

**Rola autofagii i starzenia w chemooporności raka płuca: analiza *in vitro*, *in vivo* i materiału klinicznego**

**Streszczenie**

Jedną z najczęściej stosowanych metod leczenia raka płuca w stadium zaawansowanym jest chemioterapia. Jednakże często zastosowana terapia nie przynosi zadowalających efektów i po zakończonym leczeniu dochodzi do nawrotu nowotworu opornego na leczenie. Jednym z możliwych mechanizmów takiego zjawiska jest rozwój starzenia indukowanego terapią (TIS). Komórki stare wykazują szereg charakterystycznych cech takich jak: wzrost aktywności enzymu SA- $\beta$ -galaktozydazy, fenotyp wydzielniczy związany ze starzeniem (SASP), poliploidia, czy zatrzymanie cyklu komórkowego. Ta ostatnia cecha jest korzystna z punktu widzenia terapii pacjentów nowotworowych. Jednakże najnowsze badania sugerują, że komórki TIS mogą powracać do aktywności podziałowej, doprowadzając do wznowy choroby nowotworowej. W kontekście badania odpowiedzi komórkowej na terapie przeciwnowotworowe kluczowe znaczenie ma mikrośrodowisko guza, którego cechą charakterystyczną jest niedotlenienie. Komórki nowotworowe mogą adaptować się do niedotlenionego środowiska poprzez różne mechanizmy, do których należą zmiany metaboliczne oraz modulacja autofagii. Jednakże dokładny związek pomiędzy tymi mechanizmami a TIS w warunkach niedotlenienia pozostaje niejasny. Dlatego też celem tej pracy było zbadanie roli niedotlenienia w rozwoju TIS komórek raka płuca w odpowiedzi na chemioterapię oraz wpływu modulacji metabolizmu beztlenowego i autofagii na ten proces.

W tym celu komórki raka płuca hodowano w warunkach normoksyjnych (~19% O<sub>2</sub>) lub w hipoksji (1% O<sub>2</sub>) oraz poddano chemioterapii. Użyto leków najczęściej stosowanych w terapii pacjentów: uszkadzającej DNA cisplatyny oraz terapeutyków zaburzających dynamikę mikrotubul – docetakselu i winorelbiny. Po zakończeniu eksperymentu zbadano komórki pod kątem markerów TIS.

Otrzymane wyniki wykazały, że warunki niedotlenienia powodowały wzrost oporności na cisplatinę poprzez ucieczkę od starzenia komórkowego, czego nie zaobserwowano podczas zastosowania trucizn mikrotubul. Komórki leczone cisplatiną w niedotlenieniu charakteryzowały się zmniejszoną aktywnością SA- $\beta$ -galaktozydazy oraz zmniejszonym udziałem komórek w fazie G2/M cyklu komórkowego w porównaniu do warunków normoksyjnych. Ponadto niedotlenienie zwiększało aktywność proliferacyjną oraz odsetek komórek w fazie G0/G1. Poszukując mechanizmu molekularnego odpowiedzialnego za ten efekt stwierdzono, że niedotlenienie osłabiało prostarzeniową sygnalizację związaną ze szlakiem p53-p21, a także indukowało tranzycję epithelialno-mezenchymalną.

Podczas badania wpływu modulacji metabolizmu beztlenowego lub autofagii na zaobserwowaną oporność na cisplatynę w niedotlenieniu zastosowano wyciszenie genów związanych z tymi procesami lub farmakologiczne inhibitory. Zahamowanie aktywności enzymu odpowiedzialnego za metabolizm beztlenowy (LDH) nie zmieniło efektu niedotlenienia na ucieczkę komórek przed starzeniem podczas leczenia cisplatyną. Natomiast skuteczne w tym celu okazało się zahamowanie autofagii poprzez użycie farmakologicznego inhibitora, hydroksychlorochiny (HCQ). W perspektywie krótkoterminowej HCQ zmniejszała proliferację niedotlenionych komórek raka płuca leczonych cisplatyną. Dodatkowo analiza NGS wśród genów o zmniejszonej ekspresji pod wpływem HCQ wykazała nadreprezentację genów związanych z terminami cyklu komórkowego, replikacji DNA, ścieżek naprawy DNA bazy KEGG, co może stanowić mechanizmy uwrażliwiające komórki na leczenie oparte na lekach platynowych. Z drugiej strony, geny o zwiększonej ekspresji były nadreprezentowane w terminach związanych z odpowiedzią na infekcje oraz z układem immunologicznym i reakcją zapalną, które mogą potencjalnie odgrywać rolę w progresji nowotworu.

Próba oceny efektu działania HCQ na komórki stare leczone cisplatyną w mysim modelu *in vivo* nie doszła do skutku z powodu gwałtownego wzrostu guzów przed podaniem HCQ. Może to być związane z wystąpieniem niedotlenienia w wyindukowanych guzach i obserwowaną *in vitro* opornością na cisplatynę w niedotlenieniu, jednakże potwierdzenie tej hipotezy wymaga pogłębionych badań.

Ponieważ niedotlenienie okazało się kluczowym czynnikiem w ucieczce przed starzeniem komórek raka płuca leczonych cisplatyną zasadnym jest badanie markerów niedotlenienia przed podaniem tego leku. Z tego względu zbadano ich ekspresję w próbkach pobranych od pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca. U części pacjentów wykazano zróżnicowaną ekspresję czynników indukowanych hipoksją w obu badanych próbkach, wskazując na heterogenność guzów pod względem niedotlenienia. Ponadto wzmożona ekspresja genów HIF częściowo korespondowała ze wzrostem markerów macierzystości, sugerując potencjalną rolę niedotlenienia w promowaniu macierzystego fenotypu komórek raka płuca.

Podsumowując, niedotlenienie sprzyja ucieczce komórek rakowych przed starzeniem się wywołanym cisplatyną. Można ją jednak przezwyciężyć poprzez hamowanie autofagii za pomocą HCQ. Zatem HCQ może stanowić potencjalny terapeutyk zmniejszający chemooporność w niedotlenionych obszarach guza podczas stosowania leków platynowych. Jednakże długotrwały efekt takiej terapii wymaga przetestowania w badaniach przedklinicznych i klinicznych.