z detergentem, komórki wirowano przy prędkości 1500 obr/min przez 4 minuty w temperaturze 4°C. Uzyskany osad zawieszono w 1ml buforu PBS z dodatkiem 10 $\mu$ l/ml jodku propidyny (SIGMA). Mieszaninę przed pomiarem inkubowano 30 min w temperaturze 4°C chroniąc przed światłem. Po tym czasie próbki poddawano akwizycji.

### 3.2. Ocena ekspresji receptorów TLR2, TLR3 i TLR4 na liniach komórkowych

Komórki hodowano w 24 dołkowej płytce, wg schematu przedstawionego w Tabeli 4. Poddano je reakcji immunofluorescencji bezpośredniej z przeciwciałami skierowanymi przeciw odpowiednim receptorom TLR (Tabela 5). W każdym badaniu wykonano kontrolę izotypową

| <b>0h</b>      | <b>3h</b>      | <b>6h</b>      | <b>12h</b>     |
|----------------|----------------|----------------|----------------|
| kontrola       | kontrola       | kontrola       | kontrola       |
| SP-A 57ng/ml   | SP-A 57ng/ml   | SP-A 57ng/ml   | SP-A 57ng/ml   |
| SP-A 137ng/ml  | SP-A 137ng/ml  | SP-A 137ng/ml  | SP-A 137ng/ml  |
| SP-A 1480ng/ml | SP-A 1480ng/ml | SP-A 1480ng/ml | SP-A 1480ng/ml |

Tabela 4. Schemat użytych substancji (białka SP-A) do określenia ekspresji receptorów TLR2, TLR3 i TLR4 linii A549, Calu-3 oraz CCD-39Lu.

| <b>Przeciwciało</b> | <b>Fluorochrom</b> | <b>Numer katalogowy</b> | <b>Źródło</b>               |
|---------------------|--------------------|-------------------------|-----------------------------|
| TLR2                | PE                 | Sc-21759                | SANTA CRUZ<br>BIOTECHNOLOGY |
| TLR3                | PE                 | Sc-32232                | SANTA CRUZ<br>BIOTECHNOLOGY |
| TLR4                | PE                 | Sc-13593                | SANTA CRUZ<br>BIOTECHNOLOGY |

Tabela 5. Charakterystyka przeciwciał użytych do określenia ekspresji receptorów TLR2, TLR3 i TLR4 w obrębie linii A549, Calu-3 oraz CCD-39Lu.

Po zakończeniu hodowli komórki płukano czystym medium (odpowiednim dla każdej linii), wirowano przy prędkości 1500 obr/min przez 5 minut w temperaturze pokojowej. W celu powierzchniowego barwienia antygenów (TLR2 i TLR4) osad zawieszono w buforze PBS i do każdej probówki zawierającej po 5 µl każdego ze znakowanych przeciwciał dodawano po 100 µl zawiesiny komórek. Komórki inkubowano przez 15 minut bez dostępu światła w temperaturze pokojowej. Następnie do mieszaniny dodawano po 500 µl buforu utrwalającego zawierającego 2% formaldehyd i ponownie próbki inkubowano w temperaturze pokojowej, przez 10 minut, bez dostępu światła. Następnie zawiesinę dwukrotnie przepłukiwano buforem PBS, po każdym płukaniu wirując j.w.

W celu określenia ekspresji antygenów cytoplazmatycznych (TLR3), po zakończeniu hodowli komórki utrwalono dodając do osadu po 500 µl bufora utrwalającego i inkubowano je przez 10 minut. Po tym czasie komórki płukano schłodzonym buforem PBS i wirowano przy prędkości 1500 obr/min przez 5 minut w temperaturze 4°C. Uzyskany osad zawieszono w buforze permeabilizującym błony komórkowe (bufor PBS + 0,1% saponiny). Próby pozostawiono przez 10 minut na lodzie, a następnie wirowano j.w. Do otrzymanego osadu dodawano po 5 µl odpowiednich przeciwciał oraz 200 µl bufora permeabilizującego. Próby inkubowano 30 minut na lodzie bez dostępu światła. Po zakończeniu inkubacji niezwiązane przeciwciała odpłukiwano dwukrotnie buforem PBS-saponina każdorazowo stosując ww. warunki wirowania

#### 4. Badania molekularne

W przeprowadzonych badaniach molekularnych analizowano komórki linii A549 hodowane wg następującego schematu:

| 0h       | 6h                              | 12h                             | 24h                             |
|----------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| kontrola | kontrola                        | kontrola                        | kontrola                        |
|          | SP-A 57ng/ml                    | SP-A 57ng/ml                    | SP-A 57ng/ml                    |
|          | SP-A 137ng/ml                   | SP-A 137ng/ml                   | SP-A 137ng/ml                   |
|          | SP-A 1480ng/ml                  | SP-A 1480ng/ml                  | SP-A 1480ng/ml                  |
|          | LPS-EB                          | LPS-EB                          | LPS-EB                          |
|          | Poly (I:C) HMW                  | Poly (I:C) HMW                  | Poly (I:C) HMW                  |
|          | SP-A + Inhibitor TLR2           | SP-A + Inhibitor TLR2           | SP-A + Inhibitor TLR2           |
|          | SP-A + Inhibitor TLR3           | SP-A + Inhibitor TLR3           | SP-A + Inhibitor TLR3           |
|          | SP-A + Inhibitor TLR4           | SP-A + Inhibitor TLR4           | SP-A + Inhibitor TLR4           |
|          | LPS-EB + Inhibitor TLR2         | LPS-EB + Inhibitor TLR2         | LPS-EB + Inhibitor TLR2         |
|          | LPS-EB + Inhibitor TLR4         | LPS-EB + Inhibitor TLR4         | LPS-EB + Inhibitor TLR4         |
|          | Poly (I:C) HMW + inhibitor TLR3 | Poly (I:C) HMW + inhibitor TLR3 | Poly (I:C) HMW + inhibitor TLR3 |
|          | Inhibitor TLR2                  | Inhibitor TLR2                  | Inhibitor TLR2                  |
|          | Inhibitor TLR3                  | Inhibitor TLR3                  | Inhibitor TLR3                  |
|          | Inhibitor TLR4                  | Inhibitor TLR4                  | Inhibitor TLR4                  |
|          | SP-A + LPS-EB + Poly (I:C) HMW  | SP-A + LPS-EB + Poly (I:C) HMW  | SP-A + LPS-EB + Poly (I:C) HMW  |

Tabela 6. Schemat hodowli do badań molekularnych linii A549.

#### **4.1. Izolacja RNA z hodowli komórkowych**

Całkowity komórkowy RNA izolowano używając zestawu Total RNA (A&A Biotechnology). Izolację przeprowadzono zgodnie z załączonym do zestawu protokołem. W celu przeprowadzenia lizy oraz inaktywacji endogennych RNAz, do ok.  $1 \times 10^6$  komórek dodawano 800  $\mu$ l fenożu, który jest mieszaniną soli chaotropowych i fenolu. Całą mieszaninę dokładnie mieszano, a następnie inkubowano 5 minut w temperaturze 50°C. Następnie do komórek dodawano po 200  $\mu$ l chloroformu, mieszano poprzez odwracanie probówki i pozostawiano w temperaturze pokojowej przez 3 minuty. Po odwirowaniu przy prędkości 12000 obr/min przez 10 minut, zbierano górną frakcję zawierającą RNA i przenoszono ją do nowej probówki zawierającej 250  $\mu$ l izopropanolu. Całość mieszano i nanoszono na mikrokolumny ze złożem krzemionkowym do izolacji RNA. Po trzykrotnym płukaniu roztworem płuczącym, oczyszczone RNA eluowano z mikrokolumny wodą wolną od RNA-z. W celu oceny jakościowej wyizolowanego RNA próbki poddawano elektroforezie w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny w stężeniu 0,5  $\mu$ g/ml. Oczyszczone RNA do czasu dalszych analiz przechowywano w -20°C.

#### **4.2. Pomiar stężenia uzyskanego całkowitego RNA**

Stężenie RNA oznaczano przy długości fali  $\lambda = 260$ nm z zastosowaniem spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (ThermoScientific NanoDrop Products, USA), używając każdorazowo do analizy 3  $\mu$ l próby badanej. Aparat kalibrowano zastosowanym rozpuszczalnikiem (RNase-Free Water, Life Technologies, USA). Uzyskany wynik odczytywano stosując program komputerowy ND-1000 v3.5.2 (Coleman Technologies Inc., USA).

#### **4.3. Amplifikacja cDNA z użyciem metody qRT-PCR**

Poziom ekspresji genów PBGD, TLR2, TLR3, TLR4, BAX, BCL-2, TTF-1, IL-6, INF- $\gamma$  oraz TNF- $\alpha$  oznaczano w dwóch powtórzeniach techniką qRT-PCR z wykorzystaniem zestawu QuantiTect SYBR<sup>®</sup> Green RT-PCR Kit (QIAGEN) aparatu Rotor Gene 6000 oraz dołączonego do niego oprogramowania w wersji 1.7 (Corbett Research, Australia). Zestaw QuantiTect SYBR<sup>®</sup> Green RT-PCR Kit umożliwia przeprowadzenie reakcji odwrotnej transkrypcji jak i qPCR w jednej probówce bezpośrednio z RNA. Skład zestawu przedstawiono w Tabeli 7.

| Odczynnik  | Zawartość                                |   | Opis działania   |
|--|--|---|--|
| QuantiTect<br>SYBR Green<br>RT-PCR<br>Master Mix | HotStarTaq DNA<br>Polimeraza             | Polimeraza<br>DNA typu<br>hot-start   | Enzym pozostaje całkowicie nieaktywny podczas reakcji odwrotnej transkrypcji oraz nie zakłóca jej. Zapobiega to powstawaniu błędnie zaprogramowanych produktów RT-PCR i formacji dimerów używanych primerów. Enzym jest aktywowany po etapie odwrotnej transkrypcji poprzez 15-minutowy etap inkubacji w 95°C. „Hot start” dezaktywuje również enzymy odwrotnej transkrypcji, zapewniając czasowe rozdzielanie odwrotnej transkrypcji i qPCR |
|  | QuantiTect<br>SYBR Green<br>RT-PCR Bufor | Tris·Cl<br>KCl<br>(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>5 mM MgCl <sub>2</sub><br>(pH 8.7) | Bufor zawiera zrównoważoną kombinację KCl i (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , która zapewnia wysoki stosunek specyficznego do niespecyficznego wiązania starterów podczas każdego cyklu PCR. Przy stosowaniu tego buforu, wiązanie się starterów jest tylko nieznacznie zależne od stężenia MgCl <sub>2</sub>  |
|  | dNTP mix                                 | dATP<br>dCTP<br>dGTP<br>dTTP/dUTP   |  |
|  | Barwnik<br>fluorescencyjny               | SYBR Green I  | SYBR Green jest barwnikiem, który wiąże wszystkie dwuniciowe cząsteczki DNA, emitując sygnał fluorescencyjny podczas wiązania  |
| QuantiTect RT<br>Mix                             | Mieszanina<br>odwrotnej<br>transkryptazy | Odwrotna<br>transkryptaza<br>Omniscript®<br><br>Odwrotna<br>transkryptaza<br>Sensiscript®               | QuantiTect RT Mix zawiera zoptymalizowaną mieszaninę transkryptaz Omniscript i Sensiscript. Oba enzymy wykazują wysokie powinowactwo do RNA. Omniscript jest przeznaczony do odwrotnej transkrypcji ilości RNA większej niż 50ng, a Sensiscript jest zoptymalizowany do użycia z bardzo małymi ilościami RNA (<50ng). Ta kombinacja enzymów zapewnia wysoce wydajną i czułą odwrotną transkrypcję w szerokim zakresie ilości matrycy RNA     |

Tabela 7. Skład zestawu do qRT-PCR (QIAGEN).



Zmiany intensywności fluorescencji w przebiegu reakcji qRT-PCR odpowiadają 3 fazom reakcji. Pierwsza charakteryzuje się brakiem przyrostu ilości produktu. W drugiej dochodzi do bardzo szybkiego przyrostu fluorescencji i nazywa się ją fazą logarytmicznego wzrostu. Moment, w którym reakcja amplifikacji wchodzi w tę fazę (Cp, ang. crossing point) zależy wyłącznie od początkowej ilości matrycy. W trzeciej fazie następuje zahamowanie przyrostu ilości produktu w wyniku wyczerpania się substratów reakcji amplifikacji i nosi ona nazwę fazy plateau.

Reakcję qRT-PCR przeprowadzano w sterylnych probówkach, do każdej z nich dodając 10 µl mieszaniny reakcyjnej o następującym składzie:

- 5 µl QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix (QIAGEN)
- 0,2 µl QuantiTect RT Mix (QIAGEN)
- 0,1 µl starter forward (SIGMA)
- 0,1 µl starter reverse (SIGMA)
- 2,6 µl sterylnej H<sub>2</sub>O (QIAGEN)
- 2 µl RNA

Stosowano następujące pary starterów dla poszczególnych genów w reakcji Real-Time PCR:

|              |                |                              |
|--------------|----------------|------------------------------|
| <b>PBGD</b>  | forward primer | 5' GCCAAGGACCAGGACATC 3'     |
|              | reverse primer | 5' TCAGGTACAGTTGCCCATC 3'    |
| <b>TLR2</b>  | forward primer | 5' CCCATTGCTCTTTCACTGCT 3'   |
|              | reverse primer | 5' CTCCTTGGAGAGGCTGATG 3'    |
| <b>TLR3</b>  | forward primer | 5' TGGTTGGGCCACCTAGAAGTA 3'  |
|              | reverse primer | 5' TCTCCATTCTGGCCTGTG 3'     |
| <b>TLR4</b>  | forward primer | 5' CCCATTGCTCTTTCACTGCT 3'   |
|              | reverse primer | 5' CTCCTTGGAGAGGCTGATG 3'    |
| <b>BAX</b>   | forward primer | 5' TTTGCTTCAGGGTTTCATCC 3'   |
|              | reverse primer | 5' CAGTTGAAGTTGCCGTCAGA 3'   |
| <b>BCL-2</b> | forward primer | 5' GTGTGTGGAGAGCGTCAACC 3'   |
|              | reverse primer | 5' GAGACAGCCAGGAGAAATCAAA 3' |

|                                |                |                              |
|--------------------------------|----------------|------------------------------|
| <i>TTF-1</i>                   | forward primer | 5' AAATCTAGGCCCGACAAAA 3'    |
|                                | reverse primer | 5' CATCGGCATCTCCTGAATCT 3'   |
| <i>IL-6</i>                    | forward primer | 5' ACACAGACAGCCACTCACCTC 3'  |
|                                | reverse primer | 5' CATCCATCTTTTTCAGCCATC 3'  |
| <i>INF-<math>\gamma</math></i> | forward primer | 5' GTTTGGGTTCTCTTGGCTGT 3'   |
|                                | reverse primer | 5' ACACTCTTTTGGATGCTCTGG 3'  |
| <i>TNF-<math>\alpha</math></i> | forward primer | 5' TTCCTGAGCCTCTTCTCCTTC 3'  |
|                                | reverse primer | 5' GGTTTGCTAGAAGATGGGCTAG 3' |

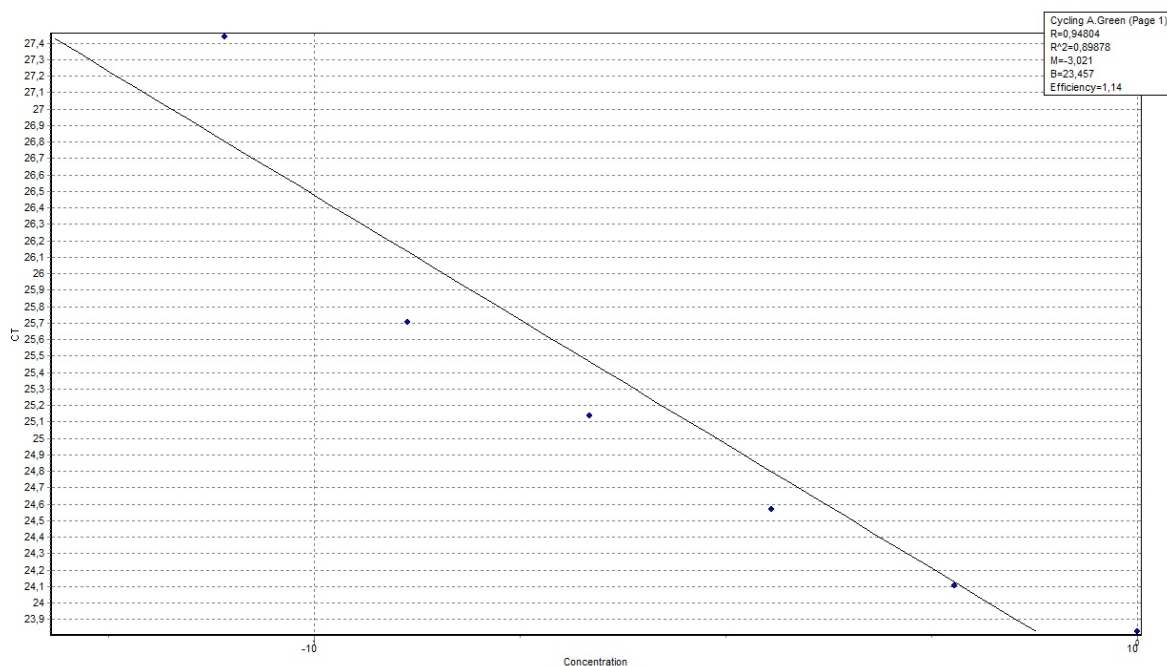
Tabela 8. Charakterystyka starterów użytych do reakcji qRT-PCR.

Reakcje prowadzono zgodnie z następującym profilem czasowo-temperaturowym:

| Etap                    |             | Temperatura | Czas   |
|-------------------------|-------------|-------------|--------|
| Odrotna transkrypcja    |             | 50°C        | 30 min |
| Aktywacja polimerazy    |             | 95°C        | 15 min |
| Amplifikacja (40 cykli) | Denaturacja | 94°C        | 15 s   |
|                         | Annealing   | 50°C        | 30 s   |
|                         | Elongacja   | 72°C        | 30 s   |
| Chłodzenie              |             | 40°C        | 30 s   |

Tabela 9. Przebieg reakcji qRT-PCR.

Do oceny ekspresji analizowanych genów posługiwano się względną metodą ilościową. Umożliwia ona ustalenie względnej różnicy między badanymi próbkami. Wyniki oznaczeń ilościowych cDNA badanych genów normalizowano względem genu referencyjnego, czyli cDNA genu konstytutywnego, którego ekspresja jest względnie stała, na wysokim poziomie i nie podlega zmianom w grupach badanych. W tym celu wykorzystywano gen kodujący deaminazę porfobilinogenu (PBGD, *ang. porphobilinogen deaminase*). Ryc. 18 przedstawia przykładowy obraz krzywej wzorcowej ustalonej dla genu PBGD.



Rycina 18. Krzywa wzorcowa dla genu PBGD otrzymana w reakcji qRT-PCR.

## 5. Analiza statystyczna wyników

Analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Statistica 13.3 (StatSoft, Inc). W tym celu zastosowano analizę podstawowych statystyk opisowych wraz z testami Shapiro-Wilka jak również analizę czynnikowej regresji wielorakiej oraz jednoczynnikową analizę wariancji. Za poziom istotności uznano klasyczny próg  $\alpha = 0,05$ .



## WYNIKI

### 1. Wpływ stężenia białka SP-A na cykl komórkowy

#### 1.1. Linia A549

W pierwszej kolejności postanowiono odpowiedzieć na pytanie, czy białko SP-A wpływa na cykl komórkowy linii A549. W tym celu wykonano szereg analiz czynnikowej regresji wielorakiej. Jako zmienne wyjaśniane wprowadzono kolejno odsetek komórek znajdujących się w danej fazie cyklu komórkowego (G0/G1, S, G2/M) oraz komórek martwych. Jako zmienne wyjaśniające uwzględniono stężenie białka SP-A (w ng/ml) oraz czas w godzinach.

Dla odsetka komórek znajdujących się w fazie G0/G1 stworzono model, który istotnie wyjaśniał zmienność zmiennej wyjaśnianej:  $F(3;28) = 43,94$ ;  $p < 0,001$ . Skonstruowany model wyjaśniał 80,6% zmienności zmiennej wyjaśnianej, o czym świadczy wartość skorygowanego współczynnika  $R^2 = 0,806$ . Okazało się, że czas jest istotnym czynnikiem powiązaniem z odsetkiem komórek znajdujących się w tej fazie cyklu – im więcej czasu upłynęło od początku doświadczenia, tym większy odsetek komórek znajdował się w fazie G0/G1. Natomiast dla stężenia SP-A oraz interakcji obu czynników nie zanotowano wyniku istotnego statystycznie. Oznacza to, że białko SP-A nie wpływa na odsetek komórek znajdujących się w fazie G0/G1.

Dla odsetka komórek znajdujących się w fazie S stworzono model, który istotnie wyjaśniał zmienność zmiennej wyjaśnianej:  $F(3;28) = 31,72$ ;  $p < 0,001$ . Skonstruowany model wyjaśniał 74,8% zmienności zmiennej wyjaśnianej, o czym świadczy wartość skorygowanego współczynnika  $R^2 = 0,748$ . Okazało się, że czas jest istotnym czynnikiem powiązaniem z odsetkiem komórek znajdujących się w tej fazie cyklu – im więcej czasu upłynęło od początku doświadczenia, tym mniejszy odsetek komórek znajdował się w fazie S. Natomiast dla stężenia SP-A oraz interakcji obu czynników nie zanotowano wyniku istotnego statystycznie. Oznacza to, że białko SP-A nie wpływa na odsetek komórek znajdujących się w fazie S.

Dla odsetka komórek znajdujących się w fazie G2/M stworzono model, który istotnie wyjaśniał zmienność zmiennej wyjaśnianej:  $F(3;28) = 82,61$ ;  $p < 0,001$ . Skonstruowany model wyjaśniał 88,8% zmienności zmiennej wyjaśnianej, o czym świadczy wartość skorygowanego współczynnika  $R^2 = 0,888$ . Okazało się, że czas jest istotnym czynnikiem powiązaniem z odsetkiem komórek znajdujących się w tej fazie cyklu. Ponadto stężenie białka SP-A również okazało się istotnym czynnikiem powiązaniem z odsetkiem komórek znajdujących się w tej fazie cyklu. Efekt interakcyjny obu zmiennych również okazał się istotny statystycznie. Należy zatem uznać, że w miarę upływu czasu nasila się efekt działania białka SP-A, polegający na zmniejszeniu odsetka komórek w fazie G2/M.

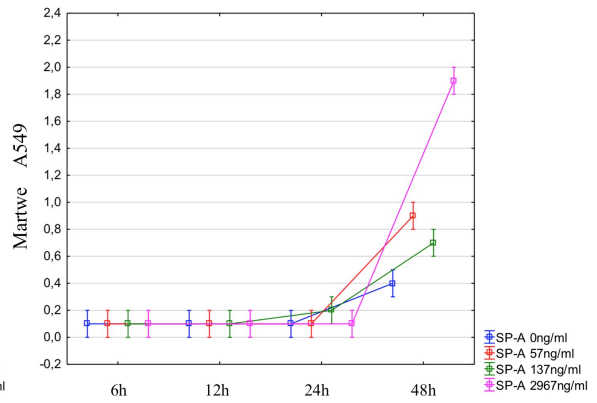
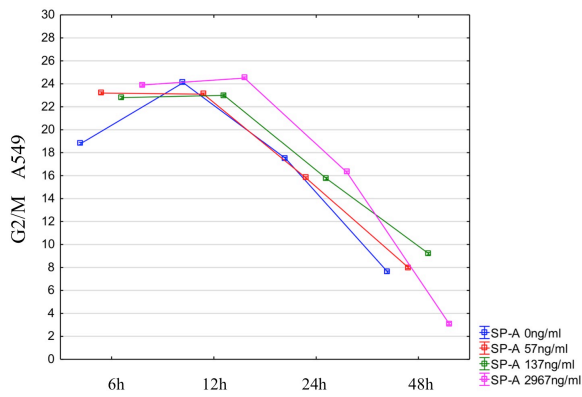
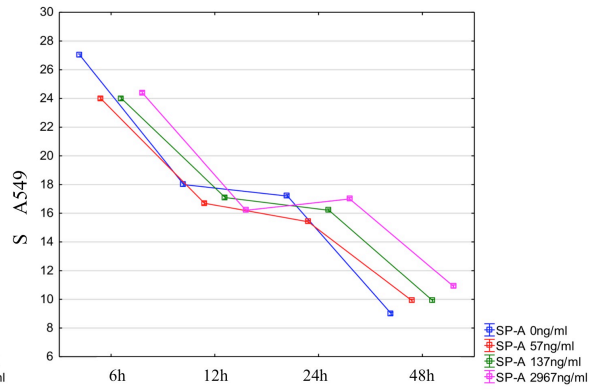
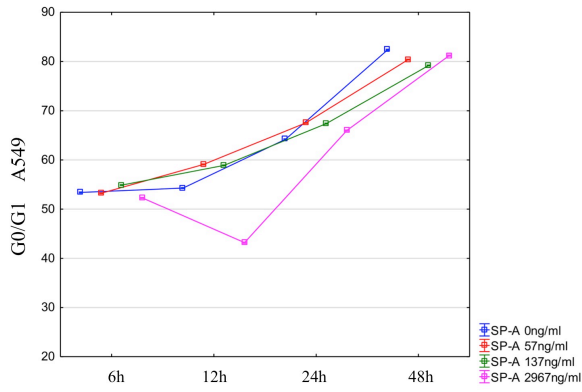
Dla odsetka komórek martwych stworzono model, który istotnie wyjaśniał zmienność zmiennej wyjaśnianej:  $F(3;28) = 38,41$ ;  $p < 0,001$ . Skonstruowany model wyjaśniał 78,4% zmienności zmiennej wyjaśnianej, o czym świadczy wartość skorygowanego współczynnika  $R^2 = 0,784$ . Okazało się, że czas jest istotnym czynnikiem powiązaniem z odsetkiem komórek znajdujących się w tej fazie. Ponadto stężenie białka SP-A również okazało się istotnym czynnikiem powiązaniem z odsetkiem komórek martwych. Efekt interakcyjny obu zmiennych również okazał się istotny statystycznie. Należy zatem uznać, że w miarę upływu czasu nasila się efekt działania białka SP-A, polegający na zwiększeniu odsetka komórek martwych.

Podsumowując, białko SP-A nie wywiera wpływu na odsetek komórek znajdujących się w fazie G0/G1 oraz S, natomiast powoduje nasilający się z czasem efekt zwiększenia się liczby komórek martwych, kosztem komórek w fazie G2/M. Wyniki przedstawiono w Tabeli nr 10 oraz na Rysunku nr 19.

|                | <i>B</i> | <i>SE</i> | <i>t</i> | <i>p</i> | $\beta$ |
|----------------|----------|-----------|----------|----------|---------|
| Faza G0/G1     |          |           |          |          |         |
| (Stała)        | 50,26    | 1,99      | 25,24    | <0,001   |         |
| Czas           | 0,64     | 0,07      | 8,89     | <0,001   | 0,830   |
| SP-A           | 0,00     | 0,00      | -2,01    | 0,054    | -0,274  |
| Czas * SP-A    | 0,00     | 0,00      | 1,26     | 0,219    | 0,182   |
| Faza S         |          |           |          |          |         |
| (Stała)        | 24,14    | 1,01      | 23,93    | <0,001   |         |
| Czas           | -0,32    | 0,04      | -8,65    | <0,001   | -0,920  |
| SP-A           | 0,00     | 0,00      | -0,60    | 0,551    | -0,094  |
| Czas * SP-A    | 0,00     | 0,00      | 0,78     | 0,441    | 0,129   |
| Faza G2/M      |          |           |          |          |         |
| (Stała)        | 25,29    | 0,84      | 30,06    | <0,001   |         |
| Czas           | -0,35    | 0,03      | -11,52   | <0,001   | -0,819  |
| SP-A           | 0,00     | 0,00      | 2,14     | 0,042    | 0,221   |
| Czas * SP-A    | 0,00     | 0,00      | -2,95    | 0,006    | -0,325  |
| Komórki martwe |          |           |          |          |         |
| (Stała)        | -0,06    | 0,08      | -0,70    | 0,492    |         |
| Czas           | 0,01     | 0,00      | 4,54     | <0,001   | 0,448   |
| SP-A           | 0,00     | 0,00      | -2,43    | 0,022    | -0,349  |
| Czas * SP-A    | 0,00     | 0,00      | 5,33     | <0,001   | 0,816   |

*B* – współczynnik regresji; *SE* - błąd standardowy; *t* – statystyka testu; *p* – poziom istotności;  $\beta$  – wystandaryzowany współczynnik regresji

Tabela 10. Współczynniki analizy regresji przewidującej wpływ białka SP-A i czasu na cykl komórkowy linii A549.



Rycina 19. Wpływ różnych stężeń białka SP-A na cykl komórkowy linii A549



## 1.2. Linia Calu-3

W następnej kolejności postanowiono odpowiedzieć na pytanie, czy białko SP-A wpływa na cykl komórkowy linii Calu-3. W tym celu wykonano szereg analiz czynnikowej regresji wielorakiej. Jako zmienne wyjaśniane wprowadzono kolejno odsetek komórek znajdujących się w danej fazie cyklu komórkowego (G0/G1, S, G2/M) oraz komórek martwych. Jako zmienne wyjaśniające uwzględniono stężenie białka SP-A (w ng/ml) oraz czas w godzinach.

Dla odsetka komórek znajdujących się w fazie G0/G1 stworzono model, który istotnie wyjaśniał zmienność zmiennej wyjaśnianej:  $F(3;28) = 6,78$ ;  $p = 0,001$ . Skonstruowany model wyjaśniał 35,8% zmienności zmiennej wyjaśnianej, o czym świadczy wartość skorygowanego współczynnika  $R^2 = 0,358$ . Okazało się, że efekt interakcyjny obu zmiennych jest istotny statystycznie. Natomiast dla stężenia SP-A oraz czasu nie zanotowano wyniku istotnego statystycznie. Należy zatem uznać, że w miarę upływu czasu nasila się efekt działania białka SP-A, polegający na zmniejszeniu odsetka komórek znajdującego się w tej fazie cyklu.

Dla odsetka komórek znajdujących się w fazie S nie udało się stworzyć modelu, który istotnie wyjaśniałby zmienność zmiennej wyjaśnianej:  $F(3;28) = 1,15$ ;  $p = 0,345$ ;  $R^2 = 0,015$ . Oznacza to, że odsetek komórek pozostających w fazie S pozostaje stały niezależnie od upływu czasu oraz stężenia białka SP-A. Dla odsetka komórek znajdujących się w fazie G2/M stworzono model, który istotnie wyjaśniał zmienność zmiennej wyjaśnianej:  $F(3;28) = 8,02$ ;  $p < 0,001$ . Skonstruowany model wyjaśniał 40,5% zmienności zmiennej wyjaśnianej, o czym świadczy wartość skorygowanego współczynnika  $R^2 = 0,405$ . Okazało się, że czas jest istotnym czynnikiem powiązany z odsetkiem komórek znajdujących się w tej fazie cyklu. Efekt interakcyjny obu zmiennych również okazał się istotny statystycznie. Należy uznać, że w miarę upływu czasu oraz zwiększania stężenia białka SP-A następuje spadek odsetka komórek w tej fazie cyklu, jednak efekt ten jest słabiej wyrażony w miarę zwiększania stężenia SP-A oraz upływu czasu.

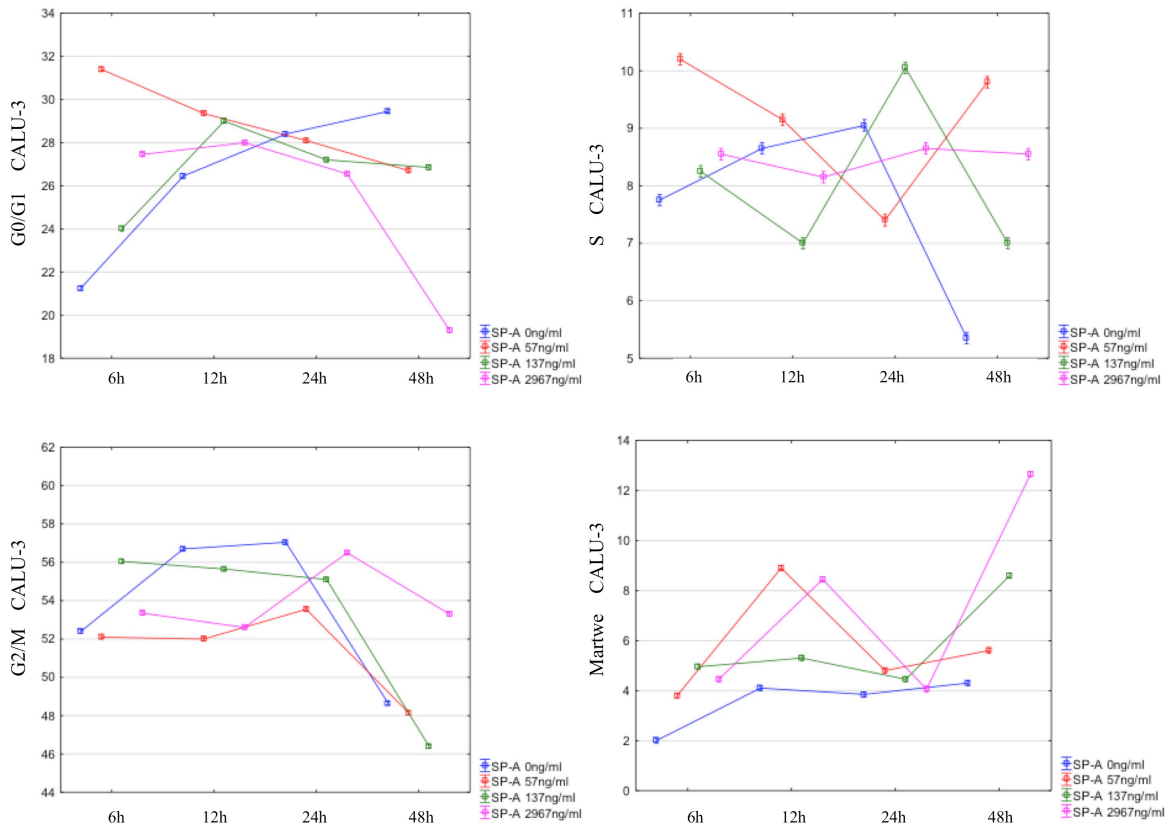
Dla odsetka komórek martwych stworzono model, który istotnie wyjaśniał zmienność zmiennej wyjaśnianej:  $F(3;28) = 7,83$ ;  $p < 0,001$ . Skonstruowany model wyjaśniał 40,0% zmienności zmiennej wyjaśnianej, o czym świadczy wartość skorygowanego współczynnika  $R^2 = 0,400$ . Efekt interakcyjny obu zmiennych okazał się istotny statystycznie. Należy uznać, że w miarę upływu czasu oraz zwiększania stężenia białka SP-A następuje wzrost odsetka komórek martwych, jednak efekt ten jest słabiej wyrażony w miarę zwiększania stężenia SP-A.

Podsumowując, białko SP-A nie wywiera wpływu na odsetek komórek znajdujących się w fazie S, natomiast powoduje zwiększenie się odsetka komórek martwych, kosztem komórek w fazie G2/M, jednakże efekt ten jest mniej wyraźny im większe stężenie białka SP-A znajduje się w roztworze oraz w miarę upływu czasu. W miarę upływu czasu natomiast wzrost liczby komórek martwych następuje kosztem coraz większego spadku odsetka komórek znajdujących się w fazie G0/G1. Wyniki przedstawiono w Tabeli nr 11 i na Rysunku nr 20.

|                | <i>B</i> | <i>SE</i> | <i>t</i> | <i>p</i> | $\beta$ |
|----------------|----------|-----------|----------|----------|---------|
| Faza G0/G1     |          |           |          |          |         |
| (Stała)        | 26,62    | 0,88      | 30,39    | <0,001   |         |
| Czas           | 0,03     | 0,03      | 1,08     | 0,290    | 0,183   |
| SP-A           | 0,00     | 0,00      | 1,96     | 0,060    | 0,486   |
| Czas * SP-A    | 0,00     | 0,00      | -3,86    | 0,001    | -1,017  |
| Faza S         |          |           |          |          |         |
| (Stała)        | 8,96     | 0,45      | 20,02    | <0,001   |         |
| Czas           | -0,03    | 0,02      | -1,82    | 0,079    | -0,384  |
| SP-A           | 0,00     | 0,00      | -0,67    | 0,508    | -0,206  |
| Czas * SP-A    | 0,00     | 0,00      | 1,07     | 0,292    | 0,351   |
| Faza G2/M      |          |           |          |          |         |
| (Stała)        | 56,29    | 0,90      | 62,61    | <0,001   |         |
| Czas           | -0,16    | 0,03      | -4,78    | <0,001   | -0,783  |
| SP-A           | 0,00     | 0,00      | -1,41    | 0,168    | -0,337  |
| Czas * SP-A    | 0,00     | 0,00      | 2,52     | 0,018    | 0,639   |
| Komórki martwe |          |           |          |          |         |
| (Stała)        | 4,17     | 0,74      | 5,67     | <0,001   |         |
| Czas           | 0,04     | 0,03      | 1,36     | 0,185    | 0,223   |
| SP-A           | 0,00     | 0,00      | -0,25    | 0,803    | -0,060  |
| Czas * SP-A    | 0,00     | 0,00      | 2,37     | 0,025    | 0,605   |

*B* – współczynnik regresji; *SE* - błąd standardowy; *t* – statystyka testu; *p* – poziom istotności;  $\beta$  – wystandaryzowany współczynnik regresji

Tabela 11. Współczynniki analizy regresji przewidującej wpływ białka SP-A i czasu na cykl komórkowy linii Calu-3



Rycina 20. Wpływ różnych stężeń białka SP-A na cykl komórkowy linii Calu-3

### 1.3. Linia CCD-39Lu

Następnie postanowiono odpowiedzieć na pytanie, czy białko SP-A wpływa na cykl komórkowy linii CCD-39Lu. W tym celu wykonano szereg analiz czynnikowej regresji wielorakiej. Jako zmienne wyjaśniane wprowadzono kolejno odsetek komórek znajdujących się w danej fazie cyklu komórkowego (G0/G1, S, G2/M) oraz komórek martwych. Jako zmienne wyjaśniające uwzględniono stężenie białka SP-A (w ng/ml) oraz czas w godzinach.

Dla odsetka komórek znajdujących się w fazie G0/G1 stworzono model, który istotnie wyjaśniał zmienność zmiennej wyjaśnianej:  $F(3;28) = 14,70$ ;  $p < 0,001$ . Skonstruowany model wyjaśniał 57,0% zmienności zmiennej wyjaśnianej, o czym świadczy wartość skorygowanego współczynnika  $R^2 = 0,570$ . Okazało się, że czas jest istotnym czynnikiem powiązanim z odsetkiem komórek znajdujących się w tej fazie cyklu – w miarę upływu czasu spada odsetek komórek znajdujących się w fazie G0/G1. Stężenie białka SP-A również jest istotnym czynnikiem powiązanim z odsetkiem komórek znajdujących się w tej fazie cyklu – im większe stężenie SP-A tym większy odsetek komórek znajdujących się w fazie G0/G1. Efekt interakcyjny obu zmiennych nie okazał się istotny statystycznie.

Dla odsetka komórek znajdujących się w fazie S stworzono model, który istotnie wyjaśniał zmienność zmiennej wyjaśnianej:  $F(3;28) = 5,78$ ;  $p = 0,003$ . Skonstruowany model wyjaśniał 31,6% zmienności zmiennej wyjaśnianej, o czym świadczy wartość skorygowanego współczynnika  $R^2 = 0,316$ . Stężenie białka SP-A jest istotnym czynnikiem powiązanim z odsetkiem komórek znajdujących się w tej fazie cyklu – im większe stężenie SP-A tym mniejszy odsetek komórek znajdujących się w fazie S. Efekt czasu oraz efekt interakcyjny obu zmiennych nie okazał się istotny statystycznie.

Dla odsetka komórek znajdujących się w fazie G2/M stworzono model, który istotnie wyjaśniał zmienność zmiennej wyjaśnianej:  $F(3;28) = 3,51$ ;  $p = 0,028$ . Skonstruowany model wyjaśniał 20,0% zmienności zmiennej wyjaśnianej, o czym świadczy wartość skorygowanego współczynnika  $R^2 = 0,200$ . Okazało się, że czas jest istotnym czynnikiem powiązanim z odsetkiem komórek znajdujących się w tej fazie cyklu – w miarę upływu czasu wzrasta odsetek komórek znajdujących się w tej fazie cyklu. Efekt stężenia SP-A oraz efekt interakcyjny obu zmiennych nie okazał się istotny statystycznie.

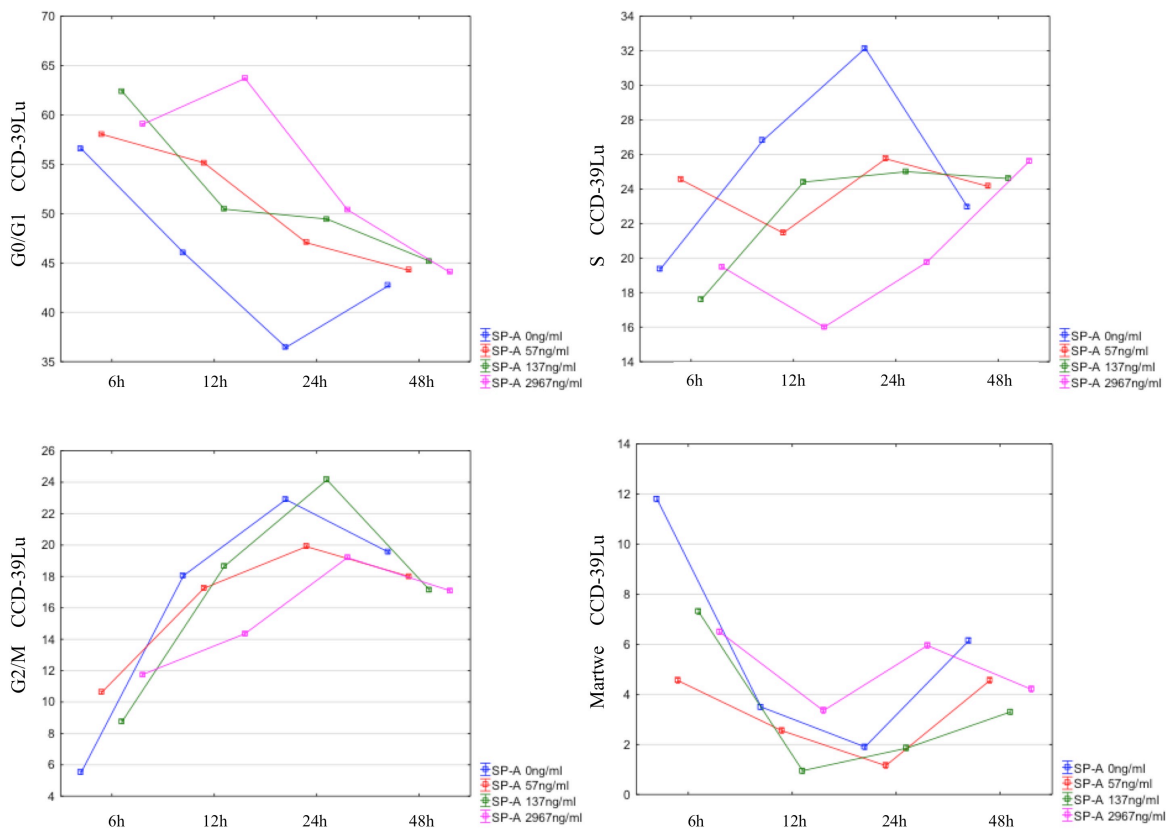
Dla odsetka komórek martwych nie udało się stworzyć modelu, który istotnie wyjaśniałby zmienność zmiennej wyjaśnianej:  $F(3;28) = 0,49$ ;  $p = 0,691$ ;  $R^2 = -0,005$ . Oznacza to, że odsetek komórek martwych pozostaje stały niezależnie od upływu czasu oraz stężenia białka SP-A.

Podsumowując, białko SP-A nie wywiera wpływu na odsetek komórek martwych ani komórek znajdujących się w fazie G2/M, powoduje natomiast zwiększenie odsetka komórek znajdujących się w fazie G0/G1 kosztem komórek znajdujących się w fazie S. Wyniki przedstawiono w Tabeli 12 i na Rysunku 21.

|                | <i>B</i> | <i>SE</i> | <i>t</i> | <i>p</i> | $\beta$ |
|----------------|----------|-----------|----------|----------|---------|
| Faza G0/G1     |          |           |          |          |         |
| (Stała)        | 56,10    | 1,80      | 31,19    | <0,001   |         |
| Czas           | -0,30    | 0,07      | -4,63    | <0,001   | -0,644  |
| SP-A           | 0,00     | 0,00      | 2,23     | 0,034    | 0,452   |
| Czas * SP-A    | 0,00     | 0,00      | -1,00    | 0,328    | -0,215  |
| Faza S         |          |           |          |          |         |
| (Stała)        | 22,98    | 1,17      | 19,61    | <0,001   |         |
| Czas           | 0,05     | 0,04      | 1,25     | 0,223    | 0,219   |
| SP-A           | 0,00     | 0,00      | -3,01    | 0,005    | -0,769  |
| Czas * SP-A    | 0,00     | 0,00      | 1,60     | 0,121    | 0,434   |
| Faza G2/M      |          |           |          |          |         |
| (Stała)        | 12,92    | 1,60      | 8,08     | <0,001   |         |
| Czas           | 0,17     | 0,06      | 2,93     | 0,007    | 0,557   |
| SP-A           | 0,00     | 0,00      | 0,04     | 0,965    | 0,012   |
| Czas * SP-A    | 0,00     | 0,00      | -0,48    | 0,635    | -0,141  |
| Komórki martwe |          |           |          |          |         |
| (Stała)        | 4,86     | 1,00      | 4,84     | <0,001   |         |
| Czas           | -0,03    | 0,04      | -0,89    | 0,381    | -0,194  |
| SP-A           | 0,00     | 0,00      | 0,32     | 0,748    | 0,103   |
| Czas * SP-A    | 0,00     | 0,00      | 0,10     | 0,921    | 0,034   |

*B* – współczynnik regresji; *SE* - błąd standardowy; *t* – statystyka testu; *p* – poziom istotności;  $\beta$  – wystandaryzowany współczynnik regresji

Tabela 12. Współczynniki analizy regresji przewidującej wpływ białka SP-A i czasu na cykl komórkowy linii CCD-39Lu



Rycina 21. Wpływ różnych stężeń białka SP-A na cykl komórkowy linii CCD-39Lu



## 2. Wpływ stężenia białka SP-A na ekspresję receptorów TLR

### 2.1. Linia A549

W następnej kolejności postanowiono odpowiedzieć na pytanie, czy białko SP-A wpływa na ekspresję TLR2, TLR3 i TLR4 w linii komórkowej A549. W tym celu wykonano szereg analiz czynnika regresji wielorakiej. Jako zmienne wyjaśniane wprowadzono kolejno ekspresję receptorów TLR2, TLR3 i TLR4. Jako zmienne wyjaśniające uwzględniono stężenie białka SP-A (w ng/ml) oraz czas w godzinach.

Dla ekspresji TLR2 nie udało się stworzyć modelu, który istotnie wyjaśniałby zmienność zmiennej wyjaśnianej:  $F(3;28) = 0,66$ ;  $p = 0,583$ ;  $R^2 = -0,046$ . Oznacza to, że ekspresja TLR2 pozostaje stała niezależnie od upływu czasu oraz stężenia białka SP-A.

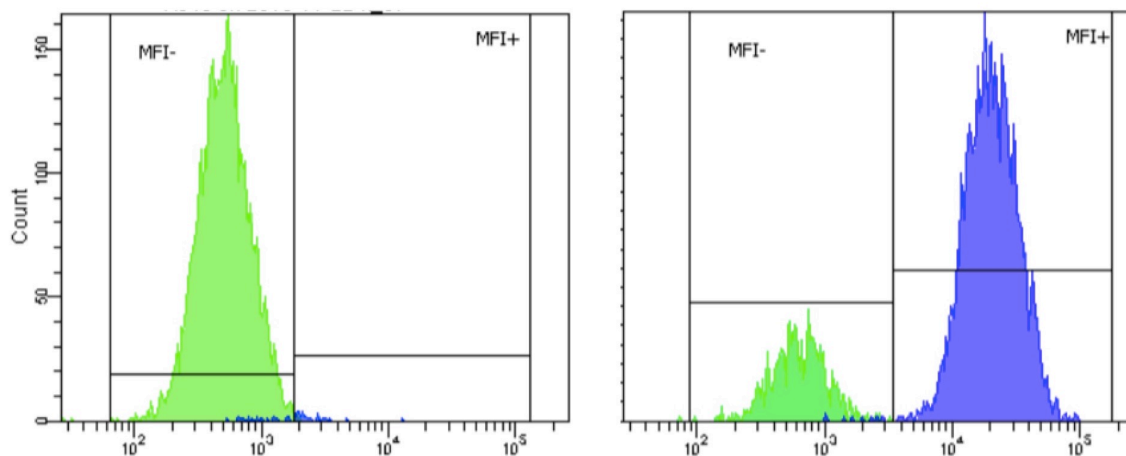
Dla ekspresji TLR3 nie udało się stworzyć modelu, który istotnie wyjaśniałby zmienność zmiennej wyjaśnianej:  $F(3;28) = 2,82$ ;  $p = 0,065$ ;  $R^2 = 0,192$ . Oznacza to, że ekspresja TLR3 pozostaje stała niezależnie od upływu czasu oraz stężenia białka SP-A.

Dla ekspresji TLR4 stworzono model, który istotnie wyjaśniał zmienność zmiennej wyjaśnianej:  $F(3;28) = 6,28$ ;  $p = 0,004$ . Skonstruowany model wyjaśniał 40,8% zmienności zmiennej wyjaśnianej, o czym świadczy wartość skorygowanego współczynnika  $R^2 = 0,408$ . Okazało się, że stężenie SP-A jest istotnym czynnikiem powiązaniem z ekspresją TLR4 – wzrost stężenia SP-A powoduje wzrost ekspresji TLR4. Efekt czasu oraz efekt interakcyjny obu zmiennych nie okazał się istotny statystycznie. Wyniki przedstawiono w Tabeli 13 i na Rysunku 22 oraz Rysunku 23.

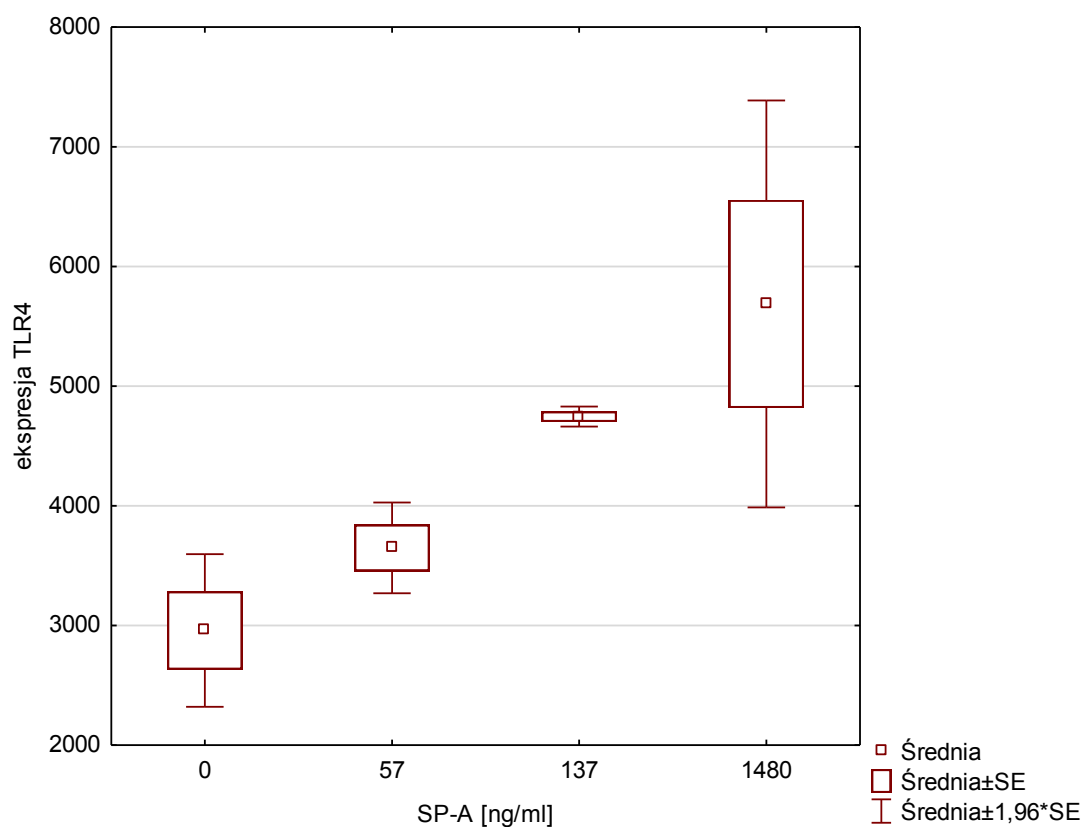
|             | <i>B</i> | <i>SE</i> | <i>t</i> | <i>p</i> | $\beta$ |
|-------------|----------|-----------|----------|----------|---------|
| TLR2        |          |           |          |          |         |
| (Stała)     | 6292,80  | 2586,70   | 2,43     | 0,024    |         |
| SP-A        | 2,13     | 3,48      | 0,61     | 0,546    | 0,278   |
| Czas        | -155,16  | 325,89    | -0,48    | 0,639    | -0,123  |
| Czas * SP-A | 0,00     | 0,44      | -0,01    | 0,994    | -0,004  |
| TLR3        |          |           |          |          |         |
| (Stała)     | 4009,95  | 465,68    | 8,61     | <0,001   |         |
| SP-A        | 0,63     | 0,63      | 1,01     | 0,324    | 0,402   |
| Czas        | -108,75  | 58,67     | -1,85    | 0,079    | -0,420  |
| Czas * SP-A | -0,03    | 0,08      | -0,38    | 0,711    | -0,157  |
| TLR4        |          |           |          |          |         |
| (Stała)     | 3683,63  | 611,67    | 6,02     | <0,001   |         |
| SP-A        | 2,81     | 0,82      | 3,41     | 0,003    | 1,162   |
| Czas        | -2,46    | 77,06     | -0,03    | 0,975    | -0,006  |
| Czas * SP-A | -0,20    | 0,10      | -1,92    | 0,070    | -0,685  |

*B* – współczynnik regresji; *SE* - błąd standardowy; *t* – statystyka testu; *p* – poziom istotności;  $\beta$  – wystandaryzowany współczynnik regresji

Tabela 13. Współczynniki analizy regresji przewidującej wpływ białka SP-A i czasu na ekspresję TLR2, TLR3 i TLR4 w linii komórkowej A549.



Rycina 22. Ekspresja TLR4 na komórkach linii A549.



Rycina 23. Ekspresja TLR4 w komórkach linii A549 w zależności od stężenia białka SP-A.

## 2.2. Linia Calu-3

W następnej kolejności postanowiono odpowiedzieć na pytanie, czy białko SP-A wpływa na ekspresję TLR2, TLR3 i TLR4 w linii komórkowej Calu-3. W tym celu wykonano szereg analiz czynnikowej regresji wielorakiej. Jako zmienne wyjaśniane wprowadzono kolejno ekspresję receptorów TLR2, TLR3 i TLR4. Jako zmienne wyjaśniające uwzględniono stężenie białka SP-A (w ng/ml) oraz czas w godzinach.

Dla ekspresji TLR2 nie udało się stworzyć modelu, który istotnie wyjaśniałby zmienność zmiennej wyjaśnianej:  $F(3;28) = 0,35$ ;  $p = 0,790$ ;  $R^2 = -0,093$ . Oznacza to, że ekspresja TLR2 pozostaje stała niezależnie od upływu czasu oraz stężenia białka SP-A.

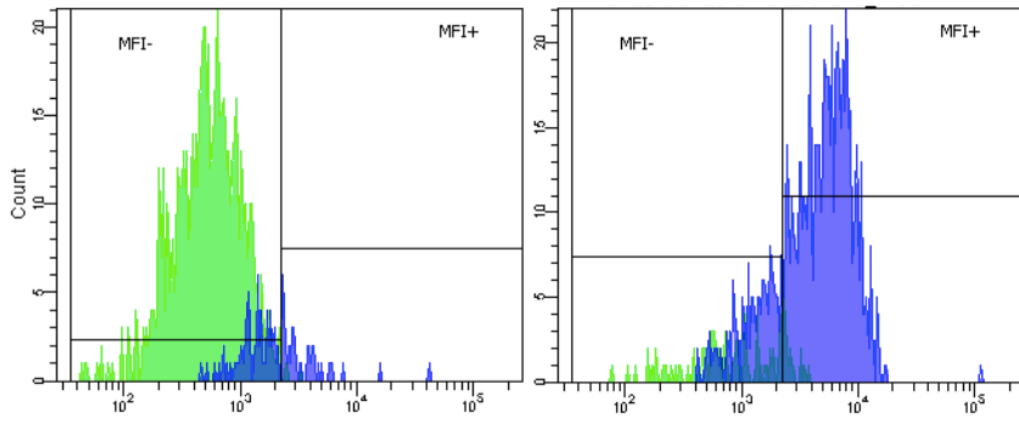
Dla ekspresji TLR3 nie udało się stworzyć modelu, który istotnie wyjaśniałby zmienność zmiennej wyjaśnianej:  $F(3;28) = 2,67$ ;  $p = 0,076$ ;  $R^2 = 0,179$ . Oznacza to, że ekspresja TLR3 pozostaje stała niezależnie od upływu czasu oraz stężenia białka SP-A.

Dla ekspresji TLR4 stworzono model, który istotnie wyjaśniał zmienność zmiennej wyjaśnianej:  $F(3;28) = 4,10$ ;  $p = 0,020$ . Skonstruowany model wyjaśniał 28,8% zmienności zmiennej wyjaśnianej, o czym świadczy wartość skorygowanego współczynnika  $R^2 = 0,288$ . Okazało się, że stężenie SP-A jest istotnym czynnikiem powiązaniem z ekspresją TLR4 – wzrost stężenia SP-A powoduje wzrost ekspresji TLR4. Efekt czasu oraz efekt interakcyjny obu zmiennych nie okazał się istotny statystycznie. Wyniki przedstawiono w Tabeli nr 14 i na Rysunku nr 24 i 25.

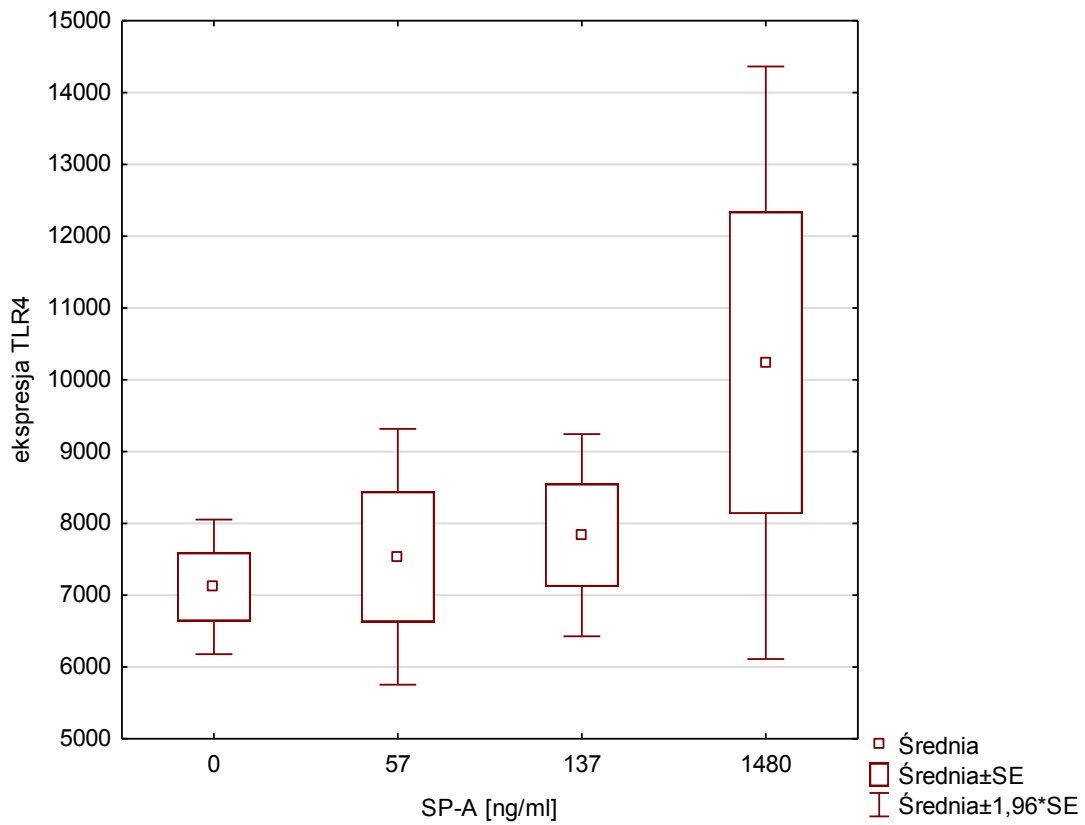
|             | <i>B</i> | <i>SE</i> | <i>t</i> | <i>p</i> | $\beta$ |
|-------------|----------|-----------|----------|----------|---------|
| TLR2        |          |           |          |          |         |
| (Stała)     | 6476,14  | 824,67    | 7,85     | <0,001   |         |
| SP-A        | -0,38    | 1,11      | -0,34    | 0,737    | -0,157  |
| Czas        | 45,99    | 103,90    | 0,44     | 0,663    | 0,117   |
| Czas * SP-A | 0,07     | 0,14      | 0,50     | 0,626    | 0,241   |
| TLR3        |          |           |          |          |         |
| (Stała)     | 5908,65  | 632,03    | 9,35     | <0,001   |         |
| SP-A        | -0,11    | 0,85      | -0,13    | 0,896    | -0,053  |
| Czas        | 52,13    | 79,63     | 0,65     | 0,520    | 0,150   |
| Czas * SP-A | 0,13     | 0,11      | 1,21     | 0,241    | 0,509   |
| TLR4        |          |           |          |          |         |
| (Stała)     | 8225,56  | 1352,93   | 6,08     | <0,001   |         |
| SP-A        | 4,70     | 1,82      | 2,58     | 0,018    | 0,965   |
| Czas        | -123,38  | 170,45    | -0,72    | 0,478    | -0,154  |
| Czas * SP-A | -0,39    | 0,23      | -1,71    | 0,103    | -0,670  |

*B* – współczynnik regresji; *SE* - błąd standardowy; *t* – statystyka testu; *p* – poziom istotności;  $\beta$  – wystandaryzowany współczynnik regresji

Tabela 14. Współczynniki analizy regresji przewidującej wpływ białka SP-A i czasu na ekspresję TLR2, TLR3 i TLR4 w linii komórkowej Calu-3.



Rycina 24. Ekspresja TLR4 w komórkach linii Calu-3.



Rycina 25. Ekspresja TLR4 w komórkach linii Calu-3 w zależności od stężenia białka SP-A.

### 2.3. Linia CCD-39Lu

W następnej kolejności postanowiono odpowiedzieć na pytanie, czy białko SP-A wpływa na ekspresję TLR2, TLR3 i TLR4 w linii komórkowej CCD-39Lu. W tym celu wykonano szereg analiz czynnikowej regresji wielorakiej. Jako zmienne wyjaśniane wprowadzono kolejno ekspresję receptorów TLR2, TLR3 i TLR4. Jako zmienne wyjaśniające uwzględniono stężenie białka SP-A (w ng/ml) oraz czas w godzinach.

Dla ekspresji TLR2 stworzono model, który istotnie wyjaśniał zmienność zmiennej wyjaśnianej:  $F(3;28) = 5,12$ ;  $p = 0,009$ . Skonstruowany model wyjaśniał 35,0% zmienności zmiennej wyjaśnianej, o czym świadczy wartość skorygowanego współczynnika  $R^2 = 0,350$ . Okazało się, że SP-A jest istotnym czynnikiem powiązaniem z ekspresją TLR2. Efekt interakcyjny obu zmiennych również okazał się istotny statystycznie. Oznacza to, że w miarę upływu czasu zmniejsza się wpływ SP-A polegający na zmniejszeniu ekspresji TLR2.

Dla ekspresji TLR3 stworzono model, który istotnie wyjaśniał zmienność zmiennej wyjaśnianej:  $F(3;28) = 6,87$ ;  $p = 0,002$ . Skonstruowany model wyjaśniał 43,4% zmienności zmiennej wyjaśnianej, o czym świadczy wartość skorygowanego współczynnika  $R^2 = 0,434$ . Okazało się, że stężenie SP-A jest istotnym czynnikiem powiązaniem z ekspresją TLR3 – wzrost stężenia SP-A powoduje wzrost ekspresji TLR3. Efekt czasu oraz efekt interakcyjny obu zmiennych nie okazał się istotny statystycznie.

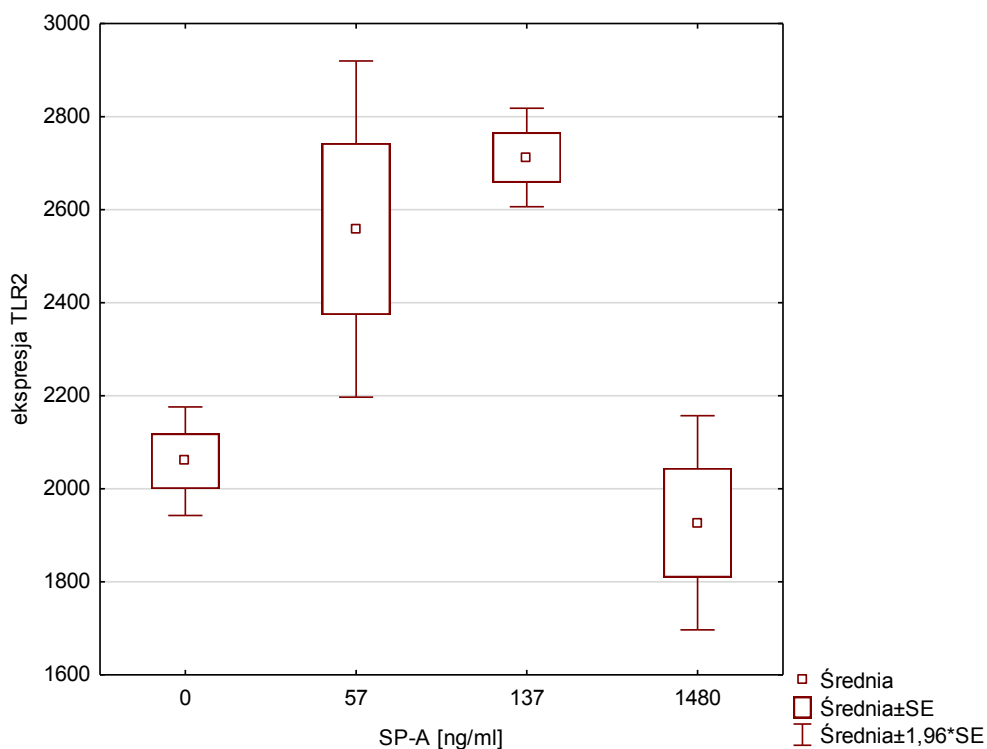
Dla ekspresji TLR4 nie udało się stworzyć modelu, który istotnie wyjaśniałby zmienność zmiennej wyjaśnianej:  $F(3;28) = 0,11$ ;  $p = 0,951$ ;  $R^2 = -0,131$ . Oznacza to, że ekspresja TLR4 pozostaje stała niezależnie od upływu czasu oraz stężenia białka SP-A. Wyniki przedstawiono w Tabeli nr 15 i na Rysunkach nr 26 i 27.

|             | <i>B</i> | <i>SE</i> | <i>t</i> | <i>p</i> | $\beta$ |
|-------------|----------|-----------|----------|----------|---------|
| TLR2        |          |           |          |          |         |
| (Stała)     | 2779,64  | 181,05    | 15,35    | <0,001   |         |
| SP-A        | -0,87    | 0,24      | -3,59    | 0,002    | -1,281  |
| Czas        | -46,53   | 22,81     | -2,04    | 0,055    | -0,415  |
| Czas * SP-A | 0,08     | 0,03      | 2,52     | 0,020    | 0,943   |
| TLR3        |          |           |          |          |         |
| (Stała)     | 2796,08  | 200,88    | 13,92    | <0,001   |         |
| SP-A        | 0,66     | 0,27      | 2,46     | 0,023    | 0,818   |
| Czas        | -46,29   | 25,31     | -1,83    | 0,082    | -0,347  |
| Czas * SP-A | -0,03    | 0,03      | -0,99    | 0,332    | -0,347  |
| TLR4        |          |           |          |          |         |
| (Stała)     | 2245,35  | 189,63    | 11,84    | <0,001   |         |
| SP-A        | 0,01     | 0,26      | 0,02     | 0,981    | 0,011   |
| Czas        | -2,61    | 23,89     | -0,11    | 0,914    | -0,029  |
| Czas * SP-A | 0,01     | 0,03      | 0,25     | 0,803    | 0,125   |

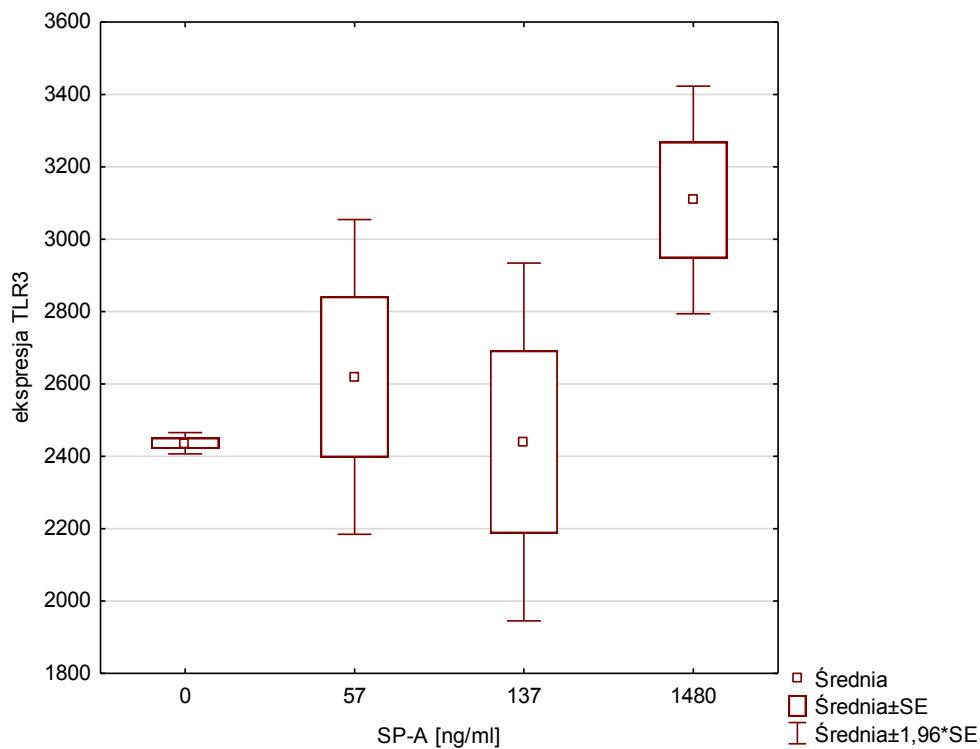
*B* – współczynnik regresji; *SE* - błąd standardowy; *t* – statystyka testu; *p* – poziom istotności;  $\beta$  – wystandaryzowany współczynnik regresji

Tabela 15. Współczynniki analizy regresji przewidującej wpływ białka SP-A i czasu na ekspresję TLR2, TLR3 i TLR4 w linii komórkowej CCD-39Lu





Rycina 26. Ekspresja TLR2 w komórkach linii CCD-39Lu w zależności od stężenia białka SP- A.

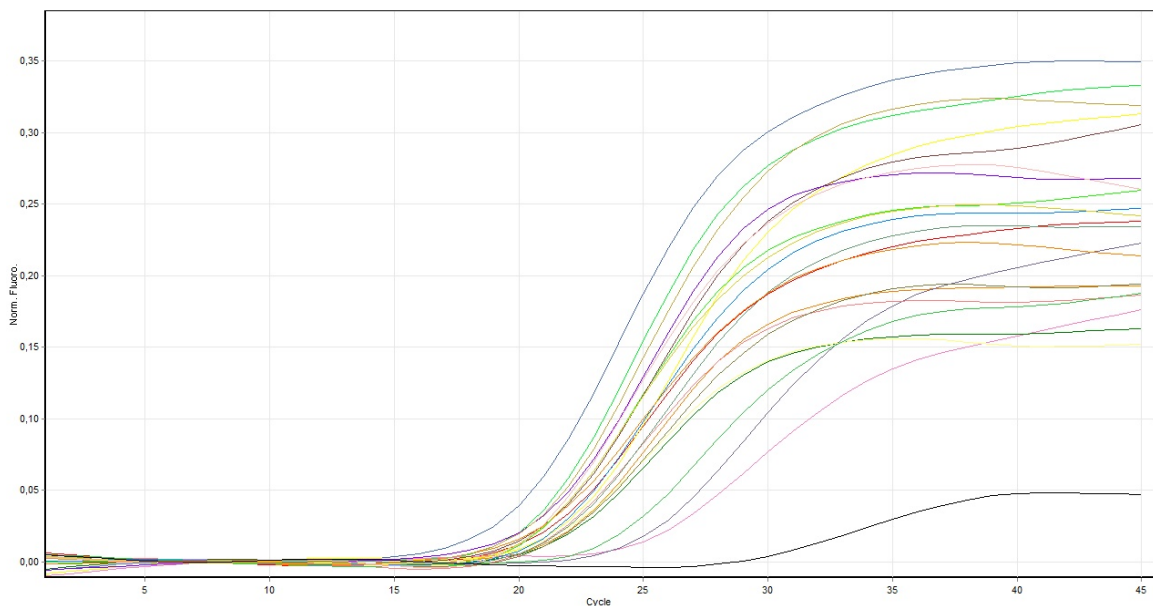


Rycina 27. Ekspresja TLR3 w komórkach linii CCD-39Lu w zależności od stężenia białka SP-A.

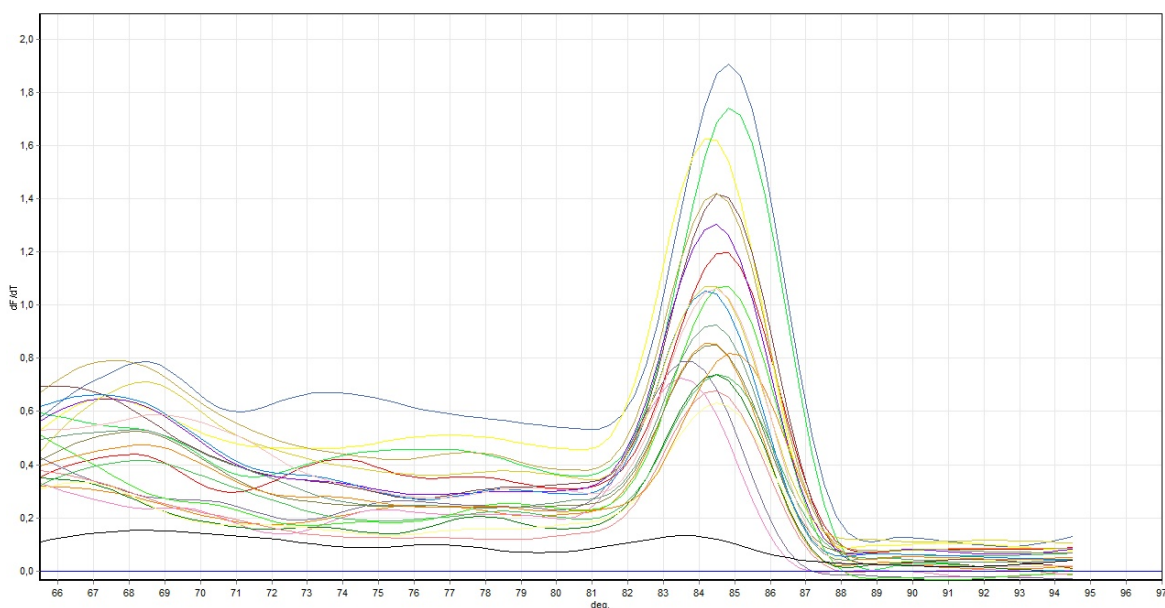
### 3. Poziom transkryptu wybranych genów linii A549

#### 3.1. PBGD

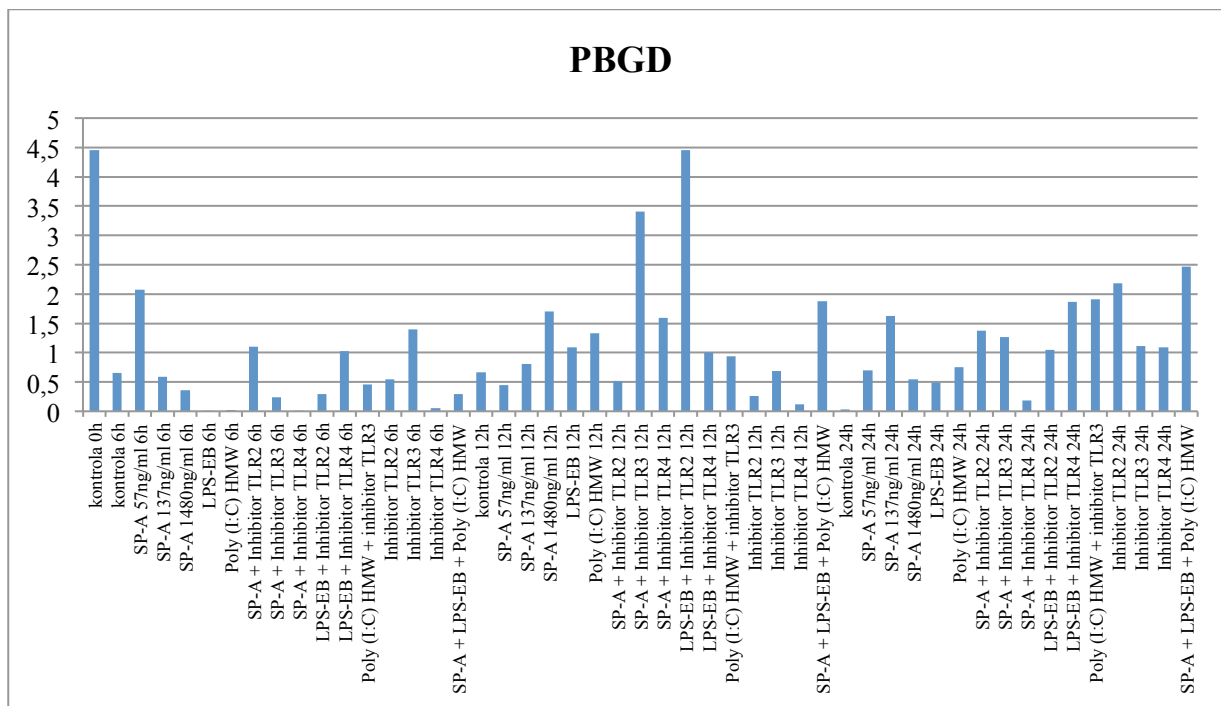
Reakcja qRT-PCR wykazała obecność genu referencyjnego PBGD we wszystkich badanych próbkach (Ryc.28-29). Ekspresja genu PBGD wykazywała różne wartości dla poszczególnych próbek (Ryc.30).



Rycina 28. Obraz reakcji qRT-PCR, krzywe amplifikacji genu PBGD wraz z kontrolą negatywną.



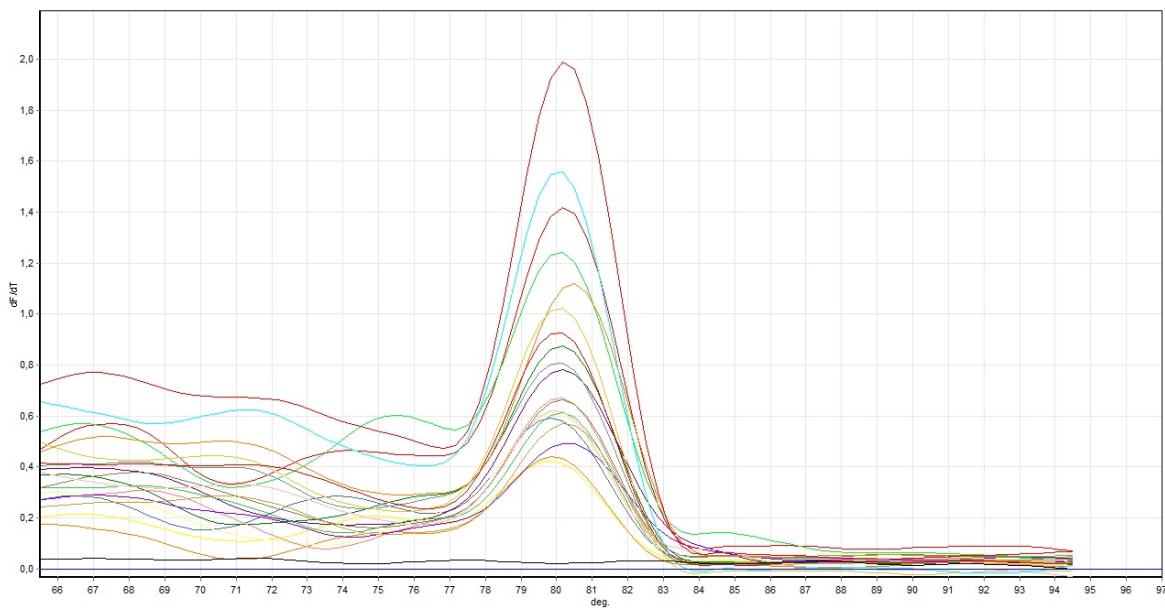
Rycina 29. Obraz reakcji qRT-PCR, krzywe topnienia genu PBGD wraz z kontrolą negatywną.



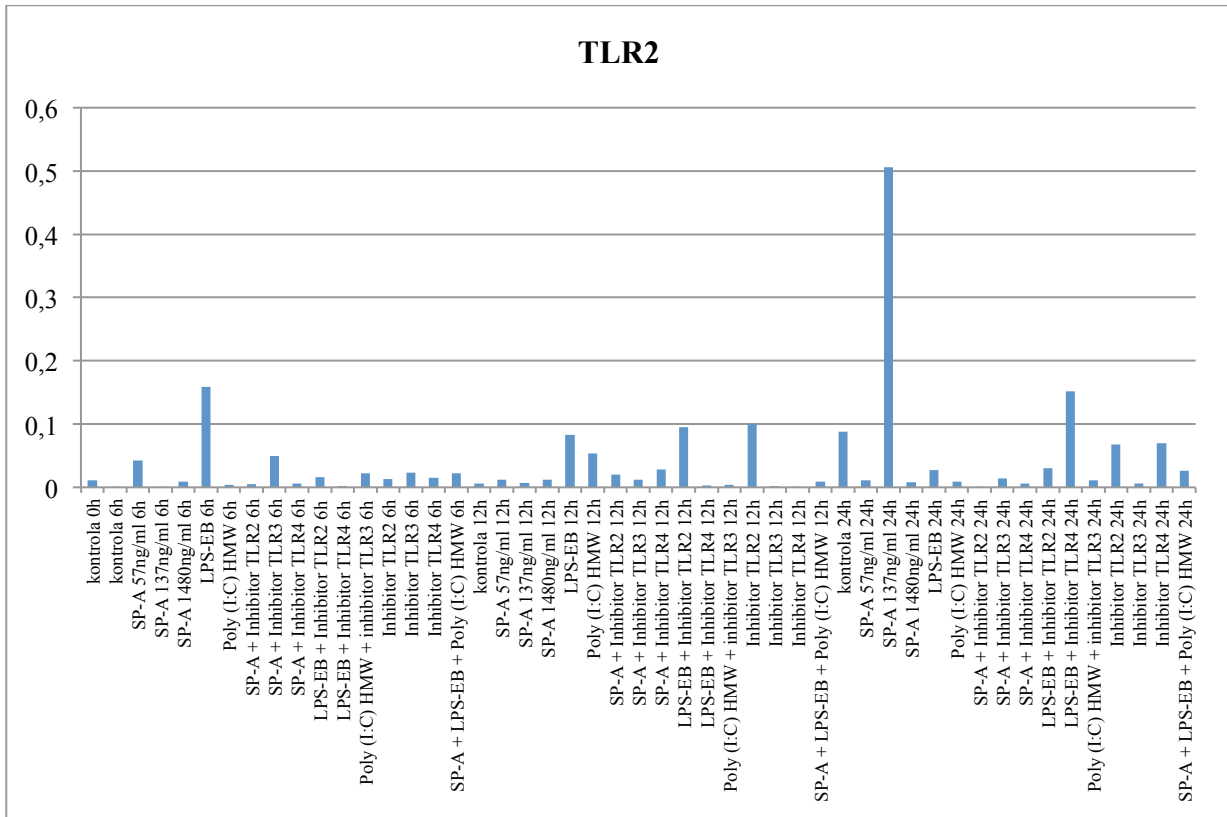
Rycina 30. Ekspresja genu PBGD (obliczone stężenie – kopie/reakcja).

### 3.2. TLR2

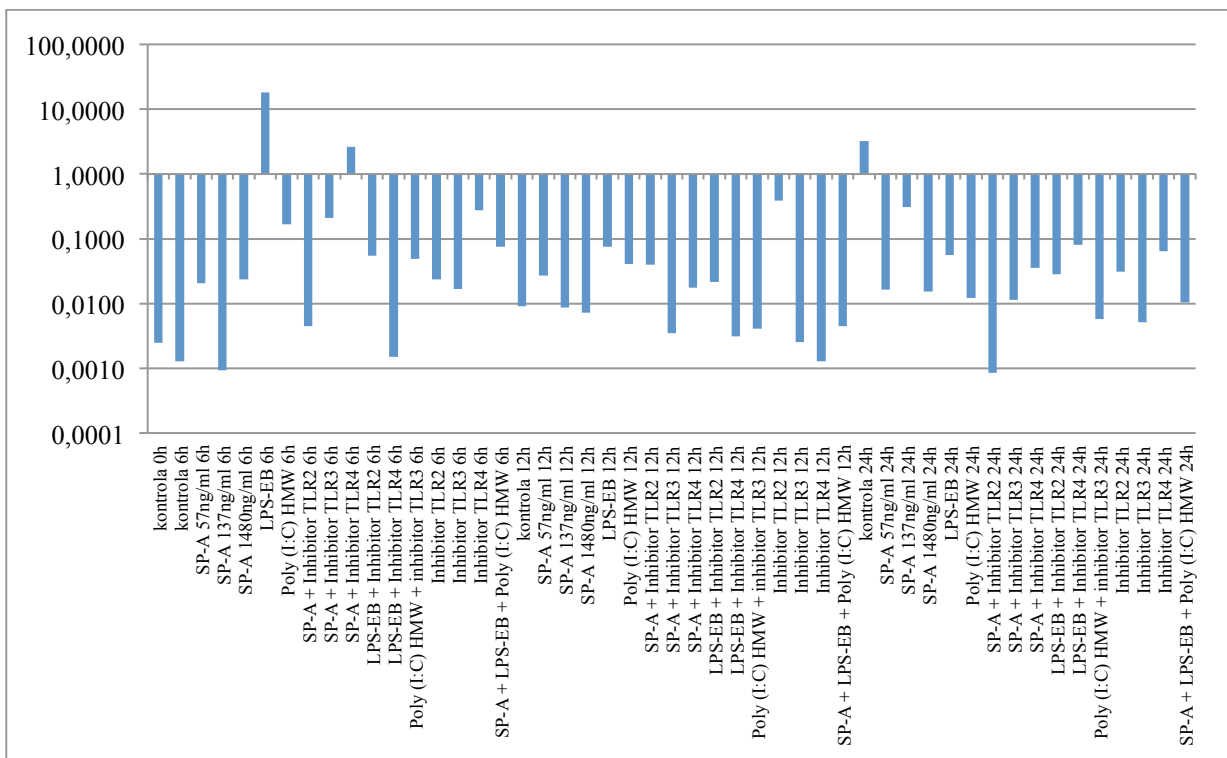
Reakcja qRT-PCR wykazała obecność genu TLR2 we wszystkich badanych próbkach (Ryc.31). Ekspresja genu TLR2 wykazywała różne wartości dla poszczególnych próbek (Ryc.32). W odniesieniu do genu referencyjnego 3 próby wykazywały większą względną ekspresję. Próby z dodatkiem samego SP-A wykazywały niższą ekspresję niż ekspresja genu referencyjnego (Ryc.33).



Rycina 31. Obraz reakcji qRT-PCR, krzywe topnienia genu TLR2 wraz z kontrolą negatywną.



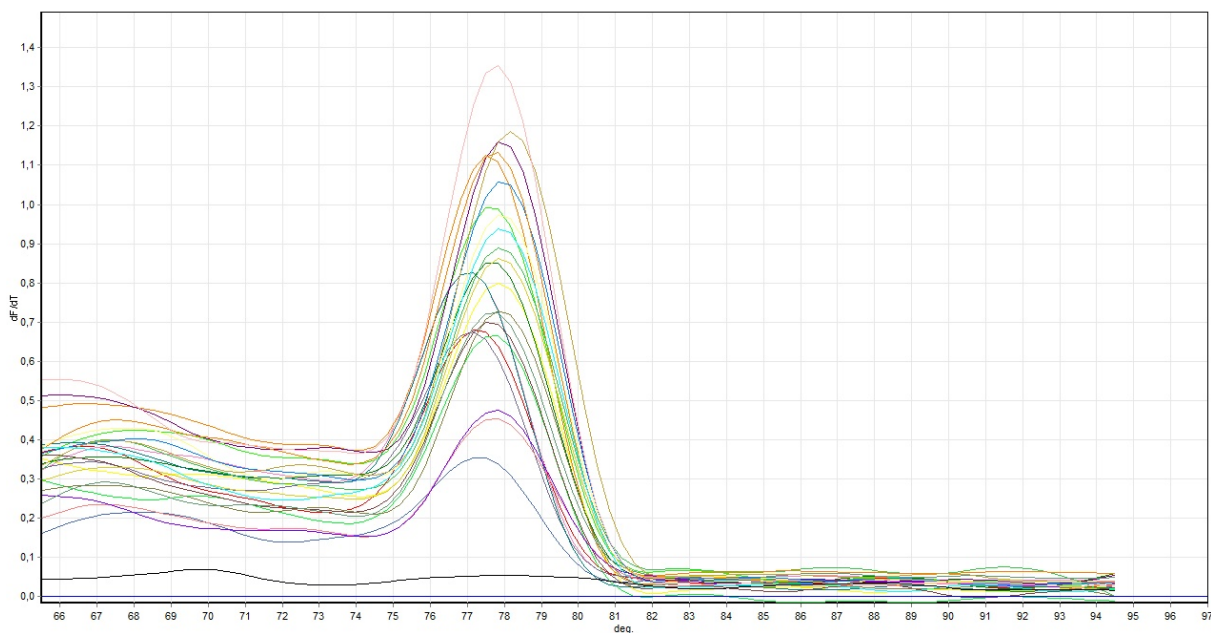
Rycina 32. Ekspresja genu TLR2 (obliczone stężenie – kopie/reakcja).



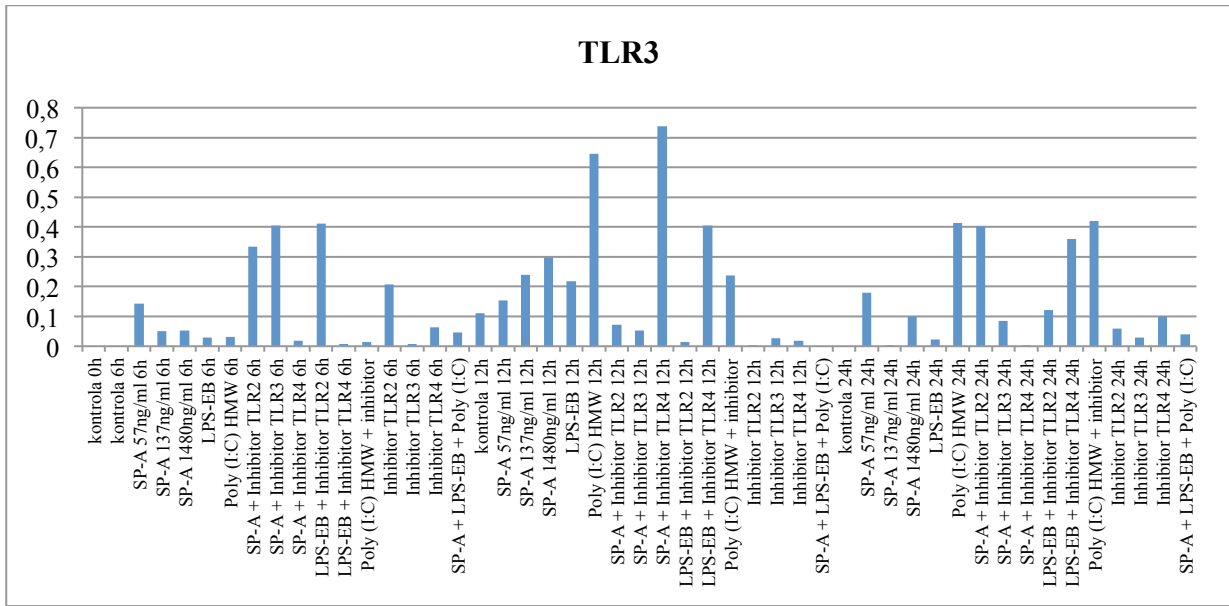
Rycina 33. Względna ekspresja genu TLR2 (względem genu PBGD).

### 3.3. TLR3

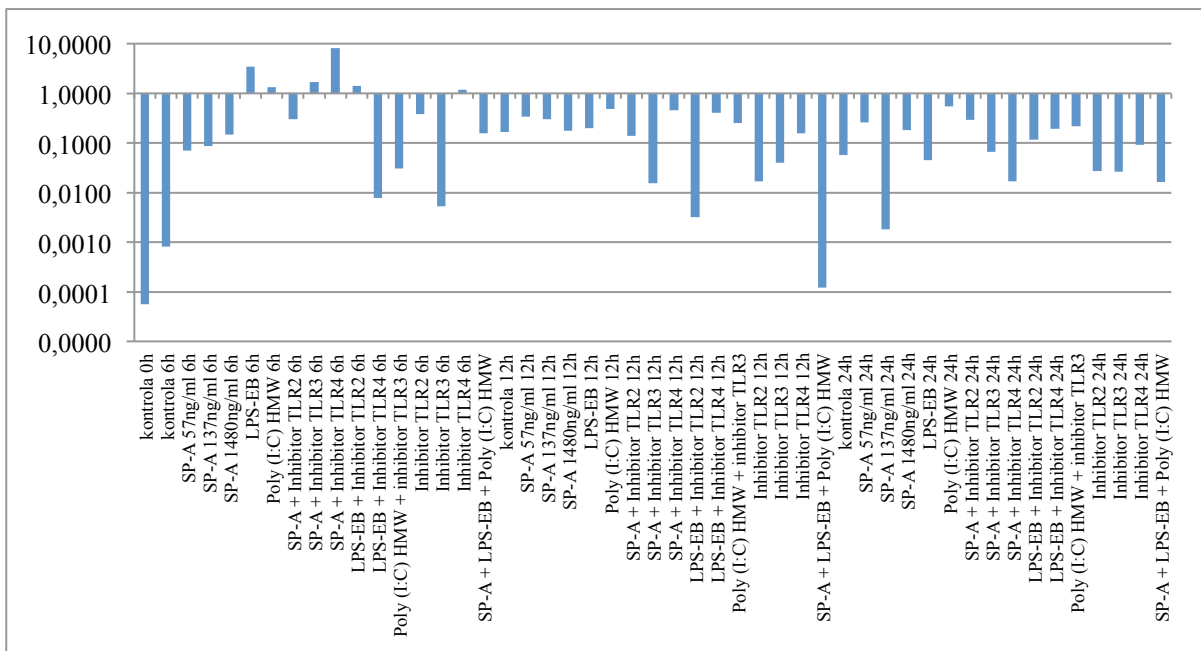
Reakcja qRT-PCR wykazała obecność genu TLR3 we wszystkich badanych próbkach (Ryc.34). Ekspresja genu TLR3 wykazywała różne wartości dla poszczególnych próbek (Ryc.35). W odniesieniu do genu referencyjnego 6 prób wykazywało większą względną ekspresję. Próby z dodatkiem samego SP-A wykazywały niższą ekspresję niż ekspresja genu referencyjnego (Ryc.36).



Rycina 34. Obraz reakcji qRT-PCR, krzywe topnienia genu TLR3 wraz z kontrolą negatywną.



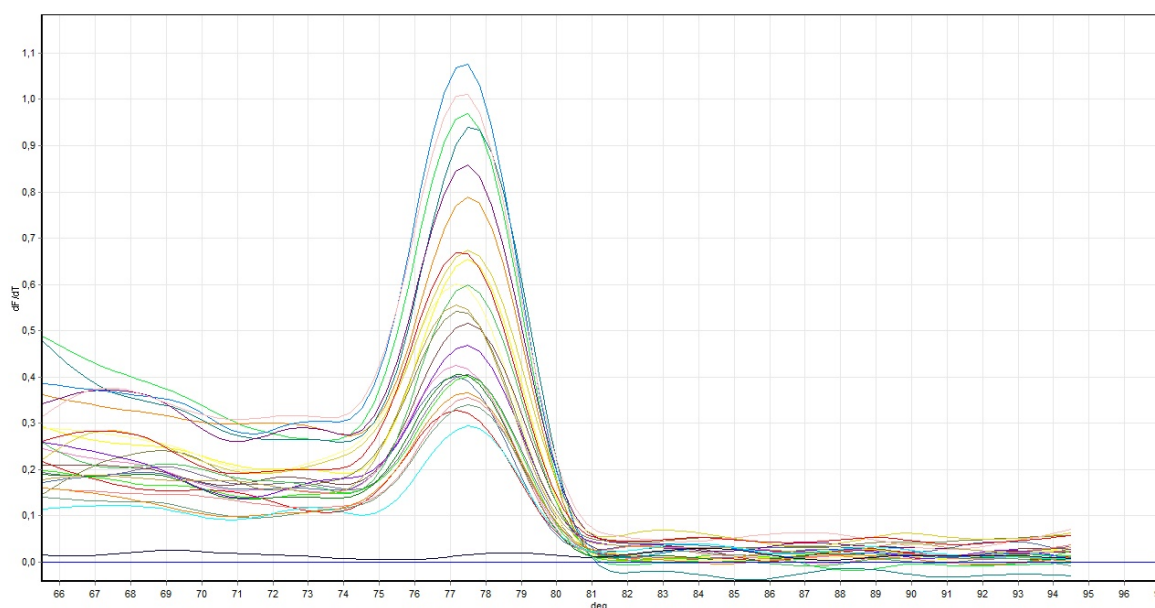
Rycina 35. Ekspresja genu TLR3 (obliczone stężenie – kopia/reakcja).



Rycina 36. Względna ekspresja genu TLR3 (względem genu PBGD).

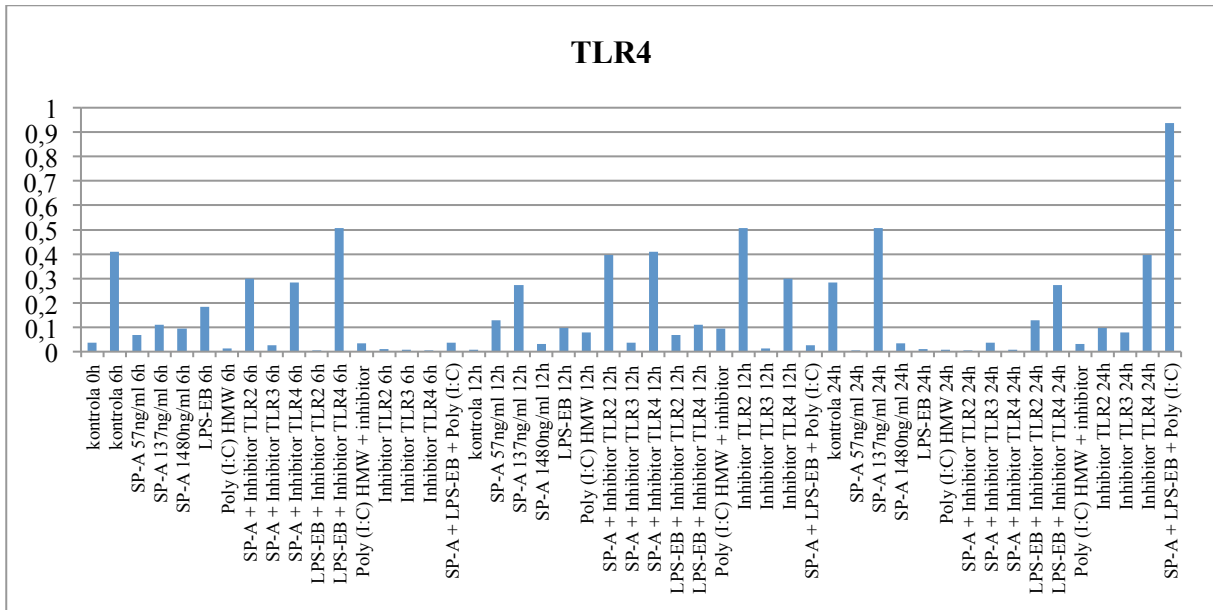
### 3.4. TLR4

Reakcja qRT-PCR wykazała obecność genu TLR4 we wszystkich badanych próbkach (Ryc.37). Ekspresja genu TLR4 wykazywała różne wartości dla poszczególnych próbek (Ryc.38). W odniesieniu do genu referencyjnego 5 prób wykazywało większą względną ekspresję. Próby z dodatkiem samego SP-A wykazywały niższą ekspresję niż ekspresja genu referencyjnego (Ryc.39).

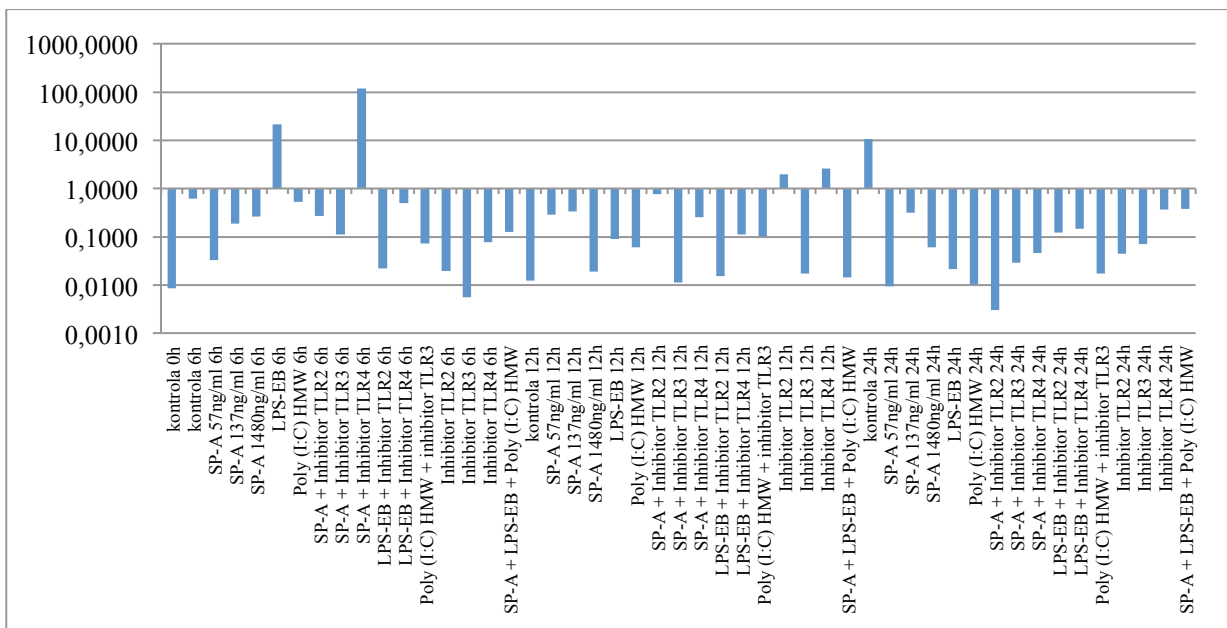


Rycina 37. Obraz reakcji qRT-PCR, krzywe topnienia genu TLR4 wraz z kontrolą negatywną.





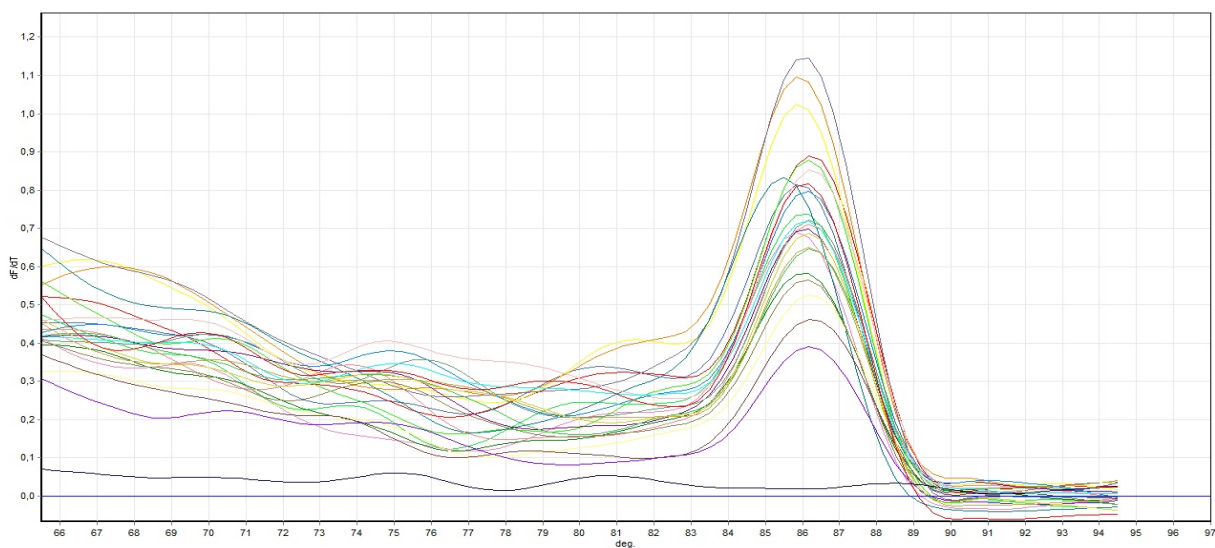
Rycina 38. Ekspresja genu TLR4 (obliczone stężenie – kopie/reakcja).



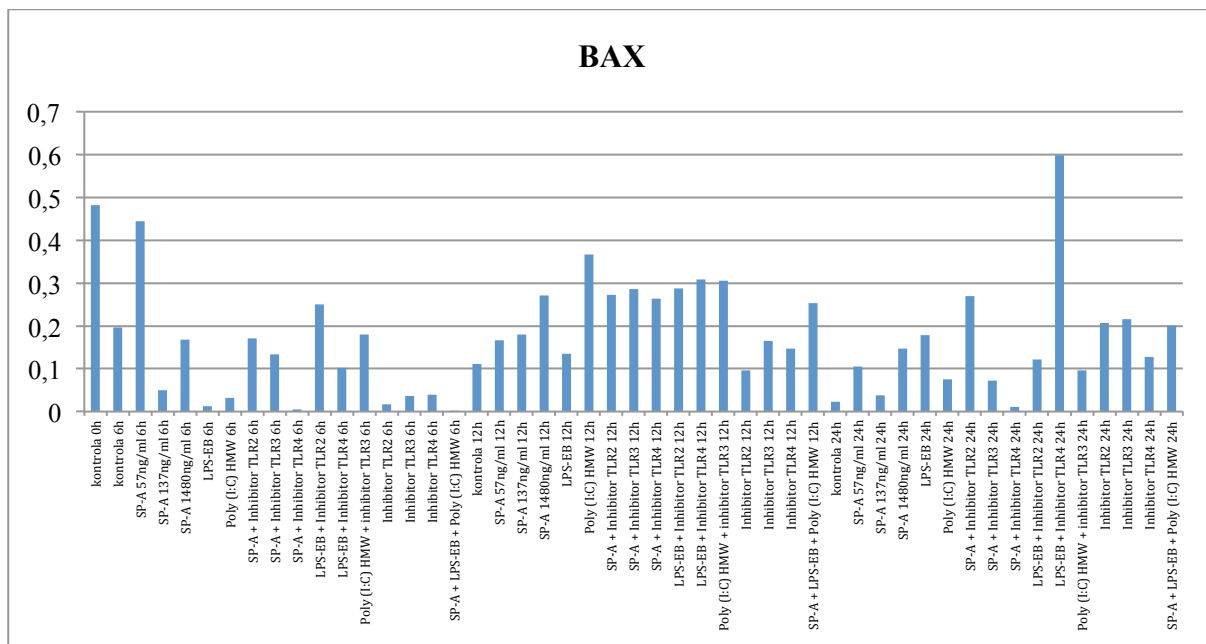
Rycina 39. Względna ekspresja genu TLR4 (względem genu PBGD).

### 3.5. BAX

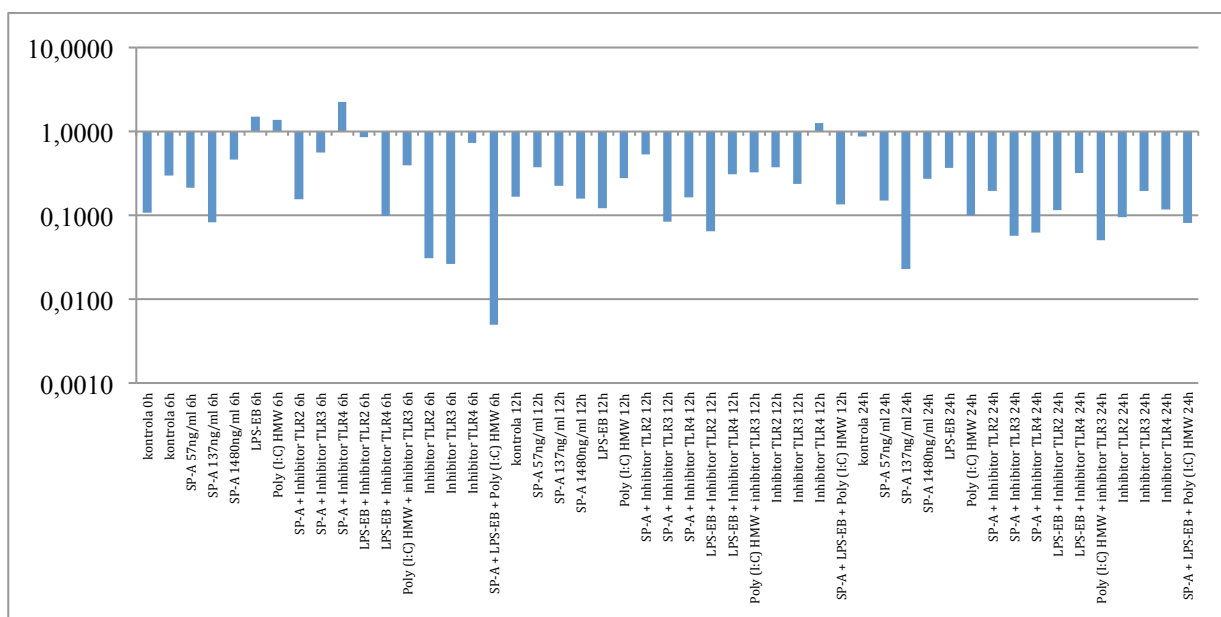
Reakcja qRT-PCR wykazała obecność genu BAX we wszystkich badanych próbkach (Ryc.40). Ekspresja genu BAX wykazywała różne wartości dla poszczególnych próbek (Ryc.41). W odniesieniu do genu referencyjnego 4 próby wykazywały większą względną ekspresję. Próby z dodatkiem samego SP-A wykazywały niższą ekspresję niż ekspresja genu referencyjnego (Ryc.42).



Rycina 40. Obraz reakcji qRT-PCR, krzywe topnienia genu BAX wraz z kontrolą negatywną.



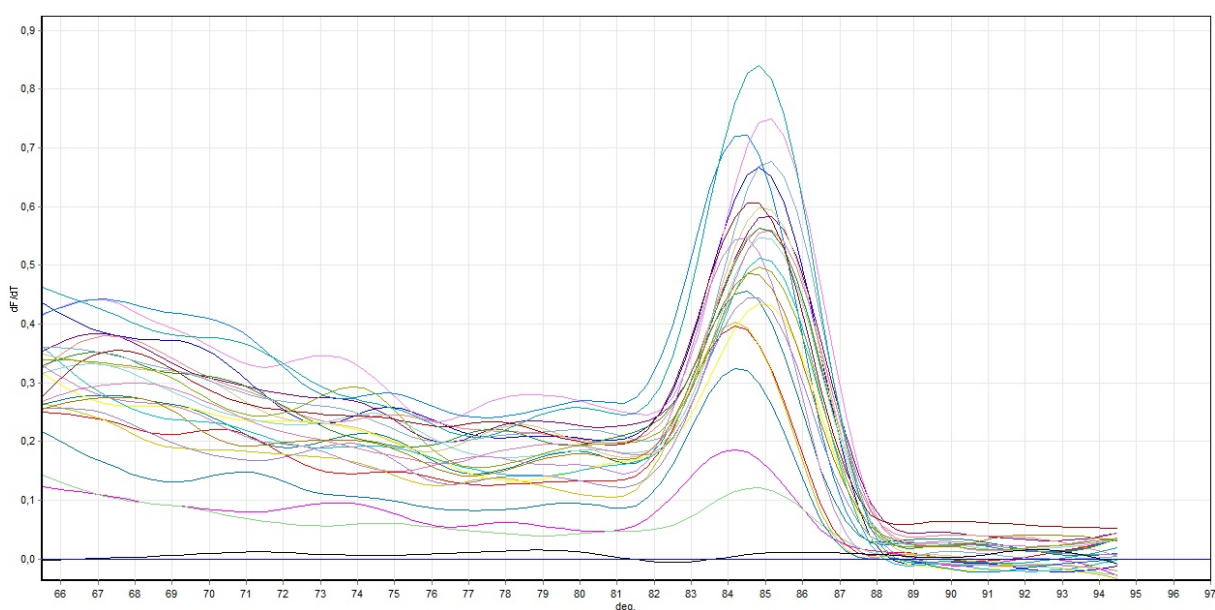
Rycina 41. Ekspresja genu BAX (obliczone stężenie – kopie/reakcja).



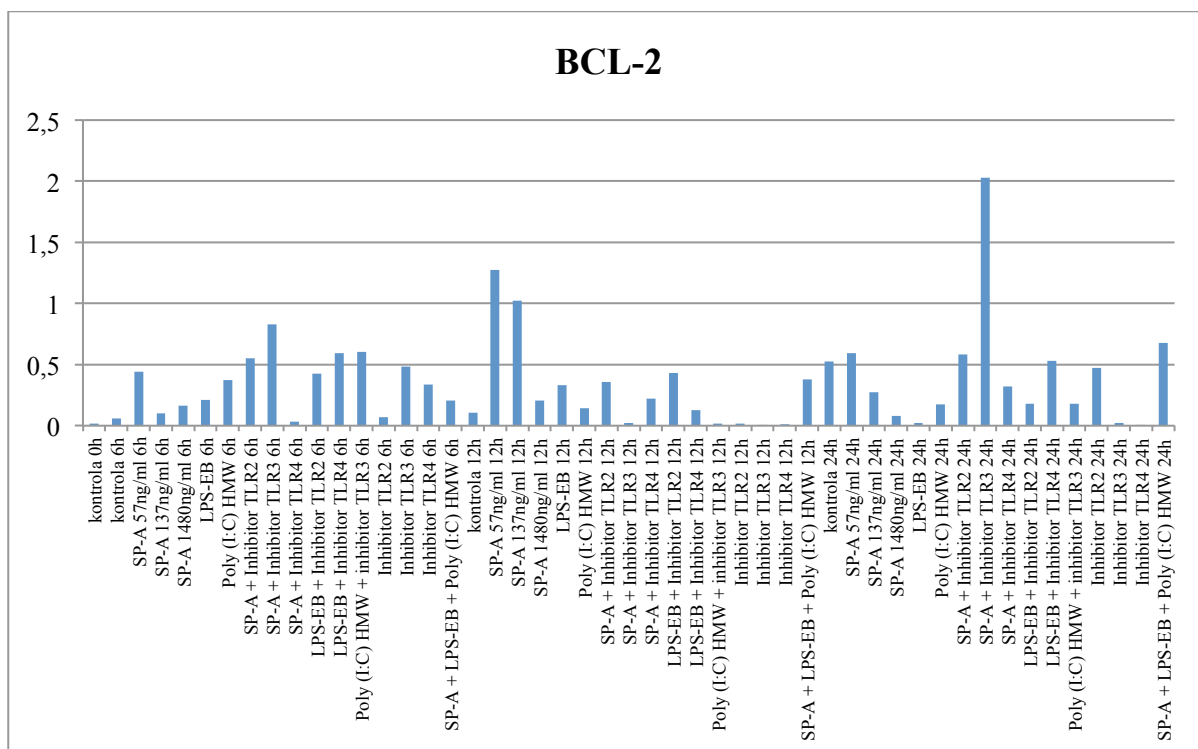
Rycina 42. Względna ekspresja genu BAX (względem genu PBGD).

### 3.6. BCL-2

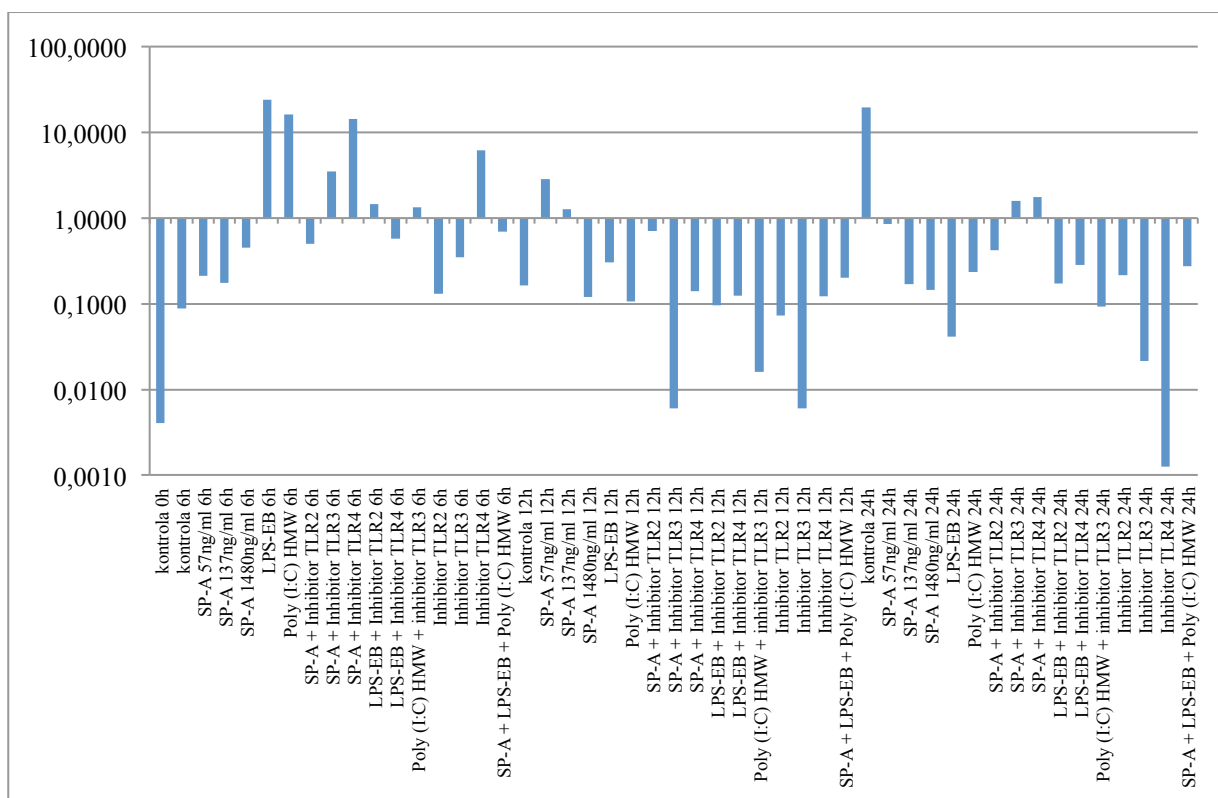
Reakcja qRT-PCR wykazała obecność genu BCL-2 we wszystkich badanych próbkach (Ryc.43). Ekspresja genu BCL2 wykazywała różne wartości dla poszczególnych próbek (Ryc.44). W odniesieniu do genu referencyjnego 12 prób wykazywało większą względną ekspresję. Próby z dodatkiem samego SP-A w stężeniu 57 i 137ng/ml w 12 godzinie eksperymentu wykazały wyższą ekspresję niż próba kontrolna oraz ekspresja genu referencyjnego (Ryc.45).



Rycina 43. Obraz reakcji qRT-PCR, krzywe topnienia genu BCL-2 wraz z kontrolą negatywną.



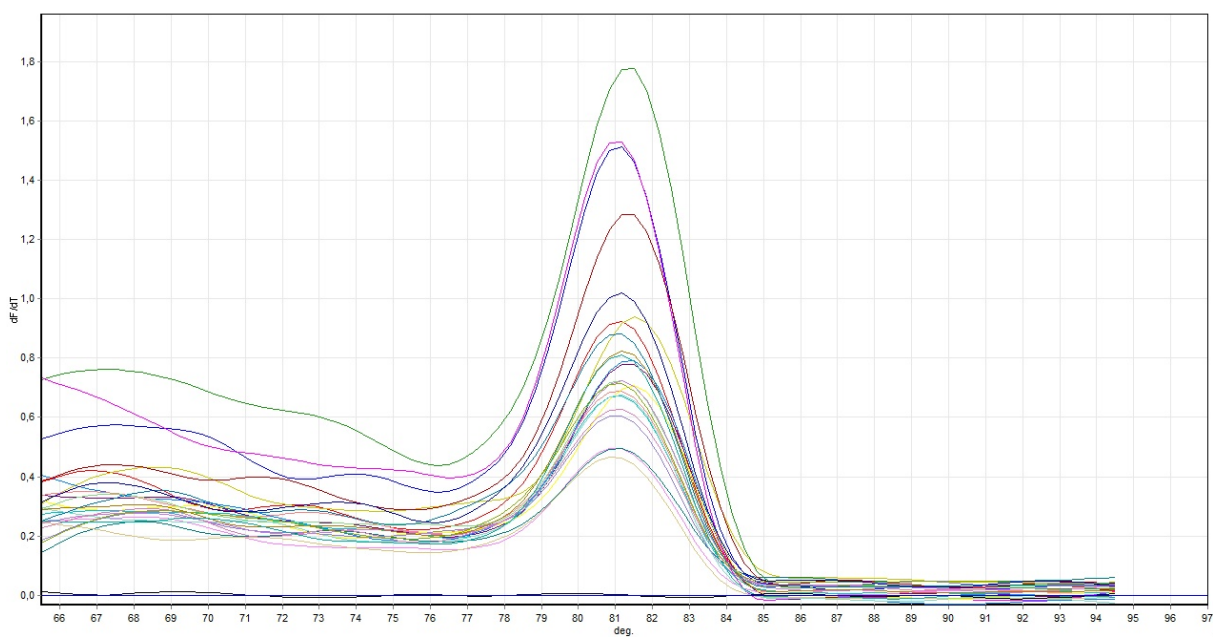
Rycina 44. Ekspresja genu BCL-2 (obliczone stężenie – kopie/reakcja).



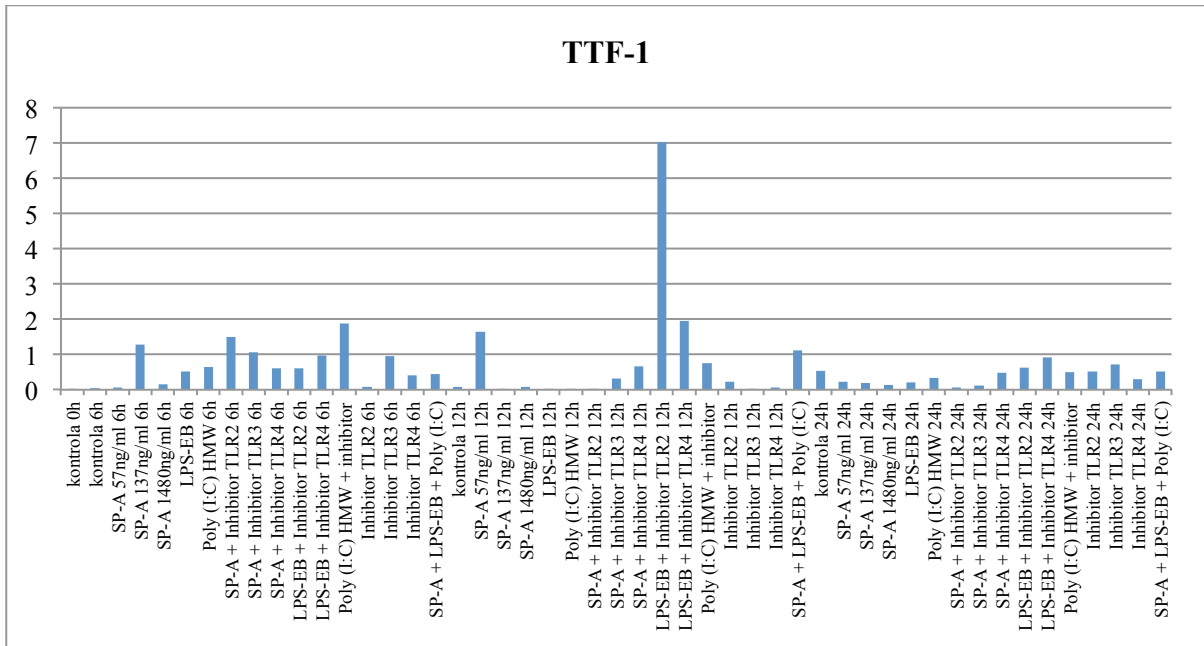
Rycina 45. Względna ekspresja genu BCL-2 (względem genu PBGD).

### 3.7. TTF-1

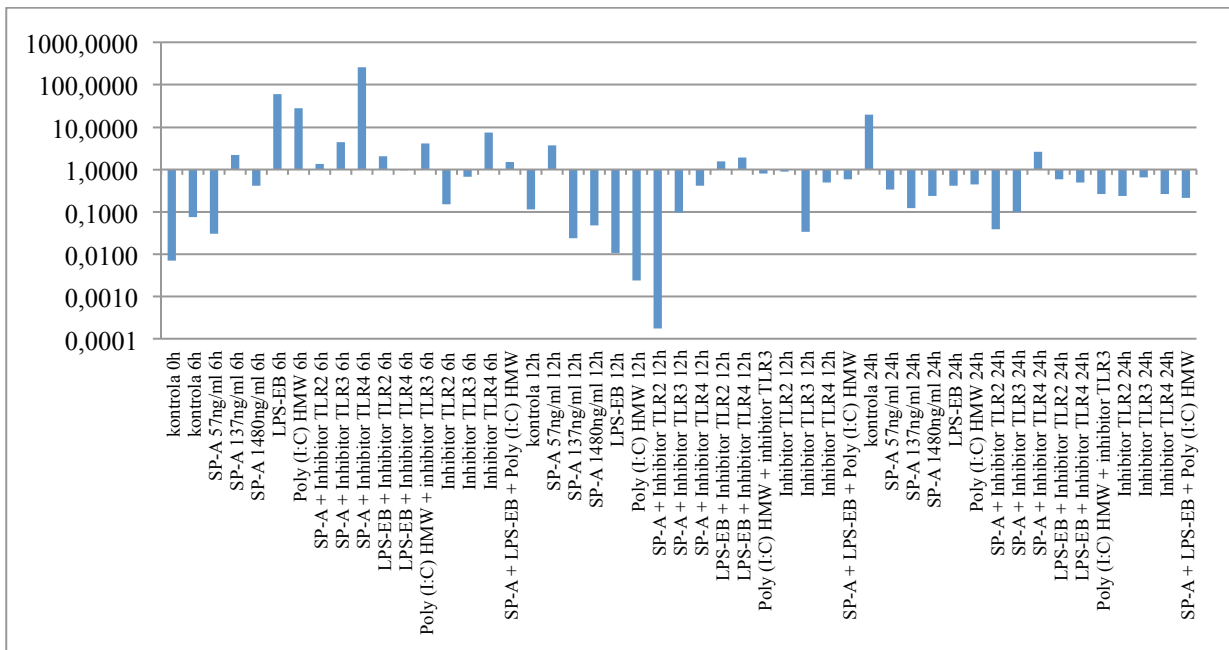
Reakcja qRT-PCR wykazała obecność genu TTF-1 we wszystkich badanych próbkach (Ryc.46). Ekspresja genu TTF-1 wykazywała różne wartości dla poszczególnych próbek (Ryc.47). W odniesieniu do genu referencyjnego 15 prób wykazywało większą względną ekspresję. Próba z dodatkiem samego SP-A w stężeniu 137ng/ml w 6 godzinie eksperymentu wykazała wyższą ekspresję niż próba kontrolna oraz ekspresja genu referencyjnego. Również próba z dodatkiem samego SP-A w stężeniu 57ng/ml w 12 godzinie eksperymentu wykazała wyższą ekspresję niż próba kontrolna oraz ekspresja genu referencyjnego (Ryc.48).



Rycina 46. Obraz reakcji qRT-PCR, krzywe topnienia genu TTF-1 wraz z kontrolą negatywną.



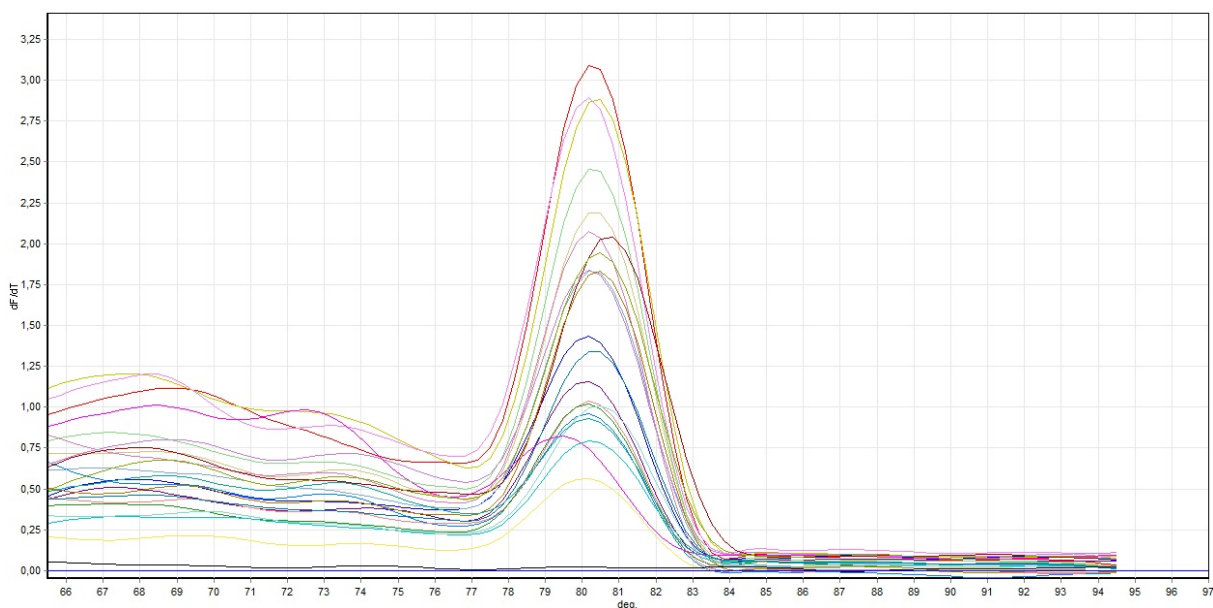
Rycina 47. Ekspresja genu TTF-1 (obliczone stężenie – kopie/reakcja)



Rycina 48. Względna ekspresja genu TTF-1 (względem genu PBGD)

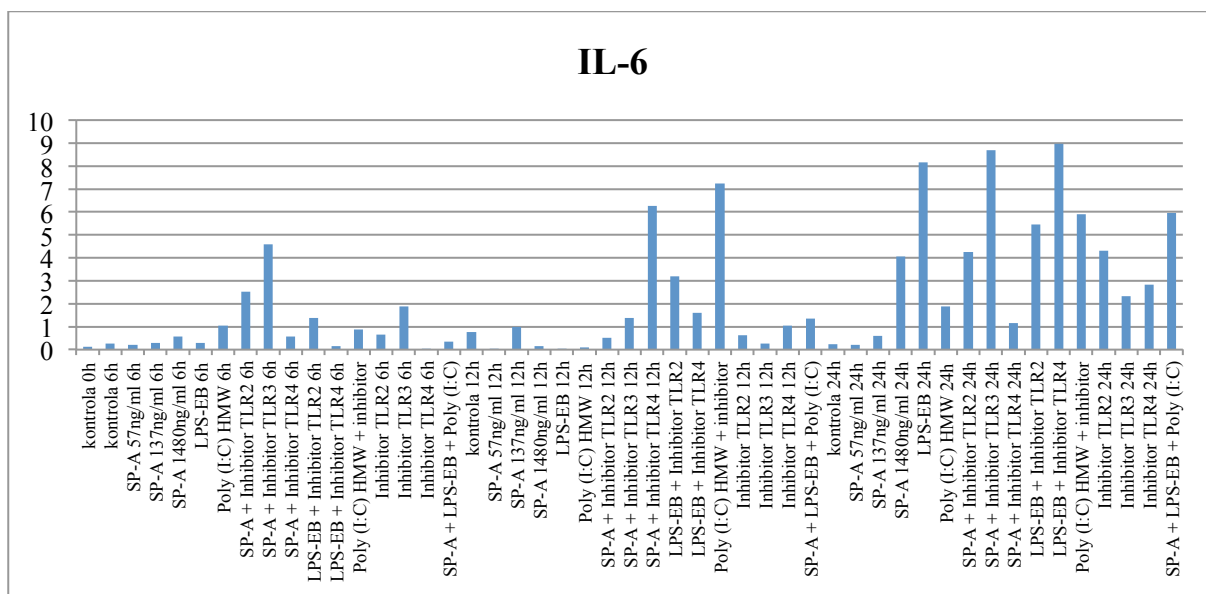
### 3.8. IL-6

Reakcja qRT-PCR wykazała obecność genu IL-6 we wszystkich badanych próbkach (Ryc.49). Ekspresja genu IL-6 wykazywała różne wartości dla poszczególnych próbek (Ryc.50). W odniesieniu do genu referencyjnego 32 próby wykazały większą względną ekspresję. Próba z dodatkiem samego SP-A w stężeniu 1480 ng/ml w 24 godzinie eksperymentu wykazała znacząco wyższą ekspresję niż w godzinie 6 i 12 oraz wyższą niż próba kontrolna (Ryc.51).

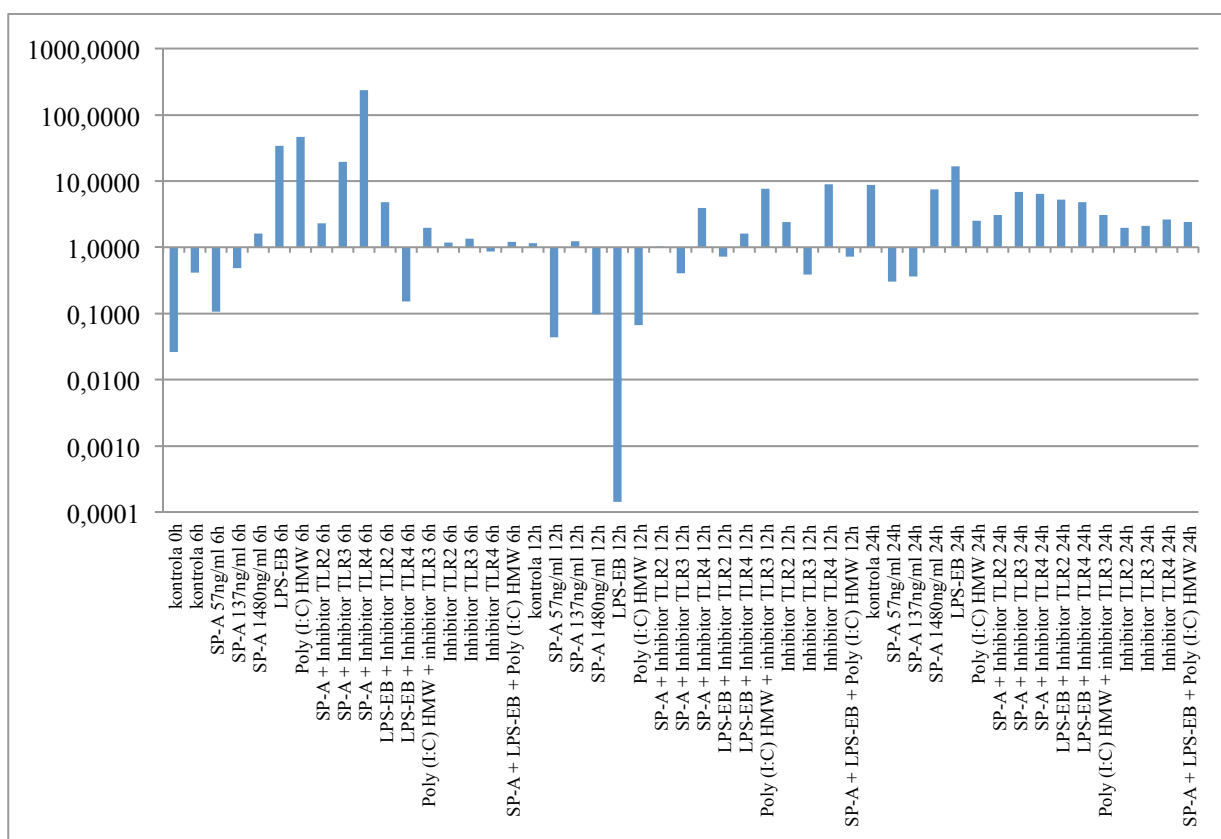


Rycina 49. Obraz reakcji qRT-PCR, krzywe topnienia genu IL-6 wraz z kontrolą negatywną.





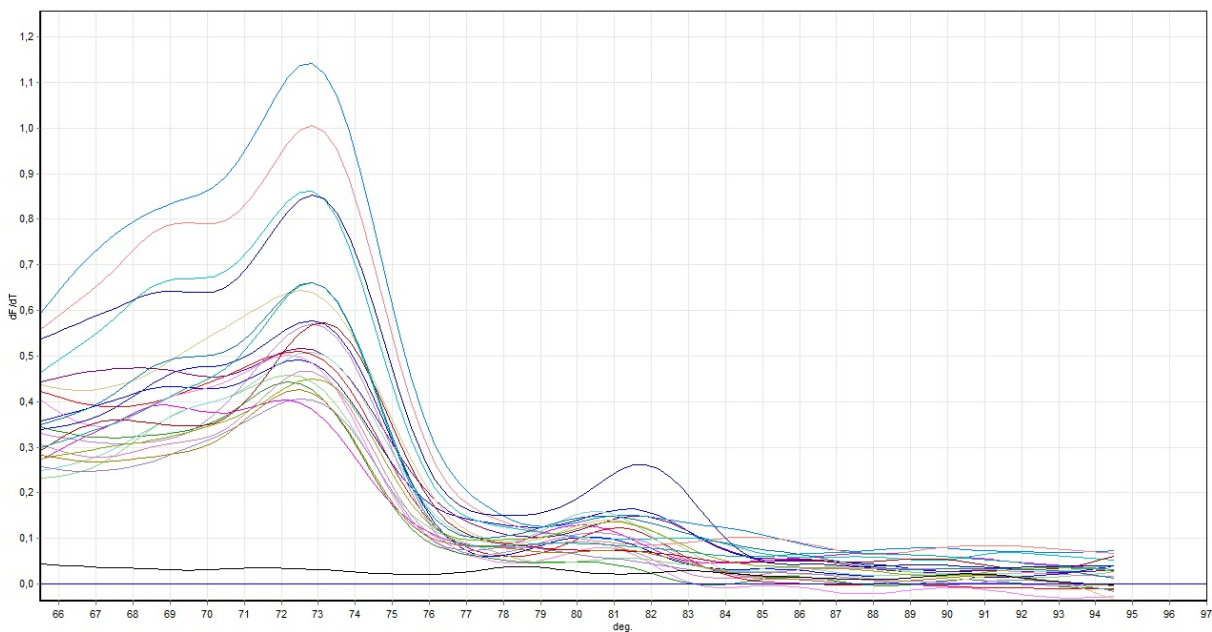
Rycina 50. Ekspresja genu IL-6 (obliczone stężenie – kopie/reakcja).



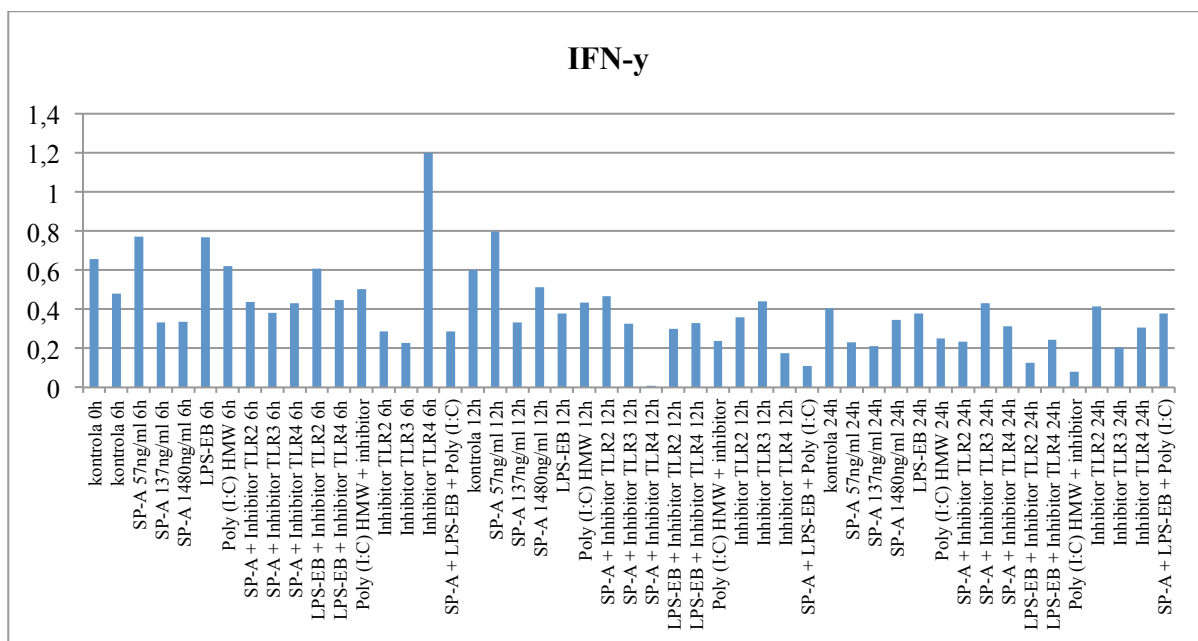
Rycina 51. Względna ekspresja genu IL-6 (względem genu PBGD).

### 3.9. INF- $\gamma$

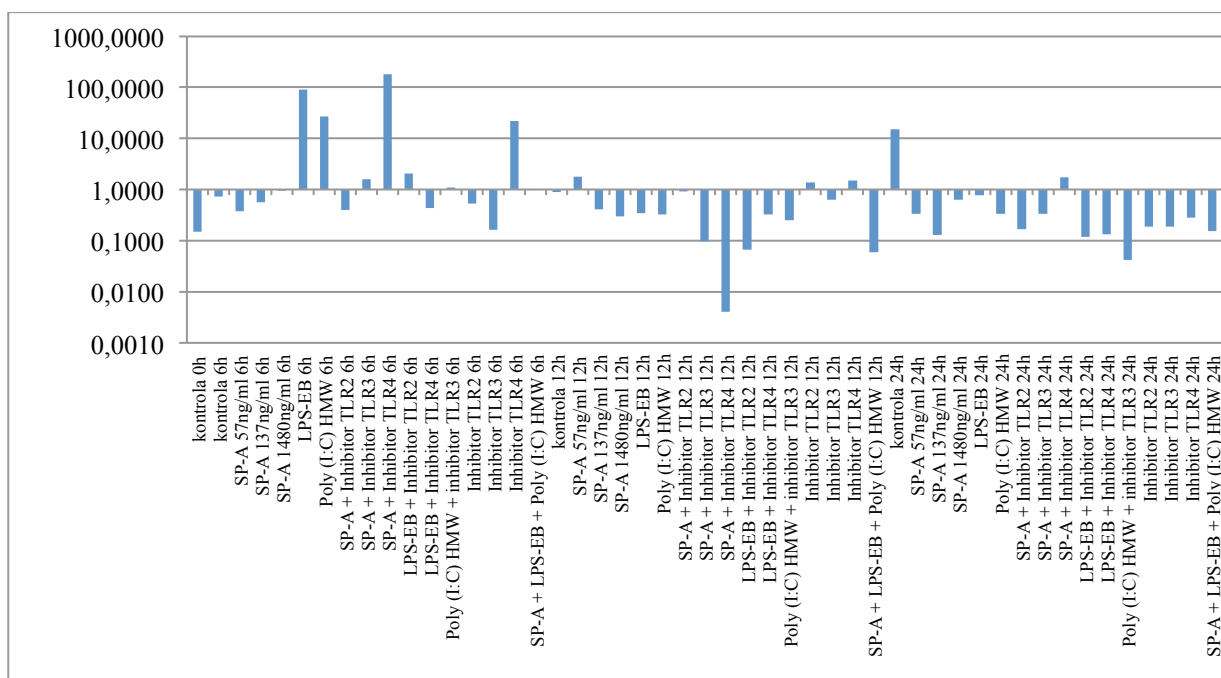
Reakcja qRT-PCR wykazała obecność genu INF- $\gamma$  we wszystkich badanych próbkach (Ryc.52). Ekspresja genu INF- $\gamma$  wykazywała różne wartości dla poszczególnych próbek (Ryc.53). W odniesieniu do genu referencyjnego 12 prób wykazało większą względną ekspresję (Ryc.54).



Rycina 52. Obraz reakcji qRT-PCR, krzywe topnienia genu INF- $\gamma$  wraz z kontrolą negatywną.



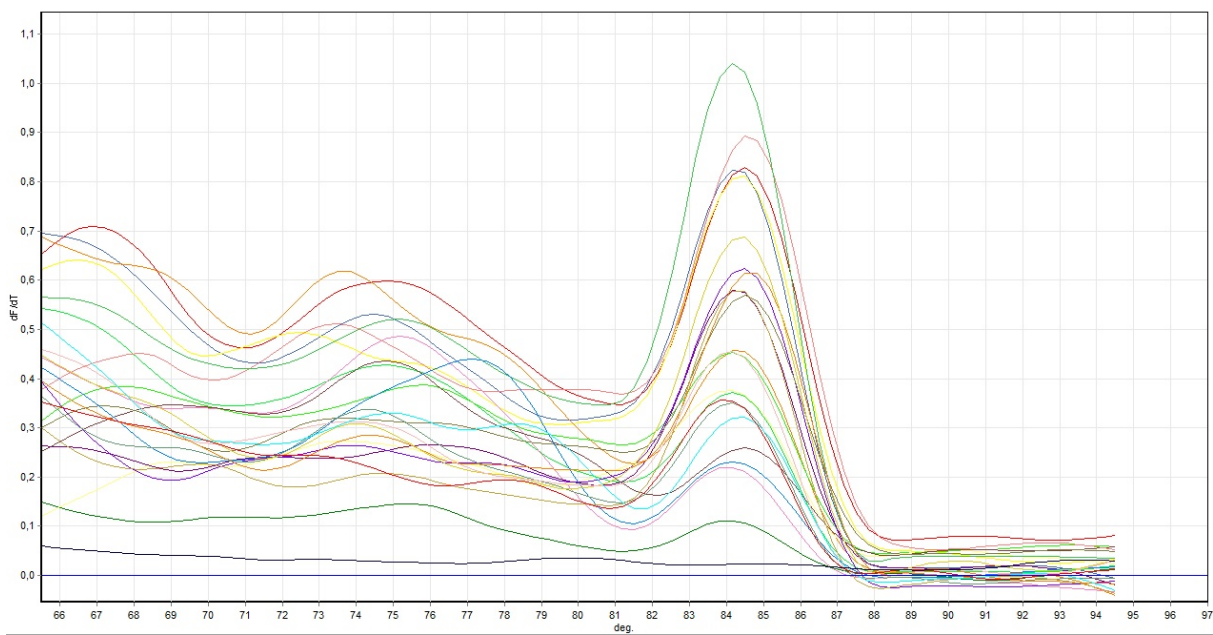
Rycina 53. Ekspresja genu INF-γ (obliczone stężenie – kopie/reakcja).



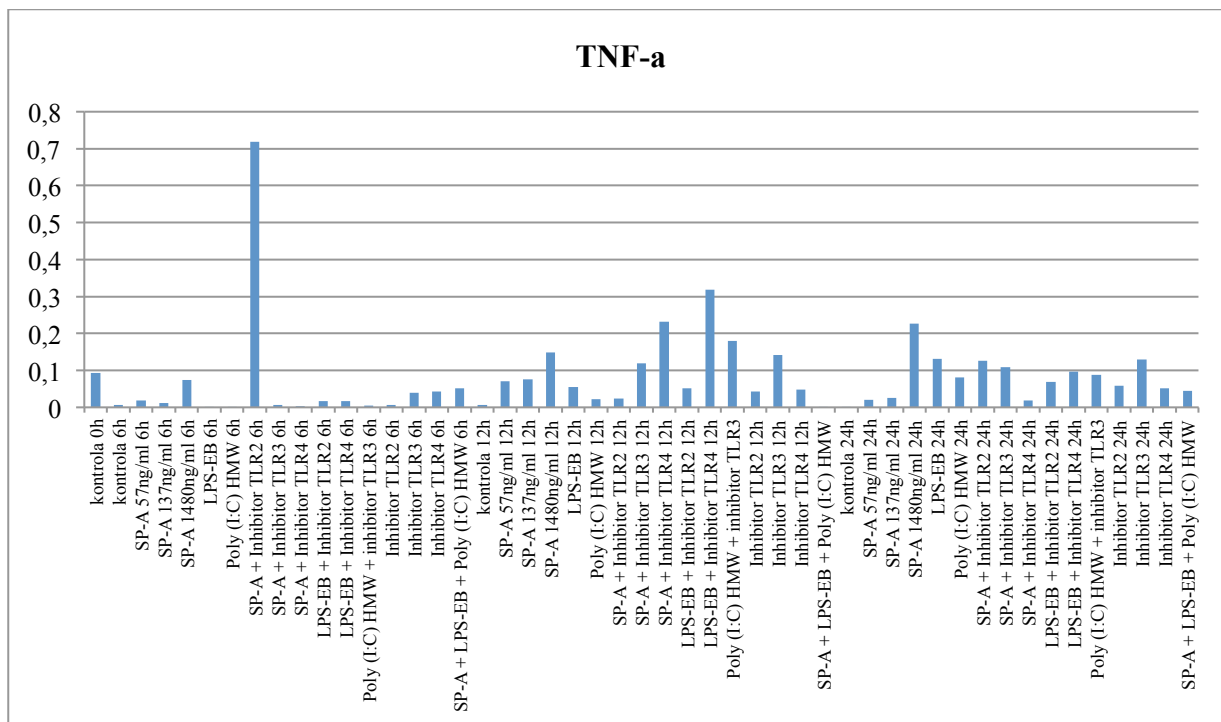
Rycina 54. Względna ekspresja genu INF-γ (względem genu PBGD).

### 3.10. TNF- $\alpha$

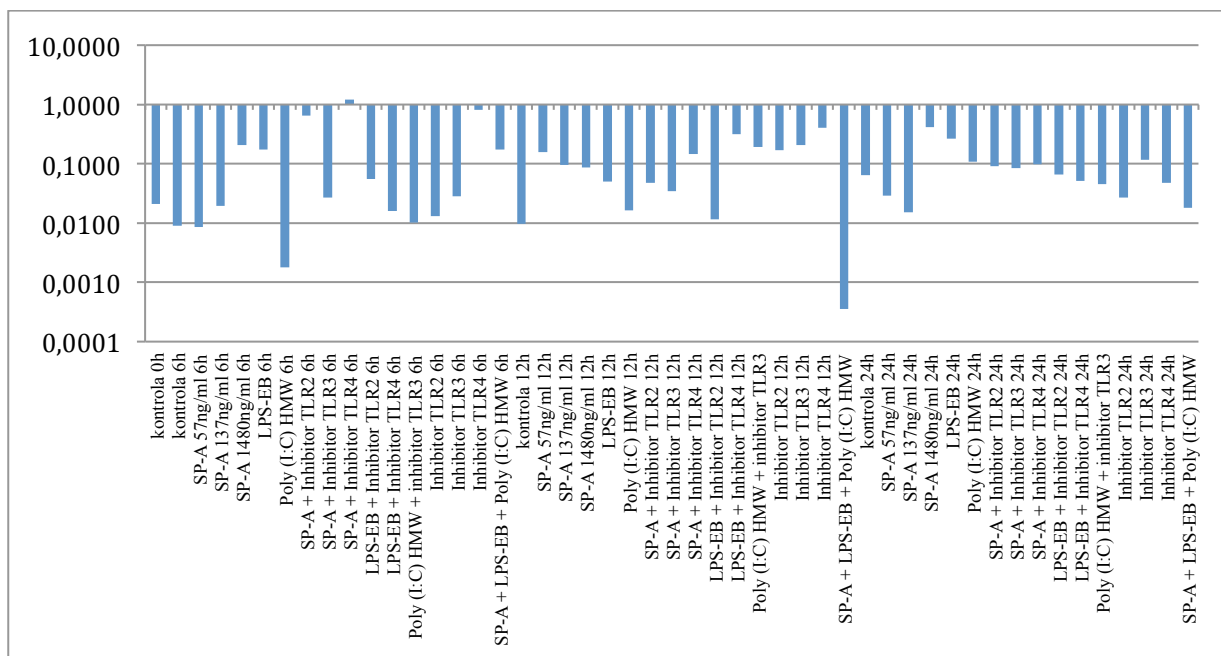
Reakcja qRT-PCR wykazała obecność genu TNF- $\alpha$  we wszystkich badanych próbkach (Ryc.55). Ekspresja genu TNF- $\alpha$  wykazywała różne wartości dla poszczególnych próbek (Ryc.56). W odniesieniu do genu referencyjnego 1 próba wykazała większą względną ekspresję. Próba z dodatkiem samego SP-A w stężeniu 1480 ng/ml w 24 godzinie eksperymentu wykazała znacząco wyższą ekspresję niż w godzinie 6 i 12 godzinie oraz wyższą niż próba kontrolna (Ryc.57).



Rycina 55. Obraz reakcji qRT-PCR, krzywe topnienia genu TNF- $\alpha$  wraz z kontrolą negatywną.



Rycina 56. Ekspresja genu TNF-α (obliczone stężenie – kopie/reakcja).



Rycina 57. Względna ekspresja genu TNF-α (względem genu PBGD).



## DYSKUSJA

Rak płuca jest najczęstszą przyczyną zgonów spowodowanych chorobą nowotworową zarówno wśród mężczyzn jak i kobiet na całym świecie. U większości pacjentów objawy raka płuca pojawiają się, gdy choroba jest bardzo zaawansowana, co powoduje, że nowotwór ten jest trudny do leczenia. Dlatego tak ważne jest szukanie i opracowywanie nowych, innowacyjnych metod jego diagnozy i terapii.

Pastva i wsp. wykazali, że białko SP-A reguluje wytwarzanie cytokin o profilu Th2 w mysim modelu astmy. Wyniki te sugerują, że białko SP-A ma różnorodne funkcje w patogenezie chorób płuc [103]. Biorąc pod uwagę, iż białko SP-A przyczynia się do wielu aspektów związanych z immunologią układu oddechowego, w niniejszej pracy postawiono zbadać czy istnieją zależności pomiędzy SP-A a rakiem płuca.

Powszechnie dostępna światowa literatura w bardzo niewielkim stopniu wyjaśnia związek pomiędzy rakiem płuca a białkiem A związanym z surfaktantem płucnym. Pewnym jest, iż białko SP-A występuje konstytutywnie w tkankach NDRP – wykazał to Bejarano i wsp.[97]. Badania te, zapoczątkowały poszukiwania relacji pomiędzy SP-A a rozwojem choroby nowotworowej. Jednymi z kluczowych odkryć, były wyniki grupy naukowców pod kierownictwem Tsutsumida, którzy wykazali iż niska ekspresja białka SP-A koreluje z gorszym rokowaniem oraz krótszym całkowitym czasem przeżycia chorych na raka płuca [99]. Ponadto Jiang i wsp. dowiedli, że delecja genu SFTPA1 w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuca była związana z progresją guza jak i szybkim zaostreniem choroby [102].

Wyniki uzyskane w badaniach własnych wykazały, iż działanie białka SP-A na komórki linii raka płuca A549, powoduje nasilający się z czasem efekt zwiększenia się liczby komórek martwych, kosztem komórek w fazie podziału G2/M. Ponadto stężenie białka SP-A również okazało się być istotnym czynnikiem powiązanim z odsetkiem komórek martwych – im wyższe stężenie białka SP-A w hodowli komórkowej, tym większy odsetek komórek martwych. Również w hodowli linii Calu-3 białko SP-A powodowało zwiększanie się liczby komórek martwych, kosztem komórek w fazie G2/M. Zależności te były istotne statystycznie. Zupełnie odwrotnie białko SP-A oddziaływało na linię nienowotworową - komórki

fibroblastów płucnych CCD-39Lu. Wykazano, iż SP-A nie wywiera wpływu na odsetek komórek martwych ani komórek znajdujących się w fazie G2/M, powoduje natomiast zwiększanie się odsetka komórek znajdujących się w fazie G0/G1. Otrzymane wyniki są spójne z wynikami uzyskanymi przez Hasegawa i wsp., którzy zaobserwowali iż białko SP-A hamuje proliferację oraz metabolizm komórek linii A549 [104].

Powyższe dane sugerują, iż białko SP-A może być ważnym elementem terapii przeciwnowotworowej, zarówno jako endogenny element układu odpornościowego w terapii celowanej, lub jako syntetyczny produkt leczniczy. Wyniki te, nie wyjaśniają jednak mechanizmu śmierci komórek nowotworowych pod wpływem aktywności białka SP-A. Bazując na uzyskanych wynikach, nie można jednoznacznie odpowiedzieć czy białko SP-A jest czynnikiem wpływającym na proces apoptozy czy na inny rodzaj śmierci komórkowej. Aby odpowiedzieć na to pytanie, potrzebne są dalsze, bardziej szczegółowe badania.

Jeżeli chcielibyśmy rozważać działanie białka SP-A na poziomie układu immunologicznego, niewątpliwie ważne są receptory TLR dla których białko to jest ligandem. Endogenne ligandy receptorów TLR są bardzo silnymi czynnikami wpływającymi na przebieg nieswoistej odpowiedzi immunologicznej organizmu a ich ligacja z odpowiednimi receptorami TLR może aktywować czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B lub czynnik IFR, powodując wzrost syntezy i wydzielania wielu cytokin czy chemokin.

Dostępne są wyniki obszernych badań na temat zależności pomiędzy receptorami Toll-podobnymi a rakiem płuca. Wykazano związek pomiędzy wysoką ekspresją mRNA TLR1-10 u pacjentów z NDRP a dłuższym czasem przeżycia chorych [45]. Guillot i wsp. zaobserwowali aktywację receptora TLR4 poprzez dodanie białka SP-A. Ich badania opierały się na analizie komórek jajnika chomika chińskiego – zarówno z obecnością TLR4 jak i przy jego braku. W komórkach z obecnym TLR4, po dodaniu SP-A następowała aktywacja jądrowego czynnika transkrypcyjnego beta (NF- $\kappa$ B). Takiej odpowiedzi nie uzyskiwano u chomików bez TLR4 [67]. Podobne wnioski dotyczące ligacji SP-A z TLR4 uzyskali badacze pod kierownictwem Yamada. Wykazali oni, że SP-A oddziałuje bezpośrednio z TLR4 i MD-2. SP-A wiąże się z rozpuszczalną formą zewnątrzkomórkowej domeny TLR4 (sTLR4) i MD-2 na drodze zależnej od  $Ca^{2+}$  [95]. Powyższe teorie zostały potwierdzone w niniejszej pracy. Wykazano, iż stężenie białka SP-A jest istotnym czynnikiem powiązaniem z ekspresją receptora TLR4 zarówno na powierzchni komórek linii A549 jak i Calu-3. Przy użyciu cytometrii przepływowej otrzymano statystycznie istotne wyniki, mówiące o tym, że



wraz ze wzrostem stężenia białka SP-A dochodzi do wzrost ekspresji powierzchniowego receptora TLR4. Efekt czasu oraz efekt interakcyjny obu zmiennych nie okazał się być istotny statystycznie. Natomiast dla linii nienowotworowej fibroblastów płucnych CCD39-Lu wykazano, iż ekspresja TLR4 pozostaje stała niezależnie od upływu czasu oraz stężenia białka SP-A. Dla TLR2 i TLR3 nie wykazano statystycznie istotnej zależności z obecnością białka SP-A, jednakże podkreślić trzeba iż receptory te były obecne na powierzchni komórek użytych do eksperymentu.

Tak więc, zależności pomiędzy białkiem SP-A a elementami wrodzonej odpowiedzi immunologicznej wydają się mieć niezwykle istotny wpływ na rozwój i przebieg niedrobnokomórkowego raka płuca oraz być istotne z klinicznego punktu widzenia dla przełamania supresji odpowiedzi antynowotworowej.

W otrzymanych wynikach badań, na poziomie molekularnym nie zaobserwowano statystycznie istotnych zależności pomiędzy stężeniem białka SP-A a ekspresją genów dla receptorów TLR oraz wybranych mediatorów odpowiedzi immunologicznej. Taka informacja może sugerować, iż białko SP-A nie działa bezpośrednio na komórki nowotworowe a stymulacja układu odpornościowego przy jego udziale zachodzi pośrednio poprzez interakcje z innymi komórkami w mikrośrodkowisku nowotworu. Twierdzenie takie, byłoby spójne z wynikami, które otrzymał Kaczmarek i wsp. [101] oraz Mitsuhashi i wsp. [100] według których, SP-A reguluje mikrośrodkowisko guza przez kontrolowanie polaryzacji makrofagów związanych z nowotworem (TAM). Ich badania wykazały, że SP-A wpływa na różne obszary aktywności makrofagów, w szczególności chemotaksję, fagocytozę i ekspresję białek powierzchniowych komórek. W większości guzów makrofagi infiltrują masę guza i uważa się, że wyrażają fenotyp M2, który zapewnia immunosupresyjne mikrośrodkowisko dla wzrostu guza. Natomiast w podskórnym przeszczepie ksenoprzeszczepu lub przerzutach do płuc w modelach mysich, SP-A wyrażane przez komórki nowotworowe prowadzi do zwiększonej liczby makrofagów aktywowanych w kierunku M1, które następnie wzmacniają komórki NK. Kaczmarek i wsp. zaobserwowali również wysokie stężenie endogennego białka SP-A w opłucnowych wysiękach nowotworowych od pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca. Może to być kliniczna manifestacja aktywacji układu immunologicznego, mająca na celu zatrzymanie proliferacji komórek nowotworowych. Efektów takich nie zaobserwowano w linii nienowotworowej, co jeszcze bardziej zwiększa wiarygodność wysuniętej tezy.

Aczkolwiek próba z dodatkiem samego SP-A w stężeniu 1480 ng/ml w 24 godzinie eksperymentu linii A549 wykazała znacząco wyższą ekspresję transkryptu genu dla IL-6 niż w godzinie 6 i 12 oraz wyższą niż próby kontrolne. Wyniki te mogą sugerować iż komórki nowotworowe A549 stymulowane białkiem SP-A mogą być ważnym źródłem IL-6 w przebiegu procesu nowotworowego. Komórki A549 jako źródło IL-6 były już wcześniej opisywane przez między innymi Crestani i wsp. Natomiast w przypadku badań tego zespołu źródłem pobudzenia komórek A549 była IL-1 $\beta$  oraz TNF- $\alpha$  [105]. Biorąc pod uwagę plejotropowy charakter interleukiny 6, nie można jednoznacznie stwierdzić czy w tym wypadku stymulacja SP-A ma charakter pozytywny czy też nie.

W sprzeczności pozostają teraz wyniki otrzymane w powyższych badaniach sugerujące iż z jednej strony, białko SP-A powoduje wzrost ekspresji receptorów TLR4 na komórkach nowotworowych (w badaniach cytometrycznych) a z drugiej na poziomie molekularnym nie powoduje zwiększania poziomu transkryptu dla genu TLR4. Informacja ta może tylko zasugerować, że SP-A działa na komórki nowotworowe regionalnie, chwilowo i dosyć szybko. Zjawisko to, mogłoby być cenną informacją, identyfikującą białko SP-A jako substancję bezpieczną z punktu widzenia zastosowań terapeutycznych.

Przeprowadzone w przebiegu obecnej pracy eksperymenty z zastosowaniem egzogenego, aktywnego biologicznie białka SP-A, były pierwszymi przeprowadzanych równocześnie na nowotworowych i nienowotworowych liniach komórkowych. Uzupełniają one obecny stan wiedzy o lepsze zrozumienie mechanizmów kancerogenezy raka płuca oraz wpływu białka SP-A na odpowiedź antynowotworową. Wyniki powyższych badań mogą stanowić istotny kierunek rozwoju innowacyjnych immunoterapii nowotworów. Nadrzędnym celem jest określenie teraz na modelu zwierzęcym, czy stymulacja, aktywnym biologicznie białkiem SP-A działa podobnie również w mikrośrodkowisku nowotworu, gdzie oprócz komórek nowotworowych znajduje się cały szereg innych, wysoce wyspecjalizowanych elementów układu immunologicznego. Jeżeli wyniki okażą się spójne, można by zacząć rozważać białko SP-A pod kątem użyteczności terapeutycznych.

## WNIOSKI

1. Białko SP-A wpływa na cykl komórkowy linii A549 oraz Calu-3, powodując zwiększenie się odsetka komórek martwych. Wpływ ten jest tym większy im większe stężenie białka.
2. Receptor TLR4 na komórkach A549 oraz Calu-3 zwiększa swoją ekspresję w miarę wzrostu stężenia białka SP-A.
3. Białko SP-A nie powoduje wzrostu ekspresji transkryptu genów TLR2, TLR3, TLR4, BAX, BCL-2, TTF-1, IL-6, INF- $\gamma$  oraz TNF- $\alpha$ .
4. Zaobserwowano zależność pomiędzy wysokim stężeniem SP-A a zwiększoną ekspresją transkryptu genu IL-6. Zależność ta nie jest jednak istotna statystycznie.



## SPIS TABEL I RYCIN

- Tab. 1. Wybrane DAMPs oraz ich wpływ na rozwój NDRP.
- Tab. 2. Charakterystyka substancji użytych do kondycjonowania mediów hodowlanych.
- Tab. 3. Schemat stężeń białka SP-A zastosowanych do określenia jego wpływu na cykl komórkowy linii A549, Calu-3 oraz CCD-39Lu.
- Tab. 4. Schemat użytych substancji (białka SP-A) do określenia ekspresji receptorów TLR2, TLR3 i TLR4 linii A549, Calu-3 oraz CCD-39Lu.
- Tab. 5. Charakterystyka przeciwciał użytych do określenia ekspresji receptorów TLR2, TLR3 i TLR4 w obrębie linii A549, Calu-3 oraz CCD-39Lu.
- Tab. 6. Schemat hodowli do badań molekularnych linii A549.
- Tab. 7. Skład zestawu do qRT-PCR (QIAGEN).
- Tab. 8. Charakterystyka starterów użytych do reakcji qRT-PCR.
- Tab. 9. Przebieg reakcji qRT-PCR.
- Tab. 10. Współczynniki analizy regresji przewidującej wpływ białka SP-A i czasu na cykl komórkowy linii A549.
- Tab. 11. Współczynniki analizy regresji przewidującej wpływ białka SP-A i czasu na cykl komórkowy linii Calu-3.
- Tab. 12. Współczynniki analizy regresji przewidującej wpływ białka SP-A i czasu na cykl komórkowy linii CCD-39Lu.
- Tab. 13. Współczynniki analizy regresji przewidującej wpływ białka SP-A i czasu na ekspresję TLR2, TLR3 i TLR4 w linii komórkowej A549.
- Tab. 14. Współczynniki analizy regresji przewidującej wpływ białka SP-A i czasu na ekspresję TLR2, TLR3 i TLR4 w linii komórkowej Calu-3.

- Tab. 15. Współczynniki analizy regresji przewidującej wpływ białka SP-A i czasu na ekspresję TLR2, TLR3 i TLR4 w linii komórkowej CCD-39Lu.
- Ryc. 1. Wysiłek opłucnowy z komórkami niedrobnokomórkowego raka płuca. (H+E x1000).
- Ryc. 2. TLR9 stymuluje układ immunologiczny do odpowiedzi przeciwnowotworowej.
- Ryc. 3. Odpowiedź mikrośrodowiska nowotworu na ligację receptorów TLR.
- Ryc. 4. Procentowy udział składników tworzących strukturę surfaktantu płucnego.
- Ryc. 5. Struktura kolektyny (monomer).
- Ryc. 6. Struktura białka SP-A.
- Ryc. 7. Receptory komórkowe dla białka SP-A.
- Ryc. 8. Stężenie SP-A w wysiękach o różnej etiologii.
- Ryc. 9. Analiza SDS-PAGE frakcji uzyskanych po oczyszczaniu nr 1 pm - marker mas, #1-#10 zebrane frakcje po elucji. Widoczne są prążki o masie około 27kDa i 30kDa we frakcjach 1-3, co odpowiada masie SP-A.
- Ryc. 10. Analiza SDS-PAGE frakcji uzyskanych po oczyszczaniu nr 2 pm - marker mas, #1-#10 - zebrane frakcje po elucji, wash - frakcja zebrana po płukaniu kolumny buforem do przemywania. Widoczny jest prążek o masie około 27kDa. We frakcji wash widać prążki powyżej 27kDa.
- Ryc. 11. Analiza SDS-PAGE frakcji uzyskanych po oczyszczaniu nr 3 FT - próbka zebrana z kolumny po nakładaniu, wash – frakcja zebrana po płukaniu kolumny buforem do przemywania, pm - marker mas, #1-#10 - zebrane frakcje po elucji. Analiza pokazała obecność wielu prążków o masie powyżej 50kDa, niewidoczne są prążki o masie około 27kDa, we frakcji wash widać główny prążek o masie około 70kDa.
- Ryc. 12. Analiza SDS-PAGE frakcji uzyskanych po oczyszczaniu-04. load: próbka nakładana na kolumnę , FT: próbka zebrana z kolumny po nakładaniu, wash:

frakcja zebrana po płukaniu kolumny buforem do przemywania, pm: marker mas, #1-#10: zebrane frakcje po elucji. Analiza SDS-PAGE pokazała, że białko wymyte z kolumny mannozowej nie łąpie się na kolumnie amylozowej.

- Ryc. 13. A-C. Analiza SDS-PAGE frakcji uzyskanych po oczyszczaniach #5 do #7. M: marker mas, Load: próbka nakładana na złożę, FT: próbka nie związane ze złożem, Wash: próbka zebrana po płukaniu buforem do przemywania, EF#1-#5: zebrane frakcje po wymyciu ze złoża buforem do elucji.
- Ryc. 14. Analiza Western Blot próbki połączonej. M: marker mas, Concentration 001: próbka zatężona przed odsoleniem, Desalting: odsolenie, Concentration 002: próbka zatężona po odsoleniu, HB: próbka zatężona (retentat), FT: przesącz (permeat), Load: próbka przed odsoleniem, EF: próbka po odsoleniu.
- Ryc. 15. Linia A549 barwiona H+E.
- Ryc. 16. Linia Calu-3.
- Ryc. 17. Linia CCD-39Lu.
- Ryc. 18. Krzywa wzorcowa dla genu PBGD otrzymana w reakcji qRT-PCR.
- Ryc. 19. Wpływ różnych stężeń białka SP-A na cykl komórkowy linii A549.
- Ryc. 20. Wpływ różnych stężeń białka SP-A na cykl komórkowy linii Calu-3.
- Ryc. 21. Wpływ różnych stężeń białka SP-A na cykl komórkowy linii CCD-39Lu.
- Ryc. 22. Ekspresja TLR4 na komórkach linii A549.
- Ryc. 23. Ekspresja TLR4 w komórkach linii A549 w zależności od stężenia białka SP-A.
- Ryc. 24. Ekspresja TLR4 w komórkach linii Calu-3.
- Ryc. 25. Ekspresja TLR4 w komórkach linii Calu-3 w zależności od stężenia białka SP-A.
- Ryc. 26. Ekspresja TLR2 w komórkach linii CCD-39Lu w zależności od stężenia białka SP- A.

- Ryc. 27. Ekspresja TLR3 w komórkach linii CCD-39Lu w zależności od stężenia białka SP- A.
- Ryc. 28. Obraz reakcji qRT-PCR, krzywe amplifikacji genu PBGD wraz z kontrolą negatywną.
- Ryc. 29. Obraz reakcji qRT-PCR, krzywe topnienia genu PBGD wraz z kontrolą negatywną.
- Ryc. 30. Ekspresja genu PBGD (obliczone stężenie – kopie/reakcja).
- Ryc. 31. Obraz reakcji qRT-PCR, krzywe topnienia genu TLR2 wraz z kontrolą negatywną.
- Ryc. 32. Ekspresja genu TLR2 (obliczone stężenie – kopie/reakcja).
- Ryc. 33. Względna ekspresja genu TLR2 (względem genu PBGD).
- Ryc. 34. Obraz reakcji qRT-PCR, krzywe topnienia genu TLR3 wraz z kontrolą negatywną.
- Ryc. 35. Ekspresja genu TLR3 (obliczone stężenie – kopie/reakcja).
- Ryc. 36. Względna ekspresja genu TLR3 (względem genu PBGD).
- Ryc. 37. Obraz reakcji qRT-PCR, krzywe topnienia genu TLR4 wraz z kontrolą negatywną.
- Ryc. 38. Ekspresja genu TLR4 (obliczone stężenie – kopie/reakcja).
- Ryc. 39. Względna ekspresja genu TLR4 (względem genu PBGD).
- Ryc. 40. Obraz reakcji qRT-PCR, krzywe topnienia genu BAX wraz z kontrolą negatywną.
- Ryc. 41. Ekspresja genu BAX (obliczone stężenie – kopie/reakcja).
- Ryc. 42. Względna ekspresja genu BAX (względem genu PBGD).
- Ryc. 43. Obraz reakcji qRT-PCR, krzywe topnienia genu BCL-2 wraz z kontrolą



negatywną.

- Ryc. 44. Ekspresja genu BCL-2 (obliczone stężenie – kopie/reakcja).
- Ryc. 45. Względna ekspresja genu BCL-2 (względem genu PBGD).
- Ryc. 46. Obraz reakcji qRT-PCR, krzywe topnienia genu TTF-1 wraz z kontrolą negatywną.
- Ryc. 47. Ekspresja genu TTF-1 (obliczone stężenie – kopie/reakcja).
- Ryc. 48. Względna ekspresja genu TTF-1 (względem genu PBGD).
- Ryc. 49. Obraz reakcji qRT-PCR, krzywe topnienia genu IL-6 wraz z kontrolą negatywną.
- Ryc. 50. Ekspresja genu IL-6 (obliczone stężenie – kopie/reakcja).
- Ryc. 51. Względna ekspresja genu IL-6 (względem genu PBGD).
- Ryc. 52. Obraz reakcji qRT-PCR, krzywe topnienia genu INF- $\gamma$  wraz z kontrolą negatywną.
- Ryc. 53. Ekspresja genu INF- $\gamma$  (obliczone stężenie – kopie/reakcja).
- Ryc. 54. Względna ekspresja genu INF- $\gamma$  (względem genu PBGD).
- Ryc. 55. Obraz reakcji qRT-PCR, krzywe topnienia genu TNF- $\alpha$  wraz z kontrolą negatywną.
- Ryc. 56. Ekspresja genu TNF- $\alpha$  (obliczone stężenie – kopie/reakcja).
- Ryc. 57. Względna ekspresja genu TNF- $\alpha$  (względem genu PBGD).



## PIŚMIENNICTWO

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136:E359-86.
2. Wojciechowska U, Didkowska J, Koćmiel A. Nowotwory złośliwe w Polsce jako problem zdrowia publicznego. *Studia Demograficzne* 2012;1(161):153-166.
3. Polska Grupa Raka Płuca. Obraz raka płuca w Polsce, 12 marca 2015. [http://www.polgrp.org.pl/1653/obraz\\_raka\\_pluca\\_w\\_polsce](http://www.polgrp.org.pl/1653/obraz_raka_pluca_w_polsce). [Online] [Zacytowano: 20 lipca 2018 r.]
4. Larsen JE, Minna JD. Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Clin Chest Med* 2011; 32:703–40.
5. Sabari JK, Lok BH, Laird JH, Poirier JT, Rudin CM. Unravelling the biology of SCLC: implications for therapy. *Nature reviews Clinical oncology* 2017;14(9):549-561.
6. Subramanian J, Govindan R. Lung cancer in never smokers: a review. *J Clin Oncol* 2007;25(5):561–570.
7. Modlińska A, Kowalczyk A. Lung cancer – epidemiology, clinical symptoms and social consequences. *Psychoonkologia* 2016;20(2):57-65.
8. Travis WD. Classification of lung cancer. *Semin Roentgenol* 2011;46(3):178-86.
9. Muscat JE, Stellman SD, Zhang ZF, Neugut AI, Wynder EL. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6(7):477-80.
10. Howington JA, Blum MG, Chang AC, et al. Treatment of stage I and II non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2013;143:278-313.
11. Ramalingam S, Belani C. Systemic chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer: recent advances and future directions. *Oncologist* 2008;13 Suppl 1:5-13.
12. Krawczyk P, Wojas-Krawczyk K. Przeciwciała monoklonalne przeciw immunologicznym punktom kontroli w leczeniu chorych na nowotwory. *Onkologia w Praktyce Klinicznej*. 2015;2:76-78.
13. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;350:2129-39.
14. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011;331:1565-70.

15. Dieu-Nosjean MC, Antoine M, Danel C, et al. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J Clin Oncol* 2008;26:4410-7.
16. Zhuang X, Xia X, Wang C, et al. A high number of CD8+ T cells infiltrated in NSCLC tissues is associated with a favorable prognosis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2010;18:24-8.
17. Tai X, Van Laethem F, Pobezinsky L, Guintier T, Sharrow SO, Adams A, Granger L, Kruhlak M, Lindsten T, Thompson CB, Feigenbaum L, Singer A: Basis of CTLA-4 function in regulatory and conventional CD4(+) T cells. *Blood* 2012; 119:5155-5163.
18. Lynch TJ, Bondarenko I, Luft A, et al. Ipilimumab in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line treatment in stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer: results from a randomized, double-blind, multicenter phase II study. *J Clin Oncol* 2012;30:2046-54.
19. Kazandjian D, Suzman DL, Blumenthal G, et al. FDA Approval Summary: Nivolumab for the treatment of metastatic non-small cell lung cancer with progression on or after platinum-based chemotherapy. *Oncologist* 2016;21:634-42.
20. Riley J.L.: PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol. Rev.*, 2009; 229: 114-125
21. Riella L.V., Peterson A.M., Sharpe A.H., Chandraker A.: Role of the PD-1 pathway in the immune response. *Am. J. Transplant.* 2012; 12: 2575-2587
22. Zarogoulidis K, Zarogoulidis P, Darwiche K, Tsakiridis K, Machairiotis N, Kougioumtzi I, Courcoutsakis N, Terzi E, Zaric B, Huang H, Freitag L, Spyrtatos D. Malignant pleural effusion and algorithm management, *J. Thorac. Dis.* 2013; 5 (4) 413-419.
23. Kołodziej J, Kacprzak G. Mechanism of formation and diagnostic of the pleural effusion, *Family Medicine&Primary Care.* 2012; 14 (4) 631-639.
24. Heffner JE, Klein JS, Recent advances in the diagnosis and management of malignant pleural effusions, *Mayo Clinic Proceedings.* 2008; 83 (2) 235-250.
25. Light RW, Management of pleural effusions, *J. Formos. Med. Assoc.* 2000; 99 523-531.
26. Noppen M, De Waele M, Li R, Gucht KV, D'Haese J, Gerlo E, Vincken W. Volume and cellular content of normal pleural fluid in humans examined by pleural lavage, *Am. J. Respir. Crit. Care.* 2000; 162 1023-1026.
27. Gjomarkaj M, Pace E, Melis M, Spatafora M, Toews GB. Mononuclear cells in exudative malignant pleural effusion. Characterization of pleural phagocytic cells, *Chest.* 1994; 106 1042-1049.
28. Kaczmarek M, Nowicka A, Kozłowska M, Żurawski J, Batura-Gabryel H, Sikora J. Evaluation of phenotype pattern of macrophages isolated from malignant and non-

- malignant pleura effusions. *Tumor Biol.* 2011; 32 1123-1132.
29. O'Neill LA, When signaling pathways collide: positive and negative regulation of toll-like receptor signal transduction, *Immunity.* 2008; 29: 12-20.
  30. Vega MT, Martin A. The significance of toll-like receptors in human diseases, *Allerg. Immunol.* 2009; 37 (5) 252-263.
  31. Litvack ML, Palaniyar N. Soluble innate immune pattern-recognition proteins for clearing dying cells and cellular components: implications on exacerbating or resolving inflammation, *Innate Immunity.* 2010; 16 (3) 191-200.
  32. Fadok VA, Bratton DL, Henson PM. Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences, *J. Clin. Invest.* 2001; 108 957-962.
  33. Kędziora S, Słotwiński R. Molekularne mechanizmy towarzyszące rozpoznawaniu patogenu przez receptory wrodzonej odporności, *Postępy Hig. Med. Dosw.* 2009; 63 30-38.
  34. Creagh EM, O'Neill LA. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that cooperate in innate immunity, *Trends Immunol.* 2006; 27 (8) 352-357.
  35. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition, *Annual review of immunology.* 2002; 20 197-216.
  36. Tanji T, Ip YT. Regulators of the Toll and Imd pathways in the Drosophila innate immune response, *Trends Immunol.* 2005; 26 (4) 193-198.
  37. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity, *Nature.* 1997; 388 394-397.
  38. Maylan E, Tschopp J, Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response, *Nature.* 2006; 422 (6) 39-44.
  39. Nishiya T, DeFranco AL. Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors. *J. Biol. Chem.* 2004; 279 19008-19017.
  40. Zhang H, Tay PN, Cao W, Li W, Lu J. Integrin-nucleated Toll-like receptor (TLR) dimerization reveals subcellular targeting of TLRs and distinct mechanisms of TLR4 activation and signaling. *FEBS Letters.* 2002; 532 171-176.
  41. Hallman M, Ramet M, Ezekowitz RA. Toll-like receptors as sensors of pathogens, *Pediatr. Res.* 2001; 50 315-321.
  42. Fukata M, Chen A, Vamadevan AS. Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors, *Gastroenterology.* 2007; 133 1869-1881.
  43. Goto Y, Arigami T, Kitago M. Activation of Toll-like receptors 2, 3, and 4 on human

- melanoma cells induces inflammatory factors. *Molecular Cancer Therapies*. 2008; 7: 3642-3653.
44. Biswas SK, Tergaonkar V. Myeloid differentiation factor 88-independent Toll-like receptor pathway: Sustaining inflammation or promoting tolerance? *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2007; 39: 1582-1592.
  45. Bauer AK, Upham BL, Rondini EA, Tennis MA, Velmuragan K, Wiese D. Toll-like receptor expression in human non-small cell lung carcinoma: potential prognostic indicators of disease. *Oncotarget*. 2017;8(54):91860-91875.
  46. Yang LS, Wu WS, Zhang F, Jiang Y, Fan Y, Fang HX, Long J. Role of toll-like receptors in lung cancer. *J Recept Signal Transduct Res*. 2014; 34: 342-4.
  47. Chatterjee S, Crozet L, Damotte D, Iribarren K, Schramm C, Alifano M, Lupo A, Cherfils-Vicini J, Goc J, Katsahian S, Younes M, Dieu-Nosjean MC, Fridman WH, et al. TLR7 promotes tumor progression, chemotherapy resistance, and poor clinical outcomes in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2014; 74: 5008-18.
  48. Zhang YB, He FL, Fang M, Hua TF, Hu BD, Zhang ZH, Cao Q, Liu RY. Increased expression of Toll-like receptors 4 and 9 in human lung cancer. *Mol Biol Rep*. 2009; 36: 1475-81.
  49. He W, Liu Q, Wang L, Chen W, Li N, Cao X. TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. *Mol Immunol*. 2007; 44: 2850-9.
  50. Wei F, Yang F, Li J, Zheng Y, Yu W, Yang L, Ren X. Soluble Toll-like receptor 4 is a potential serum biomarker in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2016.
  51. Jiang DS, Wang YW, Jiang J, Li SM, Liang SZ, Fang HY. MicroRNA-26a involved in Toll-like receptor 9 mediated lung cancer growth and migration. *Int J Mol Med*. 2014; 34: 307-12.
  52. Zhang X, Wang C, Shan S, Liu X, Jiang Z, Ren T. TLR4/ ROS/miRNA-21 pathway underlies lipopolysaccharide instructed primary tumor outgrowth in lung cancer patients. *Oncotarget*. 2016.
  53. Lan F, Yue X, Ren G, Li H, Ping L, Wang Y, Xia T. miR- 15a/16 enhances radiation sensitivity of non-small cell lung cancer cells by targeting the TLR1/NF-kappaB signaling pathway. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2015; 91: 73-81.
  54. Zhou SX, Li FS, Qiao YL, Zhang XQ, Wang ZD. Toll-like receptor 5 agonist inhibition of growth of A549 lung cancer cells in vivo in a Myd88 dependent manner. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13:2807-12.

55. Cherfils-Vicini J, Platonova S, Gillard M et al. Triggering of TLR7 and TLR8 expressed by human lung cancer cells induces cell survival and chemoresistance. *J Clin Invest* 2010;120:1285–97.
56. Krieg AM. Toll-like receptor 9 (TLR9) agonists in the treatment of cancer. *Oncogene* 2008;27:161–7.
57. Smith DA, Conkling P, Richards DA, Nemunaitis JJ, Boyd TE, Mita AC, de La Bourdonnaye G, Wages D, Bexon AS. Antitumor activity and safety of combination therapy with the Toll-like receptor 9 agonist IMO-2055, erlotinib, and bevacizumab in advanced or metastatic non-small cell lung cancer patients who have progressed following chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2014; 63: 787-96.
58. Weihrauch MR, Richly H, von Bergwelt-Baildon MS, Becker HJ, Schmidt M, Hacker UT, Shimabukuro-Vornhagen A, Holtick U, Nokay B, Schroff M, Wittig B, Scheulen ME. Phase I clinical study of the toll-like receptor 9 agonist MGN1703 in patients with metastatic solid tumours. *Eur J Cancer*. 2015; 51: 146-56.
59. Lotze MT, Zeh HJ, Rubartelli A, Sparvero LJ, Amoscato AA, Washburn NR, Devera ME, Liang X, Tor M, Billiar T. The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity, *Immunology Reviews*. 2007; 220 60-81.
60. Dvorak HF, Senger DR, Dvorak AM. Regulation of extravascular coagulation by microvascular permeability, *Science*. 1985; 227 (4690) 1059-1061.
61. Głobińska A, Kowalski ML. Naturalna odpowiedź immunologiczna na wirusy oddechowe-wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe, *Alergia Astma Immunologia*. 2012;17 (2) 66-76.
62. Chang ZL. Important aspect of Toll-like receptors, ligands and their signaling pathways, *Inflammation Research*. 2010; 59 791-808.
63. Piccinini AM, Midwood KS. DAMPening Inflammation by Modulating TLR Signalling, *Mediators of Inflammation*. 2010; 2010 1-21.
64. Vabulas RM, Braedel S, Hilf N. The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway, *J. Biol. Chem*. 2002; 277 (23) 20847-20853.
65. Schaefer L, Babelova A, Kiss E. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages, *J. Clin. Invest*. 2005; 115 (8) 2223-2233.
66. Kol A, Lichtman AH, Finberg RW, Libby P, Kurt-Jones EA. Cutting edge: heat shock

- protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells, *J. Immunol.* 2000; 164 (1) 13-17.
67. Guillot L, Balloy V, McCormack FX, Golenbock DT, Chignard M, Si-Tahar M. Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4, *J. Immunol.* 2002; 168 (12) 5989-5992.
68. Ohya M, Nishitani C, Sano H. Human pulmonary surfactant protein D binds the extracellular domains of Toll-like receptors 2 and 4 through the carbohydrate recognition domain by a mechanism different from its binding to phosphatidylinositol and lipopolysaccharide, *Biochemistry.* 2006; 45 (28) 8657-8664.
69. Curran CS, Demick KP, Mansfield JM. Lactoferrin activates macrophages via TLR4-dependent and independent signaling pathways, *Cell. Immunol.* 2006; 242 (1) 23-30.
70. Park SJ, Svetkauskaite D, He Q. Involvement of Toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein, *J. Biol. Chem.* 2004; 279 (9) 7370-7377.
71. Thuringer D, Jegu G, Wettstein G et al. Extracellular HSP27 mediates angiogenesis through Toll-like receptor 3. *FASEB J* 2013;27:4169–83.
72. Zanin-Zhorov A, Nussbaum G, Franitza S, Cohen IR, Lider O. T cells respond to heat shock protein 60 via TLR2: activation of adhesion and inhibition of chemokine receptors. *FASEB J* 2003;17:1567–9.
73. Figueiredo C, Wittmann M, Wang D et al. Heat shock protein 70 (HSP70) induces cytotoxicity of T-helper cells. *Blood* 2009;113:3008–16.
74. Smolarczyk R, Cichon T, Jarosz M, Szala S. HMGB1—its role in tumor progression and anticancer therapy. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2012;66:913–20.
75. Ehrchen JM, Sunderkotter C, Foell D, Vogl T, Roth J. The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *J Leukoc Biol* 2009;86:557–66.
76. Granville DJ, Carthy CM. Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Lab Invest* 1998; 78: 893-913.
77. Savill J., Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 2000; 407: 784-788.
78. Kim R, Emi M. Cancer cell immune escape and tumor progression by exploitation of antiinflammatory and pro-inflammatory responses. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 924-933
79. Jin Z, May WS. BCL-2 suppresses DNA repair by enhancing c-Myc transcriptional activity. *J Biol Chem* 2006; 281: 14446-14456.



80. Zhan P., Qian Q. Prognostic value of *TTF-1* expression in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Translational Cancer Research* 2013; 2:(1).
81. Berghmans T., Paesmans M. Thyroid transcription factor 1 - a new prognostic factor in lung cancer: a meta-analysis. *Annals of Oncology*. 2006; 17 :(11): 1673–1676.
82. Lee S., Margolin K. Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cancers* 2011; 3: 3856-3893
83. Wright JR. Immunoregulatory function of surfactant proteins. *Nature Reviews Immunology* 2005; 5:58-68.
84. Holmskov U, Thiel S, Jensenius JC. Collectins and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annu. Rev. Immunol.* 2003;21:547–578.
85. Kishore U, Bernal AL, Kamran MF, Saxena A, Singh M, Sarma PU, Madan T. Chakraborty T., Surfactant proteins SP-A and SP-D in human health and disease, *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2005; 53 399-417.
86. Jakel A, Qaseem AS, Kishore U, Sim RB. Ligands and receptors of lung surfactant proteins SP-A and SP-D. *Front Biosci* 2013; 18:1129-40
87. McCormick SM, Mendelson CR : Human SP- A1 and SP - A2 genes are differentially regulated during development and by cAMP and gluco- corticoids. *Am J Physiol* 1994;266:367-374.
88. Oberley RE, Snyder JM : Recombinant human SP - A1 and SP - A2 proteins have different carbo- hydrate - binding characteristics. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 284:871-881.
89. Wang G, Phelps DS, Umstead TM, Floros J : Human SP - A protein variants derived from one or both genes stimulate TNF - alpha production in the THP - 1 cell line. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; 278:946-954.
90. Wang G, Umstead TM, Phelps DS, Al- Mondhiry H, Floros J : The effect of ozone exposure on the ability of human surfactant pro- tein A variants to stimulate cytokine production. *Environ Health Perspect* 2000; 110:79-84.
91. Selman M, Lin HM, Montaña M, Jenkins AL, Estrada A, Lin Z, Wang G, DiAngelo SL, Guo X, Umstead TM, Lang CM, Pardo A, Phelps DS, Floros J : Surfactant protein A and B ge- netic variants predispose to idiopathic pulmo- nary fibrosis. *Hum Genet* 2003; 113: 542-550.
92. Maitra M, Cano CA, Garcia CK : Mutant surfac- tant A2 proteins associated with familial pul- monary fibrosis and lung cancer induce TGF-1 secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109:21064-21069.

93. Watford WT, Smithers MB, Frank MM, Wright JR. Surfactant protein A enhances the phagocytosis of C1q-coated particles by alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*2002; 283:1011-22.
94. Gardai SJ, Xiao YQ, Dickinson M, Nick JA, Voelker DR, Greene KE, Henson PM. By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation. *Cell.* 2003;115:13-23.
95. Yamada C, Sano H, Shimizu T, Mitsuzawa H, Nishitani C, Himi T, Kuroki Y. Surfactant protein A directly interacts with TLR4 and MD-2 and regulates inflammatory cellular response. Importance of supratrimeric oligomerization. *J Biol Chem* 2006; 281:21771-21780.
96. Sato M, Sano H, Iwaki D, Kudo K, Konishi M, Takahashi H, Takahashi T, Imaizumi H, Asai Y, Kuroki Y. Direct binding of toll-like receptor 2 is zymosan, and zymosan-induced NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A. *J Immunol* 2003; 171: 417-25.
97. Bejarano PA, Baughman RP, Biddinger PW, Miller MA, Fenoglio - Preiser C, al - Kafaji B, Di Lauro R, Whitsett JA : Surfactant proteins and thyroid transcription factor - 1 in pulmonary and breast carcinomas. *Mod Pathol.* 1996; 9:445-452.
98. Doumanov J, Jordanova A, Zlatkov K, Moskova-Doumanova V, Lalchev Z. Investigation of IL-6 Effects on SP-A Expression in A549 Lung Cell Line. *Biotechnology & Biotechnological Equipment.* 2012; 26(1):96-99.
99. Tsutsumida H, Goto M, Kitajima S, Kubota I, Hirotsu Y, Yonezawa S : Combined status of MUC1 mucin and surfactant apoprotein A ex- pression can predict the outcome of patients with small - size lung adenocarcinoma. *Histopathology* 2004;44:147-155.
100. Mitsuhashi A, Goto H, Kuramoto T, Tabata S, Yukishige S, Abe S, Hanibuchi M, Kakiuchi S, Saijo A, Aono Y, Uehara H, Yano S, Ledford JG, Sone S, Nishioka Y: Surfactant protein A sup- presses lung cancer progression by regulating the polarization of tumor - associated macro- phages. *Am J Pathol* 2013; 182: 1843-1853.
101. Kaczmarek M, Lagiedo M, Masztalerz A, Kozłowska M, Nowicka A, Brajer B, Batura-Gabryel H, Sikora J. Concentrations of SP-A and HSP70 are associated with polarization of macrophages in pleural effusions of non-small cell lung cancer. *Immunobiology.* 2018;223(2):200-209.
102. Jiang F, Caraway NP, Nebiyu Bekele B, Zhang HZ, Khanna A, Wang H, Li R, Fernandez RL, Zaidi TM, Johnston DA, Katz RL. Surfactant protein A gene deletion and

- prognostics for patients with stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2005; 11:5417-5424.
103. Pastva AM, Walker JK, Maddox LA, Mukherjee S, Giamberardino C, Hsia B, Potts E, Zhu H, Degan S, Sunday ME, Lawson BL, Korfhagen TR, Schwartz DA, Eu JP, Foster WM, McMahon TJ, Que L, Wright JR. Nitric oxide mediates relative airway hyporesponsiveness to lipopolysaccharide in surfactant protein A-deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011 Feb; 44(2):175-84.
104. Hasegawa Y, Takahashi M, Ariki S, Saito A, Uehara Y, Takamiya R, Kuronuma K, Chiba H, Sakuma Y, Takahashi H, and Kuroki Y. Surfactant protein A down-regulates epidermal growth factor receptor by mechanisms different from those of surfactant protein D. *J Biol Chem.* 2017. 292: 18565–18576.
105. Crestani B, Cornillet P, Dehoux M, Rolland C, Guenounou M, Aubier M. Alveolar type II epithelial cells produce interleukin-6 in vitro and in vivo. Regulation by alveolar macrophage secretory products. *J Clin Invest.* 1994 Aug; 94(2): 731–740.



## STRESZCZENIE

Celem pracy była ocena wpływu aktywnego biologicznie białka SP-A na komórki raka płuca.

Badaniom poddano 3 linie komórkowe – dwie nowotworowe (płaskonabłonkowy rak płuca) oraz jedną nienowotworową (fibroblasty płucne). Eksperymenty przeprowadzono z zastosowaniem aktywnego biologicznie białka SP-A, które wyizolowano z wysięków opłucnowych, pobranych uprzednio drogą torakocentezy od 34 pacjentów z Kliniki Pulmonologii, Alergologii i Onkologii Pulmonologicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu oraz Wielkopolskiego Centrum Pulmonologii i Torakochirurgii w Poznaniu. Żaden z pacjentów z nowotworowym wysiękiem opłucnowym nie był poddany terapii przeciwnowotworowej. Przy użyciu cytometrii przepływowej oceniono cykl komórkowy badanych linii hodowanych *in vitro* w obecności SP-A, a także zbadano poziom ekspresji receptorów TLR2, TLR3 i TLR4. Z komórek wyizolowano również RNA, w którym techniką qRT-PCR określono poziom ekspresji wybranych genów kodujących białka zaangażowane w kancerogenezę.

W badaniach wykazano, iż dodanie białka SP-A do układów eksperymentalnych powodowało zwiększenie liczby martwych komórek linii nowotworowych, nie wpływając na wzrost śmiertelności komórek linii kontrolnej. Stwierdzono, iż podwyższenie stężenia białka SP-A w hodowlach indukowało wzrost ekspresji receptora TLR4 na powierzchni komórek linii nowotworowych. W trakcie eksperymentów zaobserwowano również zależność pomiędzy wysokim stężeniem SP-A a zwiększoną ekspresją transkryptu genu kodującego IL-6.

Obserwowana w badaniach zależność pomiędzy białkiem SP-A a elementami wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, wydaje się mieć istotny wpływ na rozwój i przebieg niedrobnokomórkowego raka płuca, oraz może być istotna z klinicznego punktu widzenia dla przełamania supresji odpowiedzi przeciwnowotworowej. Powyższe wyniki wskazują na zdolność bezpośredniego oddziaływania białka SP-A na komórki nowotworowe, oraz pośredniego poprzez aktywację receptora TLR4. Uzyskane dane stanowią istotne uzupełnienie obecnego stanu wiedzy i pozwalają lepiej zrozumieć mechanizmy kancerogenezy raka płuca. Wyniki te, mogą być również istotnym elementem w rozwoju innowacyjnych immunoterapii nowotworów, w których białko SP-A może być wykorzystane jako czynnik o charakterze terapeutycznym.



## SUMMARY

The aim of the study was to assess the effect of biologically active SP-A protein on a lung cancer cell lines.

Three cell lines were examined — two cancerous (squamous cell lung cancer) and one non-cancerous (pulmonary fibroblasts). The experiments were performed using biologically active SP-A protein, which was isolated from pleural effusions, previously collected by thoracocentesis from 34 patients hospitalized in the Department of Pulmonology, Allergology and Pulmonological Oncology of the Poznań University of Medical Sciences and the Greater Poland Pulmonology and Thoracic Surgery Center in Poznań. None of the patients with cancerous pleural effusion have undergone cancer therapy. Using flow cytometry, were analyzed cell cycle of the tested lines, previously cultured *in vitro* in the presence of SP-A. Also, using flow cytometry the expression of TLR2, TLR3 and TLR4 receptors were measured. Finally, RNA from A549 cell line was isolated, in which using the qRT-PCR technique, the expression of selected genes encoding proteins involved in carcinogenesis were measured.

As a result, high SP-A protein concentration in experiments, leads to increase of dead cells of cancer lines, without affecting mortality of the control line. It was found that increasing the level of SP-A protein in the cultures, induced TLR4 expression on the surface of tumor lines. During the experiments, a relationship between high SP-A concentration and increased expression of coding genes for IL-6 was also observed.

Indicated relationship between SP-A proteins and immune responses is significant for the development and course of non-small cell lung cancer, and may also be clinically significant for breaking the tumor suppression. SP-A acts directly on cancer cells and indirectly by activating the TLR4 receptor. The obtained data is an important supplementary data to the current state of knowledge and allows the better understand of the lung cancer carcinogenesis mechanisms. These results may have a significant impact on the development of cancer immunotherapy in which the SP-A protein can be used as a therapeutic agent.

