Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii

Zakład Ochrony Mikrofalowej

Aleksandra Cios

Ocena wpływu pola elektromagnetycznego na komórki raka jasnokomórkowego nerki na ekspresję i sekwencję genów *VEGFC, ADAM28* oraz *NCAM1*

Influence of extremely low frequency electromagnetic field on clear cell renal cell carcinoma and sequence of the *VEGFC, ADAM28* and *NCAM1* genes

Praca doktorska

Wykonana pod kierunkiem

Dr hab. n. med. Wandy Stankiewicz, prof. WIHE

Promotor pomocniczy

Dr n. med. Łukasz Szymański

Warszawa 2021

Spis treści

Wykaz skrótów 1
Spis tabel 4
Spis rycin 4
1. Wstęp 8
1.1. Epidemiologia nowotworów złośliwych nerki 8
1.2. Etiologia raka nerki 10
1.3. Rozpoznanie 12
1.4.1. Jasnokomórkowy rak nerki 14
1.4.2. Rokowanie i czynniki prognostyczne 16
1.4.3. Podstawy molekularne ccRCC 16
1.4.4. Środowisko immunologiczne ccRCC 18
2. Promieniowanie elektromagnetyczne 22
3. Cele badawcze 26
3.1. Założenia 26
3.2. Szczegółowe cele badawcze 27
4. Materiały i metody 28
4.1. Materiał 28
4.2 Hodowla komórkowa 29
4.3 Metody 31
4.3.1 Warunki ekspozycji na PEM o niskiej częstotliwości 31
4.3.2. Test żywotności i proliferacji 31
4.3.3. Test wiszącej kropli 32
4.3.4. Test migracji i inwazji 32
4.3.5. Analiza cytometryczna cyklu komórkowego 33
4.3.6. Analiza cytometryczna apoptozy 33
4.3.7. Analiza cytometryczna ilości wyprodukowanych reaktywnych form tlenu 34
4.3.8. Analiza poziomu cytokin przy użyciu Bio-Plex 34
4.3.9. Izolacja RNA 37
4.3.10. Analiza ekspresji genów metodą Real-Time-PCR 37
4.4. Analiza statystyczna 39
5. Schemat badań 40
6. Wyniki 41

6.1. Wpływ promieniowania elektromagnetycznego o niskiej częstotliwości na morfologię oraz żywotność komórek 41
6.2. Analiza cytometryczna: cykl komórkowy oraz apoptoza i nekroza komórek 41
6.3. Produkcja reaktywnych form tlenu w komórkach poddanych ekspozycji ELF-EMF . 49
6.4. Wpływ promieniowania na agregację komórek 50
6.5. Zdolności do migracji i inwazji komórek poddanych na PEM o niskiej częstotliwości 56
6.6. Ekspresja genów *VEGFC, ADAM28* i *NCAM1* 57
6. Dyskusja 72
7. Wnioski 79
8. Bibliografia 80
9. Załączniki 90
9.1 Streszczenie 90
9.2 Abstract 93

Wykaz skrótów

ADAM	z ang. a disintegrin and metalloprotease domain	
Akt inaczej PKB	z ang. protein kinase B	kinaza białkowa B
BAP1	z ang. BRCA1 associated protein-1	białko-1 powiązane z BRCA1
BMI	z ang. Body mass index	indeks masy ciała
CCL	z ang. chemokine (C-C motif) ligand	ligand chemokiny (motyw C-C)
ccRCC	z ang. Clear cell renal cell carcinoma	jasnokomórkowy rak nerki
CT	z ang. computer tomography	tomografia komputerowa
CTGF	z ang. connective tissue growth factor	czynnik wzrostu tkanki łącznej
Cul-2	z ang. cullin 2	
CXCR	z ang. C-X-C motif chemokine receptor	receptor chemokin C-X-C
Dntp	z ang. deoxynucleotides	deoksynukleotydy
EGF	z ang. Epidermal growth factor	naskórkowy czynnik wzrostu
ERK	z ang. extracellular signal-regulated kinases	
FGF	z ang. fibroblast growth factor	czynnik wzrostu fiborblastów
GAPDH	z ang. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	gen dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego
G-CSF	z ang. granulocyte colony-stimulating factor	czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów
Glut1	z ang. glucose transporter 1	transporter glukozy 1
GM-CSF	z ang. granulocyte macrophage colony-stimulating factor	czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów
HCAM, CD44	z ang. homing cell adhesion molecule	
HIF	z ang. hypoxia-inducible factor	czynnik indukowany hipoksją

IARC	z ang. International Agency for Research on Cancer	Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem
IFN-α	z ang. interferon α	interferon α
IGF	z ang. Insulin-like growth factor	insulinopodobny czynnik wzrostu
IGFBP-3	z ang. Insulin-like growth factor-binding protein	białko wiążące IGF 3
IL	z ang. interleukin	interleukina
IL-1ra	z ang. interleukin 1 receptor antagonist α	antagonista receptora interleukiny 1 α
IL-6R	z ang. interleukin-6 receptor	receptor transbłonowy interleukiny 6
IP-10 / CXCL10	z ang. interferon-inducible protein 10/ C-X-C motif chemokine ligand 10	białko indukowane interferonem gamma 10
ISUP	z ang. International Society of Urological Pathology	Międzynarodowe Towarzystwo Patologii Urologicznej
KDM5C	z ang. Lysine-specific demethylase 5C	demetylaza specyficzna wobec lizyny 5C
L1-CAM	z ang. L1 cell adhesion molecule	cząsteczka adhezyjna komórek L1
MCP-1	z ang. monocyte chemoattractant protein 1	białko chemotaktyczne monocytów 1
MDSC	z ang. myeloid-derived suppressor cells	komórki surpresorowe pochodzące z mieloidu
MEK/MAPK	z ang. mitogen-activated protein kinases	kinazy białkowe aktywowane mitogenem
MIP-1	z ang. macrophage inflammatory protein 1	białko zapalne makrofagów 1
MRI	z ang. Magnetic resonance imaging	rezonans magnetyczny
mTOR	z ang. mammalian target of rapamycin kinase	ssaczy cel rapamycyny
NCAM, CD56	z ang. neural cell adhesion molecule	cząsteczka adhezyjna komórek nerwowych

NF-κB	z ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	
PBRM1	z ang. protein polybromo-1	białko polibromo-1
PDGF-BB	z ang. platelet-derived growth factor	płytkowy czynnik wzrostu
PI3K	z ang. phoshoinositide 3-kinase	3-kinaza fosfoinozytydowa
PKC	z ang. protein kinase C	kinaza białkowa C
RAF	z ang. rapidly accelerated fibrosarcoma	proto-onkogenna kinaza serynowa / treoninowo-białkowa
RANTES/ CCL5	z ang. regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted/ C-C motif chemokine ligand 5	
RCC	z ang. renal cell cancer	rak nerkowokomórkowy/ rak nerki
RM	z ang. Renal masses	masy nerkowe
RPL30	z ang. ribosomal protein l30 gene	gen białka rybosomalnego l30
SETD2	z ang. SET domain containing 2	gen SET zawierający domenę 2
sIL-6R	z ang. soluble interleukin-6 receptor	rozpuszczalny receptor transbłonowy interleukiny-6
STAT3	z ang. signal transducer and activator of transcription 3	
TAM	z ang. tumor associated macrophage	makrofagi związane z nowotworem
TGF-α	z ang. transforming growth factor alpha	transformujący czynnik wzrostu alfa
TNF-α	z ang. tumor necrosis factor α	czynnik martwicy nowotworów alfa
US	z ang. ultrasonography	ultrasonografia
VCAM1	z ang. Vascular Cell Adhesion Molecule 1	naczyniowe białko adhezyjne komórek
VEGF	z ang. Vascular endothelial growth factor	czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego

VEGFR	z ang. Vascular endothelial growth factor receptor	ligand czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego
VHL	z ang. Von Hippel Lindau	zespół von Hippla-Lindau
VHL	z ang. von Hippel Lindau gene	gen von Hippla-Lindau
WHO	z ang. World Health Organization	Światowa Organizacja Zdrowia

Spis tabel

Tabela 1. Sekwencje wybranych primerów użytych do badania RT-PCR. 38
Tabela 2. Lista cytokin oraz chemokin, których sekrecja była na niskim poziomie. 71

Spis rycin

Rycina 1. Wykres liczby zachorowań w Polsce w poszczególnych województwach na nowotwór złośliwy nerki za wyjątkiem miedniczki nerkowej w latach 1999-2016 u kobiet i mężczyzn od 0 do 85+ lat w województwach w Polsce przygotowany na podstawie raportów z Krajowego Rejestru Nowotworów (6). 9
Rycina 2. Wykres liczby zgonów w Polsce w poszczególnych województwach na nowotwór złośliwy nerki za wyjątkiem miedniczki nerkowej w latach 1999-2016 u kobiet i mężczyzn od 0 do 85+ lat w województwach w Polsce przygotowany na podstawie raportów z Krajowego Rejestru Nowotworów (6). 9
Rycina 3. Przykłady obrazów histopatologicznych ccRCC: a) stopień 1 ccRCC; b) stopień 2 ccRCC; c) stopień 3 ccRCC; d) stopień 4 ccRCC (42). 15
Rycina 4. Widmo pola elektromagnetycznego pokazujący typ, długość fali (z przykładami), częstotliwość, temperaturę emisji czarnego ciała (60). 22
Rycina 5. Szlaki sygnałowe aktywowane przez ELF-EMF. Opracowanie własne na podstawie danych uzyskanych z KEEG PATHWAY Database (76). 24
Rycina 6. Komercyjnie dostępne linie komórkowe: a) HEK293; b)786-O; c)769-P; d) Caki1. Wszystkie zdjęcia wykonano w powiększeniu 100x. 30
Rycina 7. Przykładowe wykresy gęstościowe przedstawiające analizę cyklu komórkowego badanych linii: a) analiza próbki z grupy kontrolnej HEK293; b) próbka z grupy badanej linii

HEK293; c) analiza próbki z grupy kontrolnej Caki1, d) próbka z grupy badanej linii Caki1. 42
Rycina 8. Przykładowe wykresy gęstościowe przedstawiające analizę cyklu komórkowego badnaych linii: a): analiza próbki z grupy kontrolnej 769-P; b) próbka z grupy badanej linii 769-P; c) analiza próbki z grupy kontrolnej 786-O; d) próbka z grupy badanej linii 786-O 43
Rycina 9. Wyniki analizy cytometrycznej faz cyklu komórkowego pod wpływem ELF-EMF. Dane zaprezentowane jako średnia ± odchylenie standardowe: * - p<0,05, ** - p<0,005,*** - p<0,001, **** p<0,0001 44
Rycina 10. Przykładowe wykresy gęstościowe przedstawiające analizę nekrozy oraz apoptozy badanych komórek: a) górny rząd analiza próbki z grupy kontrolnej HEK293, dolny rząd próbka z grupy badanej linii HEK293; b) górny rząd analiza próbki z grupy kontrolnej Caki1, dolny rząd próbka z grupy badanej linii Caki1; c) górny rząd analiza próbki z grupy kontrolnej 769-P, dolny rząd próbka z grupy badanej linii 769-P; d) górny rząd analiza próbki z grupy kontrolnej 786-O, dolny rząd próbka z grupy badanej linii 786-O 46
Rycina 11. Wyniki analizy cytometrycznej apoptozy komórek pod wpływem ELF-EMF. Dane zaprezentowane jako średnia ± odchylenie standardowe: * - p<0,05. 48
Rycina 12. Wyniki analizy cytometrycznej % wyprodukowanych reaktywnych form tlenu pod wpływem ELF-EMF. Dane zaprezentowane jako średnia ± odchylenie standardowe: **** p<0,0001 49
Rycina 13. Linia HEK293 w hodowli wiszącej kropli. Zdjęcia A, B i C przedstawiają komórki HEK293 z grupy kontrolnej odpowiednio po 24, 48 i 72h od początku założenia hodowli. Zdjęcia D, E i F przedstawiają komórki HEK293 poddane ekspozycji PEM odpowiednio po 24, 48 i 72h od założenia hodowli. Zdjęcia wykonane przy pomocy mikroskopu Delta-Optical IB-100, powiększenie 4x. 51
Rycina 14. Linia Caki1 w hodowli wiszącej kropli. Zdjęcia A, B i C przedstawiają komórki Caki1 z grupy kontrolnej odpowiednio po 24, 48 i 72h od początku założenia hodowli. Zdjęcia D, E i F przedstawiają komórki Caki1 poddane ekspozycji PEM odpowiednio po 24, 48 i 72h od założenia hodowli. Zdjęcia wykonane przy pomocy mikroskopu Delta-Optical IB-100, powiększenie 4x. 52
Rycina 15. Linia 786-O w hodowli wiszącej kropli. Zdjęcia A, B i C przedstawiają komórki 786-O z grupy kontrolnej odpowiednio po 24, 48 i 72h od początku założenia hodowli. Zdjęcia D, E i F przedstawiają komórki 786-O poddane ekspozycji PEM odpowiednio po 24, 48 i 72h od założenia hodowli. Zdjęcia wykonane przy pomocy mikroskopu Delta-Optical IB-100, powiększenie 4x 53

Rycina 16. Linia 769-P w hodowli wiszącej kropli. Zdjęcia A, B i C przedstawiają komórki 769-P z grupy kontrolnej odpowiednio po 24, 48 i 72h od początku założenia hodowli. Zdjęcia D, E i F przedstawiają komórk 769-P poddane ekspozycji PEM odpowiednio po 24, 48 i 72h od założenia hodowli. Zdjęcia wykonane przy pomocy mikroskopu Delta-Optical IB-100, powiększenie 4x 54
Rycina 17. Analizę średnicy sferoidu przeprowadzono w 24, 48 i 72h, średnie wartości średnic „sfer" przedstawiono na wykresie. Analizę przeprowadzono za pomocą oprogramowania DLT-Cam Viewer, a pomiary wykonano z dwóch niezależnych eksperymentów w dziewięciu powtórzeniach. (*- p<0,05; *** - p<0,0005) 55
Rycina 18. Liczba komórek migrujących w kierunku chemoatraktantu (średnia z 5 pól przy całkowitym powiększeniu 100x). (*** - p<0,0005; **** - p<0,00005). 57
Rycina 19. Wpływ pola elektromagnetycznego o niskiej częstotliwośći na ekspresję genów ADAM29, NCAM1 i VEGFC. (* - p<0,05, ** - p<0,005, ***** - p<0,00005) 59
Rycina 20. Wyniki analizy stężenia IL-2 w nadsączach z hodowli komórkowych po 5 dniach ekspozycji na PEM. Wyniki przedstawione w pg/mL jako średnia ± odchylenie standardowe 60
Rycina 21. Wyniki analizy stężenia IL-6 w nadsączach z hodowli komórkowych po 5 dniach ekspozycji na PEM. Wyniki przedstawione w pg/mL jako średnia ± odchylenie standardowe 61
Rycina 22. Wyniki analizy stężenia IL-8 w nadsączach z hodowli komórkowych po 5 dniach ekspozycji na PEM. Wyniki przedstawione w pg/mL jako średnia ± odchylenie standardowe 62
Rycina 23. Wyniki analizy stężenia IL-9 w nadsączach z hodowli komórkowych po 5 dniach ekspozycji na PEM. Wyniki przedstawione w pg/mL jako średnia ± odchylenie standardowe 63
Rycina 24. Wyniki analizy stężenia TNF-α w nadsączach z hodowli komórkowych po 5 dniach ekspozycji na PEM. Wyniki przedstawione w pg/mL jako średnia ± odchylenie standardowe 64
Rycina 25. Wyniki analizy stężenia TGF-β1 w nadsączach z hodowli komórkowych po 5 dniach ekspozycji na PEM. Wyniki przedstawione w pg/mL jako średnia ± odchylenie standardowe 65
Rycina 26. Wyniki analizy stężenia RANTES w nadsączach z hodowli komórkowych po 5 dniach ekspozycji na PEM. Wyniki przedstawione w pg/mL jako średnia ± odchylenie standardowe 66

Rycina 27. Wyniki analizy stężenia GM-CSF w nadsączach z hodowli komórkowych po 5 dniach ekspozycji na PEM. Wyniki przedstawione w pg/mL jako średnia ± odchylenie standardowe 67
Rycina 28. Wyniki analizy stężenia M-CSF w nadsączach z hodowli komórkowych po 5 dniach ekspozycji na PEM. Wyniki przedstawione w pg/mL jako średnia ± odchylenie standardowe. 68
Rycina 29. Wyniki analizy stężenia IFN-γ w nadsączach z hodowli komórkowych po 5 dniach ekspozycji na PEM. Wyniki przedstawione w pg/mL jako średnia ± odchylenie standardowe. 69
Rycina 30. Wyniki analizy stężenia MIP-1b w nadsączach z hodowli komórkowych po 5 dniach ekspozycji na PEM. Wyniki przedstawione w pg/mL jako średnia ± odchylenie standardowe. 70

1. Wstęp

Na podstawie statystyk z 2018 roku nowotwory były drugą najczęstszą przyczyną zgonów na świecie i odpowiadały za około 9,6 miliona przypadków śmiertelnych (1). Na całym świecie około jeden na sześć zgonów jest spowodowanym nowotworem.

Jedną z najważniejszych cech określających nowotwór jest niepohamowane tworzenie się nieprawidłowych komórek. Nowotwór powstaje w wyniku transformacji zdrowych komórek do komórek nowotworowych, w wieloetapowym procesie. Zmiany te są wynikiem interakcji między czynnikami genetycznymi danej osoby, a trzema kategoriami czynników zewnętrznych, w tym:

• fizycznymi czynnikami rakotwórczymi;
• chemicznymi czynnikami rakotwórczymi;
• biologicznymi czynnikami rakotwórczymi.

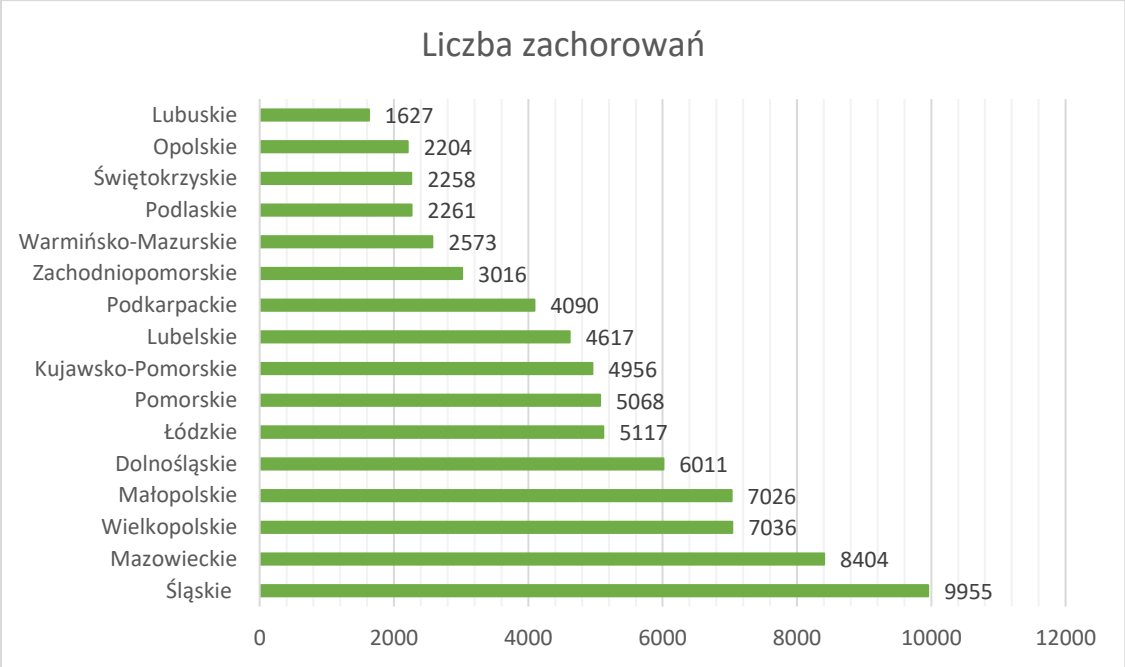
WHO (z ang. World Health Organization), za pośrednictwem Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem (International Agency for Research on Cancer - IARC), utrzymuje klasyfikację czynników rakotwórczych przedstawionych powyżej (1).

1.1. Epidemiologia nowotworów złośliwych nerki

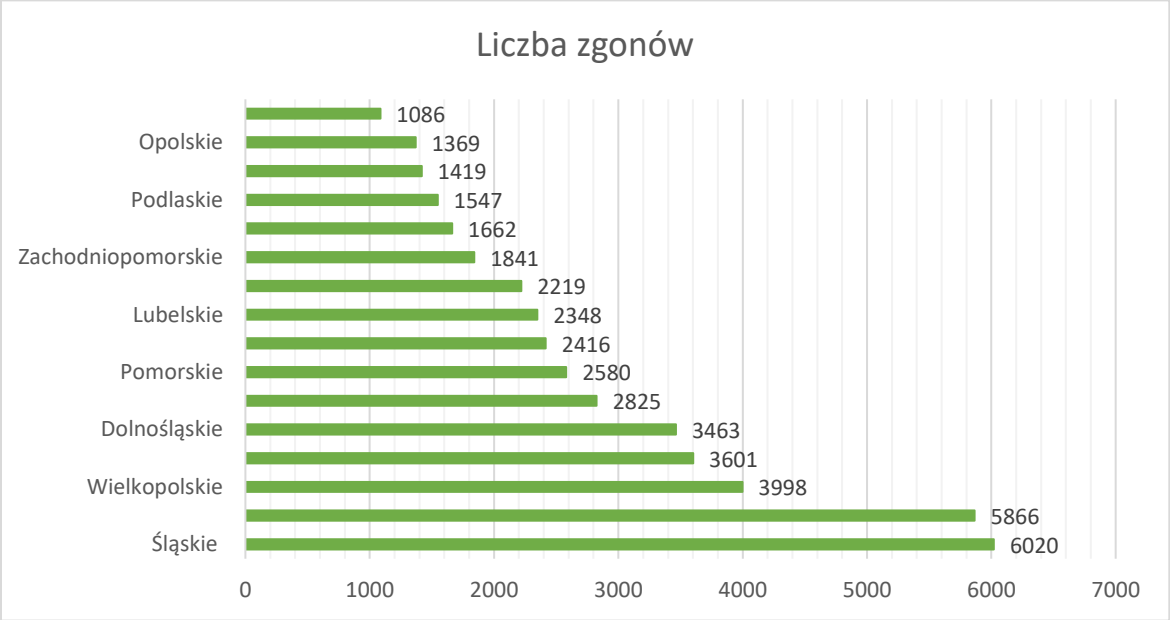
W 2018 roku rak nerki (rak nerkowokomórkowy, z ang. renal cell carcinoma - RCC) był szesnastym najczęściej występującym nowotworem, dziewiątym u mężczyzn i siedemnastym u kobiet na całym świecie (2). Rak nerki występuje częściej u mężczyzn niż u kobiet (około 1,5 : 1), najczęściej pomiędzy 60-70 rokiem życia, rzadko występuje u dzieci (3). Najwyższe wskaźniki zapadalności można odnotować w Republice Czeskiej. Podwyższone wskaźniki występują również w północnej i wschodniej Europie, Ameryce Północnej i Australii. Niskie wskaźniki zapadalności rejestruje się w dużej części Afryki i wschodniej Azji (4). Wskaźnik liczby ofiar śmiertelnych jest niższy w krajach wysoko rozwiniętych (ogólny wskaźnik śmiertelności do zapadalności: 0,4) niż w krajach o niskim lub średnim poziomie rozwoju społecznego (ogólny wskaźnik śmiertelności do zapadalności: 0,5). Wskaźniki zachorowalności i umieralności rosną w wielu krajach będących na różnych poziomach rozwoju społecznego (5).

Na podstawie danych sporządzonych przez Krajowy Rejestr Nowotworów, największą liczbę zachorowań oraz zgonów, spowodowanych nowotworem nerki w latach 1999-2016,

odnotowano w Polsce w województwie Śląskim, zaś najmniejszą w Lubuskim (rycina 1, rycina 2). Trendy czasowe od roku 1999 do 2016 roku wskazują na to, że liczba zachorowań w Polsce rośnie, jednak liczba przypadków śmiertelnych spada co może być spowodowane wcześniejszą diagnozą raka nerki oraz wprowadzaniem coraz lepszych terapii (6).



Rycina 1. Wykres liczby zachorowań w Polsce w poszczególnych województwach na nowotwór złośliwy nerki za wyjątkiem miedniczki nerkowej w latach 1999-2016 u kobiet i mężczyzn od 0 do 85+ lat w województwach w Polsce przygotowany na podstawie raportów z Krajowego Rejestru Nowotworów (6).



Rycina 2. Wykres liczby zgonów w Polsce w poszczególnych województwach na nowotwór złośliwy nerki za wyjątkiem miedniczki nerkowej w latach 1999-2016 u kobiet i mężczyzn od 0 do 85+ lat w województwach w Polsce przygotowany na podstawie raportów z Krajowego Rejestru Nowotworów (6).

1.2. Etiologia raka nerki

Palenie tytoniu wzmaga ryzyko raka nerki. Prawdopodobieństwo zachorowania na nowotwór nerki rośnie wraz z liczbą wypalanych papierosów. Ryzyko spada w pięcioletnim okresie po zaprzestaniu palenia (7,8). Prospektywne badania, porównujące związek między paleniem, a podtypami RCC wykazały, że najczęstszym podtypem raka nerki u palaczy był jasnokomórkowy (23%) i brodawkowaty RCC (26%). Rzadziej spotykane były łagodne zmiany histologiczne (14%) i chromofobowy RCC (6%) (9).

Istnieją istotne dowody na to, że otłuszczenie ciała jest również jedną z ważniejszych przyczyn występowania raka nerki. Nadwaga, a w szczególności otyłość, jest czynnikiem ryzyka raka nerki u obu płci (10). Udział wszystkich przypadków RCC przypisywanego nadwadze i otyłości, oszacowano na około 40% zarówno w Stanach Zjednoczonych i w krajach europejskich (11,12). Otyłość, która u dorosłych jest określana przez WHO, jako wskaźnik masy ciała (z ang. body mass index - BMI) $\geq$30 kg/m^2, zwiększa ryzyko RCC zarówno u mężczyzn, jak i u kobiet. Częstość występowania nadwagi (BMI $\geq$25 do <30kg/m^2) oraz otyłości wzrosła w ostatnich trzech dekadach, szczególnie w krajach rozwiniętych. W Stanach Zjednoczonych ponad jedna trzecia dorosłych i prawie 17% dzieci i nastolatków jest otyła. Rosnąca częstość występowania otyłości prawdopodobnie przyczynia się do coraz częstszego występowania raka nerkowokomórkowego. Otyłość może wywoływać uszkodzenie nerek i niedotlenienie tkanki, które mogą predysponować do powstawania nowotworu (9). Część badań kliniczno-kontrolnych wspiera tezę o pozytywnym związku między spożyciem czerwonego mięsa, a ryzykiem występowania raka nerki. Zwiększone ryzyko tego nowotworu przypuszczalnie wynika z wysokiej zawartości tłuszczu i białka w mięsie. Część badaczy stwierdziła ochronny wpływ warzyw i owoców. Jednak związki mięsa i owoców ze zwiększonym lub zmniejszonym ryzykiem raka nerki są kwestią kontrowersyjną (13). Analizy 13 prospektywnych badań z Ameryki Północnej i Europy nie wykazały związku między spożyciem czerwonego mięsa, przetworzonego mięsa, drobiu lub owoców morza, a ryzykiem raka nerkowokomórkowego (13,14).

Otyłość z połączonymi zaburzeniami endokrynologicznymi, takimi jak obniżone poziomy globuliny wiążącej hormon płciowy i progesteron, insulinooporność i zwiększony poziom czynników wzrostu (takich jak insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (z ang. insulin-like growth factor - IGF-1), mogą przyczyniać się do powstawania nowotworów nerek. Hormony steroidowe narządów płciowych także mogą wpływać na proliferację komórek nerkowych,

poprzez bezpośrednie działanie z udziałem receptorów wewnątrzwydzielniczych. Estrogeny mogą być jednak zaangażowane w mechanizm indukujący RCC u osób z nadwagą i otyłością. W kilku badaniach kohortowych odnotowano istotnie zwiększoną częstość występowania raka nerki wśród pacjentów z cukrzycą. Jednak cukrzyca może nie być niezależnym czynnikiem ryzyka z powodu silnych związków z otyłością i nadciśnieniem (15). Podwyższony poziom czynników wzrostu, ich receptorów oraz insuliny może pośredniczyć w możliwym związku między cukrzycą a rakiem nerki.

Częstość występowania raka nerki jest znacznie zwiększona u pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek (3-7%) (16). Rak nerki występujący w schyłkowej niewydolności nerek charakteryzuje się specyficznymi cechami odróżniającymi od klasycznego raka nerki m.in. mniejszą wielkością guza, mniejszą częstością przerzutów oraz rzadkim występowaniem komórek nowotworowych o klarownej cytoplazmie u osób ze schyłkową niewydolnością nerek. Uważa się, że brodawkowaty rak nerki jest najczęstszym podtypem w schyłkowej niewydolności nerek (17). Obecnie RCC związany z nabytą torbielowatą chorobą nerek, która najczęściej rozwija się u pacjentów poddawanych długoterminowej hemodializie z powodu schyłkowej niewydolności nerek, jest uważany za swój własny podtyp histologiczny, ale u innych podtypów (rak jasnokomórkowy, brodawkowaty i chromofobowy nerek) również występują torbiele. Potencjalnie torbiele hiperplastyczne nerki są zmianami prekursorowymi niektórych z typów nowotworów nerek (18).

Częstość występowania RCC jest znacznie zwiększona u osób z historią nadciśnienia tętniczego, która jest niezależna od płci, BMI, otyłości i palenia tytoniu (19). Stosowanie leków hipertensyjnych, w tym diuretyków, wiąże się dodatkowo z podwyższonym ryzykiem. Mechanizm biologiczny dla tej zależności również nie jest dobrze poznany. Część farmaceutyków została powiązana ze zwiększonym ryzykiem nowotworów nerek. Środki przeciwbólowe zawierające fenacetynę są zaangażowane w rozwój raka urotelialnego miedniczek nerkowych. Kilka badań wykazało podwyższone ryzyko raka nerki z długotrwałym stosowaniem fenacetyny (20). Wśród innych leków przeciwbólowych, w niektórych przypadkach stwierdzono związek między częstym stosowaniem paracetamolu, który jest metabolitem fenacetyny, a ryzykiem zdiagnozowania raka nerki. Istnieje również potencjalne ryzyko rozwoju tego nowotworu u osób stosujących inne niż aspiryny, niesteroidowe leki przeciwzapalne (np. ibuprofen bądź naproksen). Co ciekawe, stosowanie aspiryny i acetaminofenu nie wiąże się z ryzykiem raka nerkowokomórkowego (21).

RCC nie jest uważany za nowotwór związany z ekspozycją na czynniki kancerogenne podczas pracy. Pomimo to zostało potwierdzone, że narażenie na rakotwórcze związki arsenu

w procesach przemysłowych lub przez wodę pitną zwiększa ryzyko raka nerki o 30% (22,23). Kilka innych chemikaliów środowiskowych zostało potraktowanych jako możliwe czynniki rakotwórcze dla nerki, ale ostateczne dowody nie zostały ustalone. Należą do nich azbest, kadm, benzyna i inne produkty naftowe, ołów, pestycydy i toksyny grzybów. Do czynników powodujących raka nerki został także zakwalifikowany trichloroetylen będący rozpuszczalnikiem dawniej szeroko stosowanym jako odtłuszczacz oraz dodatek chemiczny (24,25). Metaanaliza związku między ekspozycją na trichloroetylen i jasnokomórkowym rakiem nerki wykazała istotne względne ryzyko wystąpienia tego raka (26). IARC zaklasyfikował trichloroetylen do Grupy 1 czynników rakotwórczych dla ludzi. Przypisanie do tej grupy czynników zostało potwierdzone danymi epidemiologicznymi, a także rakotwórczością rozpuszczalnika zarówno u szczurów, jak i myszy. Biotransformacja trichloroetylenu została dobrze scharakteryzowana u ludzi i zwierząt, zachodzi głównie poprzez metabolizm oksydacyjny przez enzymy cytochromu P450, powodując generowanie genotoksycznych metabolitów (27).

Około 2-3% wszystkich RCC jest dziedzicznych, opisano kilka autosomalnych zespołów dominujących, z których każdy ma odrębne podstawy genetyczne i fenotyp, a najczęstszym jest choroba von Hippel-Lindau. Pacjenci z mnogimi i obustronnymi zmianami i / lub innymi pokrewnymi chorobami powinni być badani pod kątem mutacji linii germinalnej, ponieważ ważne jest, aby zostali wcześnie rozpoznani w kierunku raka nerki (28).

1.3. Rozpoznanie

Wielu pacjentów z masami nerkowymi (z ang. renal masses - RM) nie wykazuje objawów do późnych stadiów nowotworu. Obecnie więcej niż 60% RCC wykrywane jest przypadkowo za pomocą ultrasonografii jamy brzusznej (z ang. ultrasonography - US) lub tomografii komputerowej (z ang. computer tomography - CT) wykonanej z innych przyczyn. Klasyczna triada - ból boczny, krwiomocz i wyczuwalna masa brzuszna - jest dziś rzadka i koreluje z zaawansowaniem choroby i podtypami związanymi ze złym rokowaniem (3,28,29). Zespoły paraneoplastyczne jak hiperkalcemia, gorączka o nieznanej przyczynie, erytrocytoza i zespół Stauffera (objawy cholestazy niezwiązane z naciekiem guza wątroby lub wrodzoną chorobą wątroby, które zwykle ustępują po resekcji guza nerki) występują u około 30% pacjentów z objawowymi RCC (28). U mniej niż 10% pacjentów występują

objawy wywołane przez przerzuty RCC takie jak ból kości, pogorszenie stanu sprawności lub uporczywy kaszel (30).

Przy podejrzeniu RCC powinny zostać wykonane badania laboratoryjne ilości leukocytów i płytek krwi, stosunku limfocytów do neutrofilów, stężenia kreatyniny, hemoglobiny, dehydrogenazy mleczanowej, białka C-reaktywnego i wapnia w surowicy. Niektóre z tych testów mają znaczenie prognostyczne i są wykorzystywane do oceny ryzyka w różnych prognostycznych systemach punktacji (28).

CT, US i rezonans magnetyczny (z ang. magnetic resonance imaging - MRI) to metody obrazowania stosowane do wykrywania i charakteryzowania RM. RM można sklasyfikować jako stałe lub torbielowate na podstawie wyników obrazowania. Przy stałych RM, najważniejszym kryterium różnicowania zmian nowotworowych jest obecność wzmocnienia kontrastu lub jego ograniczenia (3,28). Jednak CT i MRI nie należą do wiarygodnych metod mogących odróżnić onkocytomę od beztłuszczowego naczyniaka z nowotworami nerki. Pozytronowa tomografia emisyjna nie jest obecnie standardowym badaniem, chociaż pierwsze badania donoszą iż może być cennym narzędziem w wykrywaniu przerzutów lub nawrotów zmian u pacjentów z RCC (3,31). U chorych na RCC badanie CT klatki piersiowej jest najdokładniejszym badaniem w diagnostyce przerzutów do płuc lub powiększonych węzłów chłonnych śródpiersia. Ponieważ większość przerzutów do kości i mózgu ma charakter objawowy w momencie rozpoznania, obrazowanie kości lub mózgu wykonuje się na podstawie wskazania lekarskiego. W przypadku masy torbielowatej nerek, klasyfikacja Bosniaka rozróżnia pięć kategorii w oparciu o prezentację CT, może przewidywać ryzyko złośliwości i dostarcza wskazówek dla prowadzenia pacjenta. MRI wykazuje wyższą czułość i swoistość niż CT, jest też zalecany do oceny niejasnych zmian torbielowatych, zwłaszcza torbieli Bosniaka III kategorii. Torbiele Bośniaka I, II, IIF, III i IV kategorii są złośliwe w około, odpowiednio: 0%, 0%, 10%, 50% i 100% przypadków leczonych chirurgicznie. Ostrożna kontrola torbieli Bosniaka III kategorii jest rozsądną opcją dla przyszłego leczenia (3).

Biopsja guza nerki dostarcza histopatologicznego potwierdzenia złośliwości. Jest badaniem o wysokiej czułości i swoistości, szczególnie zalecanym przed leczeniem ablacyjnym, a także u pacjentów z chorobą przerzutową, przed rozpoczęciem leczenia ogólnoustrojowego. Komplikacje takie jak krwawienie lub wysiewanie guza są bardzo rzadkie. (32), podczas gdy dokładność diagnostyczna pozostaje wysoka (33). Ostateczne rozpoznanie histopatologiczne, klasyfikacja i ocena czynników prognostycznych są oparte na próbce z nefrektomii.

1.4. Histopatologia i klasyfikacja raka nerki

Nowotwory nerki obejmują szerokie spektrum jednostek histopatologicznych opisanych wg klasyfikacji WHO w 2016 (4). Między podtypami RCC istnieją różnice w stopniu zaawansowania nowotworu i przeżycia specyficznego dla nowotworu, które mają wpływ na jego rokowanie. Rozpoznanie histologiczne obejmuje, oprócz typu RCC, ocenę cech jądra, jąderek, cech sarkomatoidalnych, inwazję naczyniową, martwicę nowotworu, gromadzenia się tłuszczu okołonaczyniowego oraz stan węzłów chłonnych. Zróżnicowanie sarkomatoidalne można znaleźć we wszystkich podtypach RCC, określa ono guzy o wysokim stopniu złośliwości i bardzo agresywne. Czteropoziomowy system oceniania WHO / ISUP (z ang. International Society of Urological Pathology) zastąpił system klasyfikacji Fuhrman'a (34).

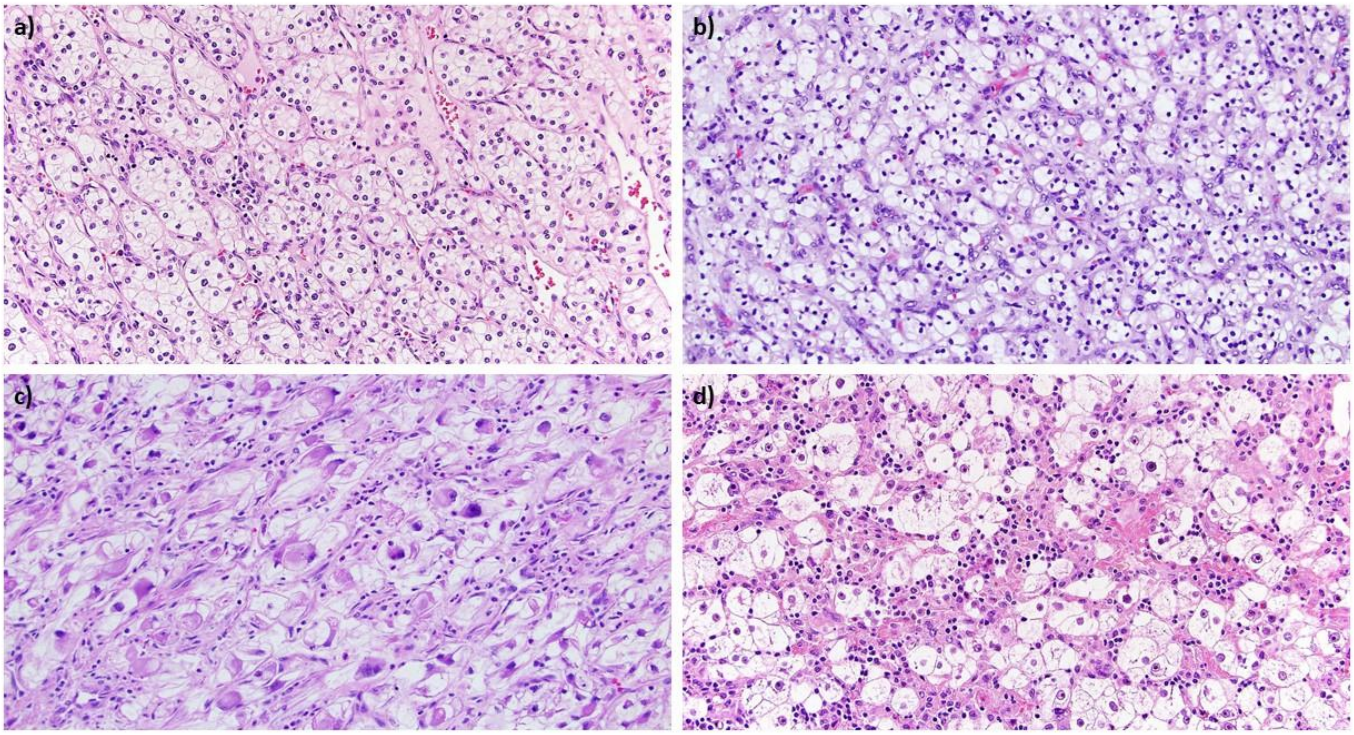
1.4.1. Jasnokomórkowy rak nerki

Jasnokomórkowy rak nerki (z ang. clear cell renal cell carcinoma – ccRCC) dawniej zwany gruczolakorakiem jasnokomórkowym nerki bądź guzem Grawitza jest morfologicznie niejednorodną grupą złośliwych nowotworów, składających się z komórek z klarowną lub eozynofilową cytoplazmą. ccRCC stanowi 65-70% wszystkich raków nerek (4). Około 60-80% przypadków ccRCC zostaje wykryta przypadkowo podczas badania US, CT lub MRI. Najczęstsze objawy raka nerki (w objawowych przypadkach) to krwiomocz i ból w okolicy lędźwiowej. Utrata masy ciała i gorączka występują w późnych stadiach nowotworu. ccRCC to zazwyczaj samotne guzy korowe, które występują równie często w obu nerkach, jednak wieloogniskowość i/lub obustronność występują w mniej niż 5% przypadków. Wieloogniskowość, obustronność i wczesny wiek zachorowania są typowe dla dziedzicznych zespołów nowotworowych, takich jak zespół von Hippel-Lindau (35). Guzy te są zwykle guzami kulistymi wystającymi z kory nerkowej. Granica z nerką jest wyraźna, odznaczona charakterystyczną pseudotorebką. Guzy mogą być bardzo duże. Wykrywanie małych zmian wzrasta w krajach, w których procedury radiologiczne są szeroko stosowane. Można zauważyć wrastanie do zatoki i żyły nerkowej, szczególnie w przypadku dużych guzów. ccRCC są zazwyczaj złocistożółte, ze względu na wysoką zawartość lipidów w ich komórkach. Cysty, martwica i ogniska krwotoczne są równie częste. W niektórych przypadkach może wystąpić zwapnienie i kostnienie. ccRCC najczęściej przerzutuje przez żyły zatoki nerkowej, żyły nerkowe i żyły wewnętrzne, co prowadzi do rozwoju przerzutów do płuc (36,37).

Najczęstszymi miejscami przerzutów ccRCC są płuca (45%), kości (30%) oraz węzły chłonne (22%). Przerzuty do wątroby odnotowano u 20% pacjentów, a przerzuty do nadnerczy u 9% pacjentów. Przerzuty do mózgu również występują u około 9% pacjentów (38).

Rak jasnokomórkowy nerki jest najbardziej różnorodnym typem RCC pod względem budowy komórki. Cytoplazma komórek ccRCC jest zwykle wypełniona lipidami i glikogenem, które są rozpuszczane przez rutynowe przetwarzanie histologiczne tworząc wyraźną, klarowną cytoplazmę. Jednakże, obecność klarownych komórek nie jest unikalna dla ccRCC, można je także zaobserwować w papilarnym RCC, chromofobowym RCC i RCC związanym z translokacją czynników transkrypcyjnych z rodziny MiT (39). Wiele ccRCC zawiera komórki z cytoplazmą eozynofilową. Jest to szczególnie powszechne w guzach o wysokim stopniu złośliwości i sąsiadujących z obszarami martwicy lub krwawienia. W dobrze zachowanych preparatach, jądra wydają się okrągłe z równomiernie rozłożoną chromatyną. Jądro może być niepozorne i małe bądź duże i wyraźne. Czasami mogą występować nietypowe jądra lub bardzo duże jądra pozbawione jąderek (40,41).

Przykładowe preparaty histologiczne ccRCC w różnym stopniu zaawansowania zostały przedstawione na rycinie 3 (42).



Rycina 3. Przykłady obrazów histopatologicznych ccRCC: a) stopień 1 ccRCC; b) stopień 2 ccRCC; c) stopień 3 ccRCC; d) stopień 4 ccRCC (42).

Większość ccRCC wiąże się z niewielką reakcją zapalną; niezbyt często występuje naciek intensywnie limfocytarny lub neutrofilny (43).

1.4.2. Rokowanie i czynniki prognostyczne

Rokowanie u pacjentów z ccRCC jest najdokładniej prognozowane na podstawie badania patomorfologicznego (44). Wśród nowotworów tego samego stadium parametry prognostyczne to: stopień złośliwości guza, obecność martwicy oraz różnicowanie sarkomatoidalne i rabdoidalne (45). Zróżnicowanie sarkomatoidalne i rabdoidalne w ccRCC jest związane ze złym rokowaniem; 5-letnie przeżycie dla pacjenta z nowotworem ze zmianami sarkomatoidalnymi wynosi 15-22%. Obecność martwicy guza ma niezależne znaczenie prognostyczne (45). Ogólnie, martwica guza większa niż 10% całkowitej jego objętości jest związana z mniej korzystnym rokowaniem. W przypadku guzów stopnia 1 i 2 wg TNM objętość martwicy nie może przekraczać 20% jego całkowitej objętości (46). System klasyfikacji ccRCC, jak opisano wcześniej, powinien jednak opierać się na systemie zaproponowanym przez WHO/ISUP.

Biomarkery immunohistochemiczne i molekularne były szeroko badane jako potencjalne czynniki prognostyczne dla ccRCC, ale nie są one rutynowo stosowane w praktyce klinicznej, ponieważ posiadają one ograniczoną swoistość w stosunku do komórek nerki (47).

1.4.3. Podstawy molekularne ccRCC

Wraz z rozwojem technologii sekwencjonowania, wiele badań skupiło się na mechanizmie molekularnym nowotworów. Istnieją dowody na to, że niektóre ważne geny odgrywają kluczowe role w nowotworze ccRCC, takie jak częste mutacje lub metylacja genu supresorowego guza VHL oraz częste mutacje genów *PBRM1* (z ang. protein polybromo-1), *BAP1* (z ang. BRCA1 associated protein-1), *SETD2* (z ang. SET domain containing 2) i *KDM5C* (z ang. lysine-specific demethylase 5C) (48,49).

Gen *VHL* został pierwotnie zidentyfikowany jako gen odpowiedzialny za zespół predysponujący z ccRCC - von Hippel-Lindau. Funkcja genu *VHL* została szeroko opisana. Jest to mały gen, który koduje 854 nukleotydów na trzech eksonach i jest odpowiedzialny za kodowanie białka VHL. Białko VHL tworzy kompleks z białkami - elonginą C i B, Cul-2 (z ang. cullin 2) i celuje w podjednostki alfa m.in. HIF (z ang. hypoxia-inducible factor) -1α i HIF- 2α. Jednak takie geny jak *GLUT1* (z ang. glucose transporter 1 - czynnik transportujący

glukozę), czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (z ang. vascular endothelial growth factor - VEGF), naskórkowy czynnik wzrostu (z ang. epidermal growth factor - EGF) oraz transformujący czynnik wzrostu alfa (z ang. transforming growth factor alpha - TGF-α) również biorą udział w regulacji HIF. Ekspresja tych genów wzrasta w raku jasnokomórkowym po inaktywacji genu *VHL* (50).

Geny *VEGF*, biorące przede wszystkim udział w limfoangiogenezie, są najchętniej badanymi, a przez to najlepiej poznanymi genami. Mają duże znaczenie w rozwoju nowotworów oraz tworzeniu przerzutów do węzłów chłonnych. Najlepiej zwalidowany układ molekularnej sygnalizacji limfoangiogenezy guza, obejmuje wydzielanie białka VEGF-C i VEGF-D, które indukują wzrost naczyń limfatycznych, poprzez aktywację ich liganda VEGFR-3 (z ang. vascular endothelial growth factor receptor), który jest zlokalizowany na powierzchni limfatycznych komórek śródbłonka. Szereg badań eksperymentalnych na modelach zwierzęcych wykazał, że oś VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 może promować limfoangiogenezę guza i przerzuty komórek nowotworowych do układu limfatycznego, przez wzmaganie limfatycznego wzrostu komórek śródbłonka i migracji (51). Dane literaturowe dotyczące ekspresji VEGF-C w ccRCC są kontrowersyjne, głównie sugerują, że VEGF-C odgrywa niewielką rolę w progresji RCC. Część badań wykazała, że VEGF-C i VEGFR-3, ulegają ekspresji w normalnych tkankach nerki i raka nerkowokomórkowego, chociaż wzrost ekspresji VEGF-C i VEGFR-3 nie jest znacząco wyższy w nowotworze, w porównaniu z prawidłową tkanką nerek. Ponadto, ekspresja VEGF-C i VEGFR-3 nie różniła się pomiędzy najczęstszymi podtypami ccRCC i papilarnym RCC i nie miała korelacji z parametrami kliniczno-patologicznymi, takimi jak stopień lub rozmiar nowotworu (52). Z drugiej strony ostatnie badania sugerują, że rozproszony VEGFC w barwieniach cytoplazmatycznych korelował ze znacznie krótszym całkowitym czasem przeżycia pacjentów z ccRCC, sugerując aktywację różnych mechanizmów w postępie tego guza (53).

TGF-α i EGF z kolei są regulowane przez inne białka m.in. białka ADAM (z ang. a disintegrin and metalloprotease domain). Geny z tej rodziny są również zaangażowane w adhezję komórek i sygnalizację komórkową. Inna funkcja białek ADAM polega na ich zdolności do działania jako ligandy dla integryn, poprzez konkurowanie z innymi białkami macierzy. Ludzki genom zawiera 21 białek ADAM oraz 4 pseudogeny. 13 z białek ADAM wykazuje aktywność proteolityczną np. ADAM 8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 28, 33 zaś osiem - nie proteolityczną. Ponadto ostatnie badania wykazały, że kilka białek z tej rodziny jest silnie eksprymowanych w komórkach nowotworowych, chociaż informacje na temat funkcji ADAM w guzach są nadal ograniczone (54,55). Kilka proteolitycznych białek ADAM, w tym ADAM8, ADAM9,

ADAM12, ADAM15, ADAM17, ADAM19 i ADAM28, ulega nadekspresji w guzach ludzkich i są związane ze wzrostem i progresją guza. Proteolityczne ADAM solubilizują wiele cząsteczek adhezji komórkowej, w tym L-selektynę, cząsteczkę adhezyjną komórek L1 (z ang. L1 cell adhesion molecule - L1-CAM), VCAM1 (z ang. vascular cell adhesion molecule 1), HCAM (z ang. homing cell adhesion molecule), E-kadherynę i N-kadherynę (56). Badania wykazały, że ADAM28, który ma dwie alternatywne izoformy, prototypową postać zakotwiczoną w błonie (z ang. membrane-anchored - ADAM28m) i postać wydzielniczą (z ang. secreted ADAM28 -ADAM28s), ulega wysokiej ekspresji w ludzkim niedrobnokomórkowym raku płuca i raku sutka. Poziom ekspresji mRNA białka ADAM28 jest również zwiększony w raku nerkowokomórkowym. ADAM28 przyczynia się także do proliferacji komórek nowotworowych poprzez zwiększoną biodostępność IGF-I, selektywnie trawiąc białko IGF 3 (z ang. insulin-like growth factor-binding protein) kompleksu IGF-I / IGFBP-3. Jednak substraty związane z przerzutami i mechanizmami molekularnymi, dzięki którym ADAM28 promuje przerzuty, pozostają nieznane (55). ADAM28 uczestniczy także w proteolizie kompleksu CTGF/VEGF, skutkując uwolnieniem aktywnego naczyniowo-nabłonkowego czynnika wzrostu. W rezultacie prowadzi to do neoangiogenezy, uważanej za krytyczny punkt postępu rozwoju nowotworów (57).

Cząsteczka adhezyjna komórek nerwowych (z ang. neural cell adhesion molecule - NCAM, CD56), należy do dużej rodziny glikoprotein na powierzchni komórek i odgrywa ważną rolę podczas rozwoju i kontroli różnych funkcji w układzie nerwowym. NCAM ma wysoką ekspresję w nowotworach neuroendokrynnych i neuroektodermalnych. W nerkach NCAM jest szeroko eksprymowany podczas rozwoju guza. Pełni funkcję m.in. w: migracji, proliferacji, apoptozie i transformacji nabłonkowo-mezenchymalnej. Jednak nie określono jeszcze dokładnych mechanizmów przekazywania sygnałów molekularnych (58,59).

Lepsze zrozumienie szlaków molekularnych, które prowadzą do pojawienia się i wzrostu guza, może pomóc w opracowaniu nowych strategii wczesnego wykrywania i leczenia raka nerki.

1.4.4. Środowisko immunologiczne ccRCC

ccRCC jak każdy nowotwór posiada złożone środowisko, w skład którego wchodzą transformowane komórki, nacieki zrębowe i immunologiczne. Naciek komórek immunologicznych jest bardzo duży w ccRCC. Badania wykazały, że wskaźnik aktywności cytolitycznej w ccRCC był najwyższy pośród 17 innych ludzkich nowotworów. Niektórzy też

uważają, że spontaniczna regresja obserwowana tylko w 1% przypadków tego typu nowotworu jest zależna od układu odpornościowego (60).

ccRCC niestety słabo reaguje na konwencjonalną chemioterapię oraz radioterapię, ze względu na swoje unikalne środowisko i cechy biologiczne (61).

Pomimo, że niektórzy badacze twierdzą o niezależności ccRCC od układu immunologicznego warto zaznaczyć, że to właśnie ccRCC był jednym z pierwszych nowotworów złośliwych, który pozytywnie zareagował na immunoterapię interleukinę-2 (IL-2) i interferonem α (IFN-α). Niestety mechanizmy spontanicznych remisji czy odpowiedzi na immunoterapię tego nowotworów są wciąż słabo poznane (60,62).

Mikrośrodowisko immunologiczne ccRCC może być modyfikowane poprzez metabolizm komórek nowotworowych. Pobierając i katabolizując składniki odżywcze komórki nowotworowe wytwarzają biomasę lub energię, eksportują metabolity do zrębu nowotworu zmieniając przez to jego mikrośrodowisko a tym samym wpływając na populacje i funkcje komórek odpornościowych. Zmienia się przede wszystkim metabolizm komórek immunologicznych jak i zostaje zapoczątkowana specyficzna sygnalizacja związana z podziałem, aktywacją i śmiercią komórek (63).

Za pośrednictwem nowotworu w immunosupresji biorą udział różne rodzaje komórek układu immunologicznego w tym m.in. limfocyty T regulatorowe, makrofagi związane z nowotworem (TAM z ang. tumor associated macrophage) czy komórki surpresorowe pochodzące z mieloidu (MDSC z ang. myeloid-derived suppressor cells). Część badań potwierdziła związek pomiędzy ilością zakumulowanych komórek układu odpornościowego a poziomami ekspresji niektórych cytokin. Guan i in. potwierdzili korelację pomiędzy podgrupami MDSC a zwiększonym poziomem ekspresji IL-17, IL-18 i CCL(z ang. chemokine (C-C motif) ligand) 2 w miąższu ccRCC oraz krwi obwodowej pacjentów z pierwotnym ccRCC jak również koreluje z gorszym rokowaniem rozwoju raka (64).

Wpływ cytokin na RCC skupia na sobie dużą uwagę naukowców. Powstaje co raz więcej publikacji dotyczących wpływu cytokin na proliferację i progresję komórek tego nowotworu oraz doszukujących się w nich roli potencjalnych markerów diagnostycznych, predykcyjnych i prognostycznych w RCC (62).

Jedną z ważniejszych cytokin sprzyjających rozwojowi ccRCC jest interleukina -6 (IL-6), która produkowana jest przez komórki immunologiczne infiltrujące nowotwór, komórki zrębu i przez same komórki nowotworowe. Jej wysoka ekspresja może aktywować ścieżki sygnałowe PI3K / Akt / mTOR i RAS / RAF / MEK / ERK. Indukowana przez IL-6 aktywacja szlaku AKT / mTOR bierze udział w ochronie przed apoptozą i wzmożonej proliferacji

w komórkach nowotworowych. Razem z białkiem STAT3 (z ang. signal transducer and activator of transcription 3) tworzy specyficzną oś, odpowiedzialną za aktywację genów docelowych zaangażowanych w przeżycie komórek nowotworowych i ich wzmożoną proliferację IL-6 aktywuje komórki poprzez receptor transbłonowy (IL-6R) i jego rozpuszczalną postać (sIL-6R). Rozpuszczalny receptor IL-6sR jest uwalniany z receptora związanego z błoną IL-6 (IL-6R) m.in. poprzez zrzucanie ektodomen przez enzymy należące do rodziny genów ADAM: ADAM-17 i ADAM-10 [26]. IL-6R natomiast ulega ekspresji głównie w hepatocytach, megakariocytach i kilku subpopulacjach leukocytów (monocyty, neutrofile, komórki T i komórki B), które są głównymi komórkami docelowymi aktywności IL-6. Sygnalizacja przez związaną z błoną IL-6R prowadzi do aktywacji układu odpornościowego indukując gorączkę, wydzielając białko ostrej fazy i stymulując limfocyty B w celu wytworzenia przeciwciał. IL-6 wiążąc się ze swoim receptorem, indukuje ekspresję genów STAT3. STAT3 promuje inwazję oraz angiogenezę nowotworu poprzez pobudzenie ekspresji VEGF i metaloproteinaz macierzy, ale przede wszystkim promuje ekspresję IL-6. Wysoki poziom IL-6 w surowicy pacjentów z ccRCC powiązany jest ze złym rokowaniem choroby. Zwiększone wydzielanie IL-6 może być także spowodowane przez immunoterapie interferonem alfa czy TKI. Badania potwierdzają, że ekspresja IL-6 jest wyjątkowo wysoka w linii komórkowej 786-O - komórkach pierwotnego raka jasnokomórkowego nerki (61,62,65). Zwiększoną ekspresję IL-6 odnotowano także u pacjentów z przerzutowym RCC. Jej wysoki poziom korelował z gorszymi wynikami przeżycia, większą częstością przerzutów do węzłów chłonnych i przerzutów odległych, natomiast ilość IL-6 w surowicy mieszcząca się w zakresie referencyjnym u pacjentów przed nefrektomią korelował z dłuższym czasem przeżycia (62).

Drugą ważną cytokiną w środowisku ccRCC jest IL-17. Rzeczywiście, oprócz IL-6 i TNF, wykazano, że sekrecja IL-17 jest znacznie podwyższona w tkance RCC, a jego ekspresja zależy od stopnia złośliwości nowotworu (64).

Opisano także, że interleukina-18 stymuluje ekspresję hematopoetycznych cytokin i czynników wzrostu, takich jak IL-3, IL-6, G-CSF (z ang. granulocyte colony-stimulating factor) i GM-CSF (z ang. granulocyte macrophage colony-stimulating factor), które regulują rozwój neutrofili i różnicowanie komórek krwiotwórczych. Wiele badań wykazało kluczową rolę IL-18 w aktywacji komórek odpornościowych i progresji nowotworu. Suplementacja interleukiny-18 znacząco zwiększa immunosupresyjną aktywność MDSC. Ponieważ MDSC mają szeroki zakres efektów w progresji raka i przerzutach, zasugerowano, że IL-18 może mieć pewien wpływ na biologię MDSC w ccRCC. Stwierdzono również, że ilość MDSC koreluje z poziomami wewnątrznowotworowymi IL-17, IL-18 i CCL2, co sugeruje, że te cytokiny

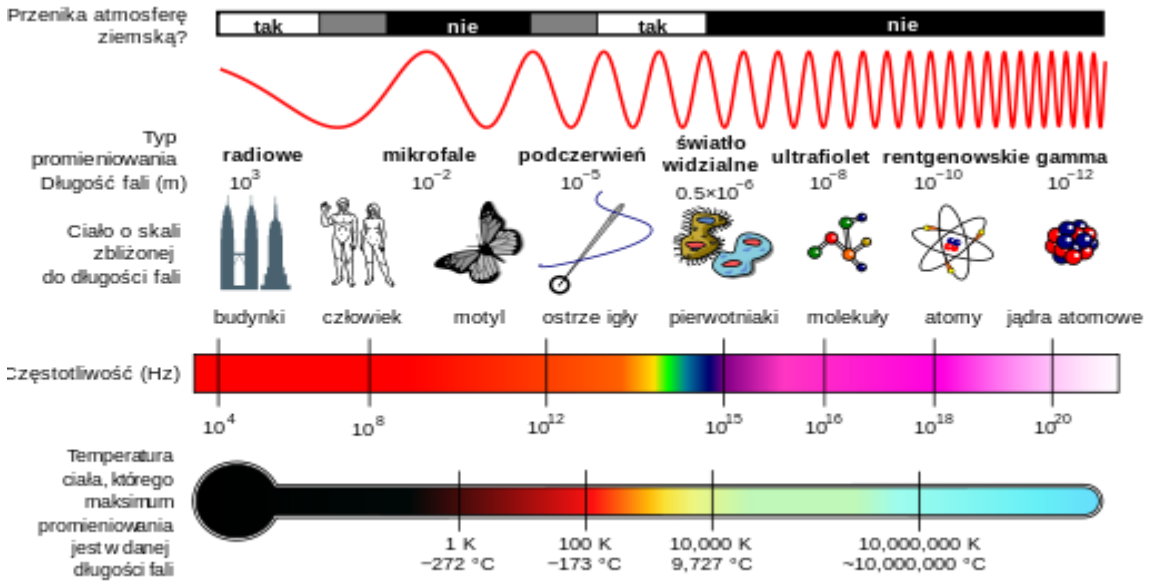
sprzyjają akumulacji MDSC w miąższu gospodarza ccRCC, a MDSC zostały wciągnięte do miąższu guza RCC przez te czynniki w środowisku nowotworów (64).

IL-8 pierwotnie znana jako czynnik chemotaktyczny i zapalny neutrofili, okazała się być silnym promotorem angiogenezy ccRCC. Jej zwiększoną ekspresję potwierdzono w komórkach nowotworowych ccRCC gdzie w jego mikrośrodowisku może działać jako kluczowy czynnik regulacyjny. IL-8 indukując neutrofile może powodować ich naciek do zrębu, indukuje także wiele szlaków sygnałowych poprzez wiązanie się z receptorem chemokin C-X-C 1 i 2 (CXCR1 i CXCR2 z ang. C-X-C motif chemokine receptor) na komórkach rakowych i komórkach śródbłonka. Ponadto komórki ccRCC mogą być pobudzane do wydzielania IL-8 poprzez indukcję IL-17 z limfocytów T wpływających bezpośrednio na nowotwór. Niestety jak w większości przypadków, kliniczne znaczenie IL-8 i podstawy molekularne związane z wydzielaniem tej cytokiny oraz korelacją z progresją guza pozostaje w dużej mierze nieznane, choć pojawiają się pierwsze doniesienia o jego zastosowaniu do stratyfikacji pacjentów o różnych rokowaniach po resekcji chirurgicznej (66).

Rola cytokin w zaburzeniach złośliwych jest podwójna. Z jednej strony cytokiny mogą hamować namnażanie komórek rakowych poprzez kontrolowanie stanu zapalnego i odporności. Z drugiej strony komórki rakowe mogą wykorzystywać cytokiny do sprzyjania rozwojowi i progresji nowotworów. Ważnym jest poznanie roli każdej cytokiny w środowisku nowotworowym oraz ich mechanizmów molekularnych mających wpływ na mikrośrodowisko ccRCC.

2. Promieniowanie elektromagnetyczne

Promieniowanie elektromagnetyczne (PEM; electromagnetic field – EMF) jest wytwarzane przez naturalne oraz sztuczne źródła promieniowania, różniące się od siebie długością fali, częstotliwością bądź energią fotonów. Widmo elektromagnetyczne rozciąga się od statycznego pola elektrycznego i magnetycznego do pola elektrycznego i magnetycznego o niskiej częstotliwości (niska energia, duża długość fali), pola elektromagnetycznego pośredniego i pola radiowego, mikrofalowego, promieniowania optycznego (podczerwień, światło widzialne, promieniowanie ultrafioletowe) i promieniowania jonizującego (wysoka energia, bardzo krótka długość fali). Widmo PEM przedstawiono na rycinie 4 (67).



Rycina 4. Widmo pola elektromagnetycznego pokazujące typ, długość fali (z przykładami), częstotliwość, temperaturę emisji czarnego ciała (67).

Pole elektromagnetyczne o bardzo niskiej częstotliwości (z ang. extremely low frequency electromagnetic field - ELF-EMF) to pole o częstotliwości 0-300 Hz generowane głównie przez linie elektroenergetyczne. Indukcja magnetyczna podczas ekspozycji na pole elektromagnetyczne o bardzo niskiej częstotliwości wynosi zwykle poniżej 0,1 μT. Niewielki ułamek gospodarstw domowych znajdujących się bardzo blisko linii wysokiego napięcia lub innych źródeł może mieć znacznie większe narażenie na EMF. Wyższe, ale krótkotrwałe narażenia występują, gdy używane są urządzenia elektryczne, mogą występować w określonych kategoriach prac, na przykład przez elektryków i inżynierów elektryków (5).

Przyjmuje się, że żadne badania nie wykazały, że pole elektromagnetyczne bezpośrednio wpływa na organizm, wywierając chroniczny wpływ na nasze zdrowie. Zależność między EMF, a jego działaniem na ludzki organizm, stała się jednym z głównych tematów badań dotyczących problemów zdrowotnych (zwłaszcza raka) wywołanych przez pole elektromagnetyczne.

Badania epidemiologiczne konsekwentnie odnotowują pozytywne powiązanie pola elektromagnetycznego o bardzo niskiej częstotliwości z białaczką dziecięcą, z pozornie 2-krotnie wyższym ryzykiem przy średnim poziomie ekspozycji 24-godzinnym przekraczającym indukcję magnetyczną 0,3-0,4 μT (68) . Jednak związek przyczynowy nie został ustalony, ze względu na możliwą stronniczość badaczy i zakłóceń w badaniach obserwacyjnych oraz brak dowodów potwierdzających z badań eksperymentalnych (69).

W ocenie z Monarchy IARC z 2001 r. ELF-EMF, statyczne pole elektryczne i magnetyczne zostały zakwalifikowane do Grupy 3, co oznacza brak wystarczającej liczby dowowdów naukowych pozwalających na sklasyfikowanie czynnika pod wzklędem rakotwórczości. Od 2001 r. przeprowadzono niewiele badań związanych z tymi ocenami i żadne z nich nie daje podstaw do ponownej oceny, co ostatnio znalazło odzwierciedlenie podczas posiedzenia panelu ekspertów Komisji Europejskiej (5).

Z badań wynika, że jeśli komórki nowotworowe poddane ekspozycji na pole elektromagnetyczne to zostanie rozpoczęta ich apoptoza, nie powodując jednocześnie martwicy komórek (70).

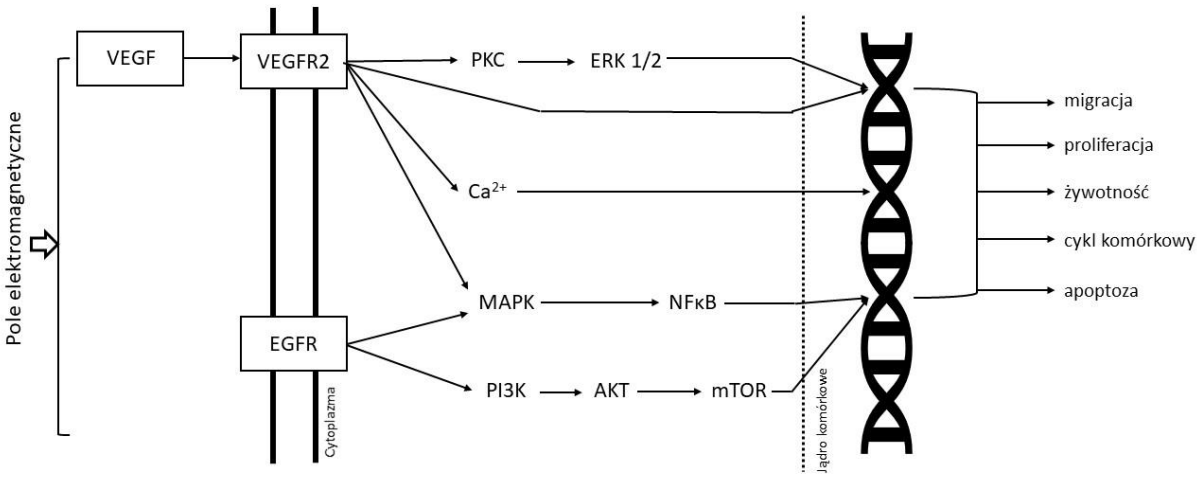
Wykazano, że ekspozycja na pole elektromagnetyczne o bardzo niskiej częstotliwości (<300 Hz) może wpływać na wiele aktywności komórkowych, w tym ekspresję genów. Biorąc pod uwagę, że komórki wykorzystują prąd elektryczny, wydaje się, że różne gęstości strumienia indukcji magnetycznej, częstotliwości i schematy ekspozycji na PEM mogą indukować różne odpowiedzi komórkowe na poziomie mRNA. PEM został ostatnio uznany za obiecujące narzędzie medyczne ze względu na jego antyproliferacyjny wpływ na komórki rakowe i jego wielki potencjał w zakresie dostarczania leków (71).

Ponadto nie jest jasne, w jaki sposób ELF-EMF wpłynęłoby na zachowanie komórek. Prawdopodobną i interesującą hipotezą jest to, że mogą zakłócać reakcje chemiczne związane z produkcją reaktywnych form tlenu (reactive oxygen species - ROS). ROS są nie tylko szkodliwe dla struktur komórkowych, ale również mają zasadnicze znaczenie dla sygnalizacji komórkowej. Przy wysokich poziomach ROS może prowadzić do upośledzenia funkcji fizjologicznych komórek poprzez uszkodzenie DNA, białek, fosfolipidów i innych makrocząsteczek. Odwrotnie, przy niskich poziomach, ROS może zmieniać

wewnątrzkomórkowe stany redoks aktywujące szlaki wrażliwe na redoks, w tym szlak kinazy białkowej aktywowanej mitogenem (z ang. mitogen-activated protein kinases - MAPK) i PI3K (z ang. phosphoinositide 3-kinase), w następstwie również szlak mTOR (z ang. mammalian target of rapamycin kinase) (72,73).

Mechanizmy molekularne wyjaśniające biologiczny wpływ działania EMF zostały zbadane na różnych liniach komórkowych w ścisłym zakresie parametrów działania pola elektromagnetycznego. Proponuje się, że ekspozycja na EMF zmniejsza proliferację komórek poprzez zwiększenie ich apoptozy w wyniku zależnego od EMF wzrostu reaktywnych form tlenu, szybkiego napływu jonów Ca^{2+} lub aktywacji specyficznych szlaków sygnałowych (74). ELF-EMF wpływa także na sygnalizację NF-κB (z ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), PKC (z ang. protein kinase C) i ERK (z ang. extracellular signal-regulated kinases) 1/2, morfologię błony komórkowej i aktywność kinaz i szlaku cyklu komórkowego (rycina 5) (75,76).

Niektórzy badacze sugerują niespecyficzne procesy, takie jak wytwarzanie ciepła, tworzenie wolnych rodników lub promowanie tworzenia uszkodzeń DNA. Jednak energia zwykle związana z ELF-EMF nie jest wystarczająca do spowodowania takich zmian w wiązaniach chemicznych. Żaden z tych mechanizmów nie wyjaśnia jednak różnic w odpowiedzi na EMF pomiędzy rakiem a komórkami niezłośliwymi (77).



Rycina 5. Szlaki sygnałowe aktywowane przez ELF-EMF. Opracowanie własne na podstawie danych uzyskanych z KEEG PATHWAY Database *(76)*.

ELF-EMF wpływa także na komórki układu odpornościowego powodując zmiany molekularne i komórkowe (78). Wpływ PEM na układ odpornościowy, tak jak wykazano w większości badań, zależy w dużej mierze od częstotliwości, amplitudy, czasu ekspozycji jak i cech biologicznych badanych komórek (79). Część badaczy podejrzewa jednak, że ELF-EMF przez swój niski poziom energii nie ma znacznego wpływu na układ immunologiczny człowieka, pomimo że moduluje trwające odpowiedzi zapalne (80). Niewiele badań określiło wpływ ELF-EMF na stężenie cytokin produkowanych przez komórki nowotworowe bez stymulacji układu odpornościowego. Większość badań obejmuje sprawdzenie ich poziomu w surowicy (81). Badania Nie i in. sugerują, że ekspozycja myszy na PEM o niskiej częstotliwości hamuje proliferację i nowotworzenie u tych zwierząt poprzez spadek poziomu IL-6 uważanej za cytokinę prozapalną działająca jako regulator proliferacji komórek nowotworowych. Podobnie było w przypadku G-CSF, który odpowiada za promocję angiogenezy nowowtworów. Z kolei poziom IL-12, cytokiny przeciwnowotworowej odpowiedzialnej za eleminację komórek nowotworowych, znacznie rósł (82). W części opisanych prac wskazano na przeciwnowotorowe działanie ELF-EMF (79) chociażby ze względu na obniżanie poziomu m.in. IL-9 będącej cytokiną, która przyczynia się do chorób zapalnych i autoimmunizacji, jak i TNF-α, która koordynuje reakcje komórkowe i organizuje miejscowe zapalenie (81).

Ponieważ cytokiny grają istotną rolę w kontroli rozwoju nowotworów, ważnym jest zbadanie efektów działania ELF-EMF na funkcje immunologiczne komórek nowotworowych także bez stymulacji układu odpornościowego.

3. Cele badawcze

3.1. Założenia

Pole elektromagnetyczne jest integralną częścią środowiska naturalnego człowieka. Naturalne PEM jest wynikiem jonizacji zewnętrznej warstwy atmosfery, magnetycznych właściwości Ziemi, istnienia radiogwiazd i wielu innych czynników. W ostatnich dziesięcioleciach znacząco wzrosło nasycenie środowiska życia ludzi sztucznymi źródłami PEM. Rozwój nowych technologii oraz przemysłu, sprzyja wzrostowi liczby oraz różnorodności źródeł pola elektromagnetycznego w naszym środowisku. Głównym źródłem PEM są linie wysokiego napięcia, sprzęty AGD i RTV, telefony komórkowe, jak również radiostacje i urządzenia radiolokacyjne (83). W dzisiejszych czasach rosnącego użycia sprzętów elektronicznych naukowcy są co raz bardziej zainteresowani efektami działania PEM na zdrowie ludzi. Pomimo tego, że przeprowadzono już wiele badań o wpływie PEM, żadne z nich nie wykazało znaczącego wpływu na ssaki, w tym ludzi, szczególnie na osobniki narażone na działanie pola w dawkach, które są uznawane za dopuszczalne (do 500 Hz dla pracowników przebywających w środowisku pola elektromagnetycznego) (84). IARC z 31 maja 2011 roku zaklasyfikowała PEM jako możliwie kancerogenny czynnik (85). Pomimo tego terapeutyczne właściwości PEM zostały niejednokrotnie potwierdzone naukowo m.in. w leczeniu bólu dolnej części pleców, stwardnienia rozsianego, urazów stawów i ścięgien, regeneracji nerwów w chorobie Parkinsona i Alzheimera. PEM wpływa także pozytywnie na wrodzoną odpowiedź immunologiczną (86–88).

Jak dotąd nie przeprowadzono badań sprawdzających wpływ ekspozycji PEM na linie komórkowe raka jasnokomórkowego nerki oraz jego wpływ na ekspresję oraz potencjalną zmianę w sekwencji genów charakterystycznych dla tego nowotworu.

W swojej pracy postawiłam trzy hipotezy badawcze:

1. Ekspozycja komórek raka jasnokomórkowego nerki na pole elektromagnetyczne powoduje zmiany w ekspresji genów *VEGFC, ADAM 28, NCAM1*.
2. Ekspozycja komórek raka jasnokomórkowego nerki na pole elektromagnetyczne powoduje zmianę profilu sekrecji cytokin komórek nowotworowych.
3. Potencjalna zamiana ekspresji genów *VEGFC, ADAM28, NCAM1* spowodowana PEM może prowadzić do zmian czynnościowych w badanych komórkach.

3.2. Szczegółowe cele badawcze

Plan badań obejmował następujące zadania badawcze:

a) Analiza wpływu pola elektromagnetycznego na potencjalne zmiany funkcjonalne badanych komórek.

Celem zadania badawczego było określenie morfologii, żywotności, apoptozy, zdolności migracyjnych i inwazyjnych oraz określenie ilości wygenerowanych reaktywnych form tlenu w hodowlach komórek nabłonka nerki ludzkiej oraz w trzech liniach komórek raka nerki poddanych ekspozycji na pola elektromagnetycznego o częstotliwości 50 Hz i indukcji magnetycznej 4,5 mT przez 30 min przez 5 dni. Badanie to miało na celu określenie różnicy pomiędzy komórkami z grupy kontrolnej, a komórkami z grupy badanej poddanym ekspozycji PEM.

b) Analiza wpływu pola elektromagnetycznego na stężenie cytokin oraz chemokin przy użyciu platformy Bio-Plex

Celem zadania badawczego było porównanie poziomu sekrecji cytokin i chemokin przez badane linie komórkowe poddanych na ekspozycję pola elektromagnetycznego. Badanie to miało na celu określenie różnicy pomiędzy komórkami z grupy kontrolnej, a komórkami z grupy badanej poddanej ekspozycji ELF-EMF.

c) Analiza wpływu pola elektromagnetycznego na zmianę ekspresji genów *VEGFC, ADAM28 i NCAM1* w badanych liniach komórkowych

Celem zadania badawczego było porównanie ekspresji genów *VEGFC, ADAM28 i NCAM1* w hodowlach komórek nabłonka nerki ludzkiej oraz w trzech liniach komórek raka nerki poddanych na ekspozycję pola elektromagnetycznego. Badanie to miało na celu określenie różnicy pomiędzy komórkami z grupy kontrolnej, a komórkami z grupy badanej wystawionymi na ekspozycję PEM.

4. Materiały i metody

4.1. Materiał

Do doświadczeń użyto następujących linii komórkowych adherentnych:

- HEK293 – komórki nabłonka nerki ludzkiej zarodkowej (rycina 8),
- 786-O - komórki pierwotnego raka jasnokomórkowego nerki (rycina 9),
- 769-P - komórki pierwotnego raka jasnokomórkowego nerki (rycina 10),
- Caki1 – linia wyprowadzona z przerzutu raka jasnokomórkowego nerki do skóry (rycina 11).

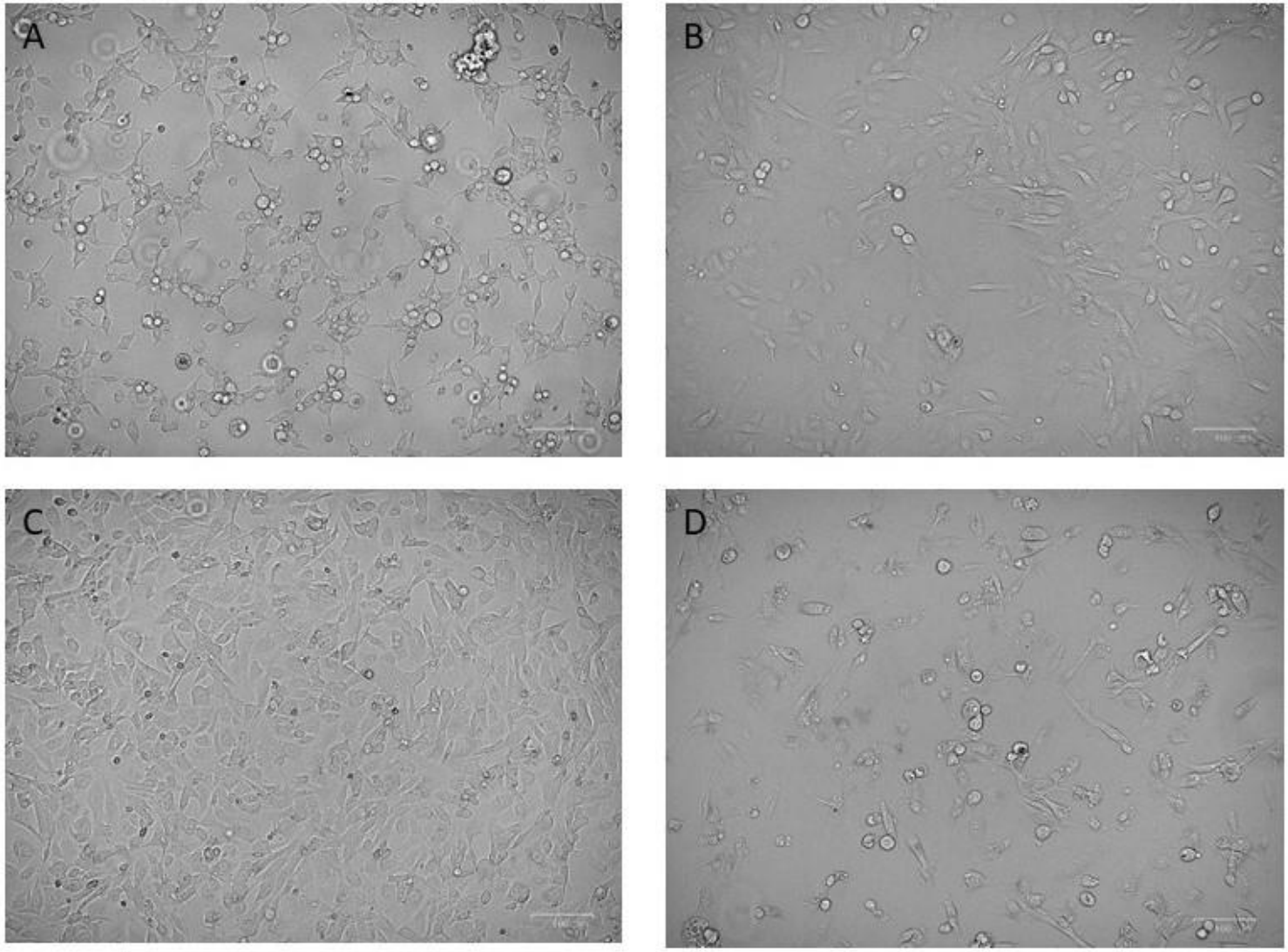
Linia 786-O, została ustanowiona jako jedna z pierwszych linii komórkowych RCC, posiada wiele cech ccRCC i jest wykorzystywana najczęściej w badaniach skoncentrowanych na RCC. Ta linia charakteryzuje się przede wszystkim hipetrtriploidami w kariotypie. Jak większość linii komórkowych ccRCC 786-O posiada mutację w genie *VHL* oraz wysoką ekspresję VEGF. Linia komórkowa 769-P, została wyprowadzona jednocześnie z 786-O i podobnie jak ona posiada mutację w genie *VHL* oraz wysokie poziomy ekspresji VEGF (89,90). Populacja komórek modalnych, które wystąpiły w 32% komórek linii 769-P, posiada kariotyp pseudodiploidalny, 46, XX, 3,18, del (7) (q21.12; q22.3),? T (3q? 18q). W metafazie zarówno chormosom 3 jak i 18 posiadają tylko jedną kopię, zaś chromosom X jest sparowany (89).

Caki-1 jest rozpowszechnioną linią modelową przerzutowego ccRCC. Linia ta została również zaproponowana jako modelowy układ nabłonka kanalika proksymalnego, ponieważ w kulturze komórki mogą tworzyć spolaryzowaną warstwę o cechach morfologicznych, fizjologicznych i biochemicznych funkcjonalnej, dobrze zróżnicowanej tkanki nerkowej (90). Kariotyp Caki-1 jest aneuploidalny, z liczbą choromosomów w zakresie triploidalnym oraz z brakującym chromosomem Y, pomimo wywodzenia się z linii nowotworowej męskiej. Chromosom 9 jest trisomiczny. Zidentyfikowano dla tej linii trzynaście chromosomów markerowych m.in. 9q +, t (1p ;?), t (1qter> 1q21 :: 20), t (1q17q), der (11) t (3; 11) (q21; q14), 19q +, 4q +, 4p + (91). W kariotypie 786-O, 769-P i Caki 1 potwierdzono również straty w 3p (zawierający geny *VHL*, *PBRM1, BAP1, SETD2*) i 14q (kodujący gen *HIF1*) (90).

Wszystkie linie komórkowe zostały pozyskane z banku komórek American Type Culture Collection (ATCC; www.atcc.org).

4.2 Hodowla komórkowa

Wszystkie linie komórkowe zakupione w ATCC otrzymano w formie zamrożonej. Komórki rozmrożono i wysiano na butelkę hodowlaną w 12 ml pełnej pożywki RPMI-1640 (10% FBS i 1% penicyliny i streptomycyny, wszystkie odczynniki pochodziły od firmy Gibco, ThermoFisher Polska). Komórki były inkubowane w inkubatorze w temperaturze 37^{o}C oraz w obecności 5% CO_2 w powietrzu (ASSAB CO_2-incubator, KEBO Lab Export). Pożywkę wymieniano co 2 dzień na świeżą, do czasu osiągnięcia 80% konfluencji. Następnie komórki odklejano za pomocą trypsyny, przepłukano z użyciem PBS 1X (Gibco, ThermoFisher), odwirowano (5min, 1500rpm) i wysiano do nowej butelki 1/5 komórek i hodowano jak wyżej. Komórki po minimum jednym pasażu od rozmrożenia wykorzystywano do doświadczeń. Komórki wysiewano do płytek 6-dołkowych, po 25 tys. komórek na dołek. Płytki zawierające komórki przyporządkowywano odpowiednia do grupy kontrolnej (poddawanej takiej samej procedurze co grupa badana, ale bez ekspozycji na PEM) lub do grupy badanej (poddawanej PEM). Pożywki w obu płytkach, były wymieniane co drugi dzień. Morfologię wszystkich linii komórkowych przedstawiają zdjęcia na rycinie 6, 7, 8 i 9 (wykonane za pomocą mikroskopu ZOE Fluorescent Cell Imager, Bio-Rad.1).



Rycina 6. Komercyjnie dostępne linie komórkowe: a) HEK293; b)786-O; c)769-P; d) Caki1. Wszystkie zdjęcia wykonano w powiększeniu 100x.

4.3 Metody

4.3.1 Warunki ekspozycji na PEM o niskiej częstotliwości

Komórki z grupy badanej poddano ekspozycji na pole elektromagnetyczne przy użyciu cewki Helmholtza o parametrach pozwalających zaobserwować zmiany unikając, jednocześnie efektu termalnego wywołanego przez PEM. Parametry ekspozycji zostały dobrane na podstawie dostępnych danych literaturowych. Częstotliwość wynosiła 50 Hz, zaś indukcja magnetyczna 4,5 mT. Komórki poddawano ekspozycji 30 min dziennie przez 5 dni w temperaturze pokojowej. W tym samym czasie pozostała część komórek traktowanych jako grupa kontrolna była również przechowywana w temperaturze pokojowej Komórki z obu płytek piątego dnia, bezpośrednio po zakończonej ekspozycji, odklejono przy użyciu trypsyny (Gibco, ThermoFisher Polska). Po zebraniu komórek ze wszystkich dołków zostały one zliczone przy pomocy licznika komórek T20 z dodatkiem 10% trypanu (Bio-Rad, Polska), a następnie wykorzystane do doświadczeń.

4.3.2. Test żywotności i proliferacji

By ocenić aktywność enzymatyczną procesów utleniania i redukcji w odniesieniu do kontroli, świadczących pośrednio o liczbie komórek, dla każdej linii komórkowej został wykonany test z użyciem rezasuryny (In vitro TOX8, Sigma). Linie komórkowe z grupy kontrolnej oraz badanej wysiewano na płytkę 96-dołkową, by po 72 h inkubacji dodać 10% roztwór rezasuryny w pełnej pożywce RPMI 1640 do dołka hodowlanego. Próbę ślepą stanowiły dołki z pożywką hodowlaną nie zawierające komórek. Tak przygotowana płytkę inkubowano (37°C, 5% CO2) przez 3 godziny. Po upływie tego czasu odczytywano absorbancję przy długości fali 570 nm a następnie przy długości fali 600 nm w spektrofotometrze FLUOstar Omega (BMG Labtech). Następnie przeprowadzano analizę uzyskanych wyników według zamieszczonego poniżej wzoru.

$$\%\ żywotności = \frac{średnia\ absorbancja\ komórek\ poddanych\ PEM}{średnia\ absorbancja\ komórek\ z\ hodowli\ kontrolnej} \times 100\%$$

4.3.3. Test wiszącej kropli

Z każdej linii komórkowej z obu grup przygotowano zawiesinę 500 tys. komórek w jednym ml pożywki. Następnie 10 µl (2 mln komórek/ ml) pożywki zawierającej komórki dodano na pokrywkę szalki Petriego w siedmiu powtórzeniach. Pokrywki z kroplami odwracano i umieszczano na szalce wypełnionej PBS. Do testu wiszącej kroli (ang. *hanging drop assay*) został wykorzystany protokół opisany przez Foty (92) Szalki inkubowano w 37^{o} C przez 2 dni. Zdjęcia wykonywano po 24, 48 i 72h inkubacji. za pomocą mikroskopu Delta-Optical IB-100 by porównać czas powstania, morfologię oraz wielkość agregatu (powiększenie 4x).

4.3.4. Test migracji i inwazji

By zbadać zdolności migracyjne oraz inwazyjne badanych linii komórkowych wykorzystany został protokół przygotowany przez Justus i in. (93). Komórki przygotowano tak jak opisano wcześniej w punkcie 4.3.1., by następnie zawiesić 10^6 komórek w 1ml medium RPMI 1640 z 1% FBS i 1% penicyliny i streptomycyny. Z każdej linii komórkowej, zarówno z grupy kontrolnej i badanej, przygotowano 6 powtórzeń do testu migracji oraz inwazji na płytkach 24 dołkowych. Do testu inwazji na powierzchni insertów została wcześniej dodana warstwa 50 µl Matrigel (Coating Matrix Kit, Gibco, ThermoFisher, Polska) i potem inkubowano 30 min w 37°C i 5% CO_2 przez 30 min. Zarówno w teście migracji i inwazji po 100 µl zawiesiny komórkowej dodano na powierzchnię insertu o średnicy porów 8 µm w 24-dołkowej płytce (HTS Multiwell Insert System 8.0 um pore size, 24 Multiwell format, Corning) i inkubowano przez 10 minut w 37°C i 5% CO_2, aby umożliwić komórkom osiadanie. Gdy komórki osiadły dodano 600 µl RPMI 1640, z dodatkiem 10% FBS oraz 1% penicyliny i streptomycyny, na dno dolnej komory. Płytki inkubowano przez 48h w 37°C i 5% CO_2, zaś po tym czasie medium z dołka oraz insertu zostało usunięte a następnie komórki utrwalono w 600 µl 70% etanolu przez 10 min. Po upływie tego czasu, etanol usunięto a płytki pozostawiono do wyschnięcia. Następnie 600 µl 0,2% fioletu krystalicznego (Acros Organics, Polska) dodano do dna dołków płytek i umieszczono w nim inserty. Płytki inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut po czym delikatnie usunięto fiolet krystaliczny z górnej części membrany za pomocą bawełnianego aplikatora. Bardzo ostrożnie, aby uniknąć zmywania adherentnych komórek, zanurzono membranę w roztworze PBS (Gibco,

ThermoFisher Polska) 5 razy by usunąć nadmiar fioletu krystalicznego. Dno dołków insertu również przemyto delikatnie pięciokrotnie roztworem PBS by nie zmyć komórek. Płytkę pozostawiono do wyschnięcia a później pod mikroskopem Delta Optical IB-100 policzono liczbę komórek w różnych polach widzenia (średnia z 5 pól przy całkowitym powiększeniu 40x) z dna dołków płytki oraz insertów, aby uzyskać średnią sumę komórek, które migrowały przez błonę w kierunku chemoatraktanta i przyłączyły się na dolnej stronie błony.

4.3.5. Analiza cytometryczna cyklu komórkowego

Do pomiaru ilości DNA, umożliwiającego badanie populacji komórek utrwalonych z grupy kontrolnej oraz grupy poddanej ekspozycji na ELF-EMF w różnych fazach cyklu komórkowego został wykorzystany test FxCycle PI / RNase (Thermo Scientific, Polska). Zebrane oraz policzone komórki z obu grup rozdzielono do probówek cytometrycznych w trzech powtórzeniach po 500 tys. komórek a następnie utrwalono je w 70% metanolu przez 15min. By pozbyć się środka utrwalającego przed przystąpieniem do barwienia komórki przepłukano roztworem PBS, odwirowano i zdekantowano supernatant. Pozostawiony osad komórek zawieszono w 500 µl barwnika FxCycle PI/RNase. Wszystkie próbki dokładnie wymieszano i inkubowano przez 30 min w temperaturze pokojowej, chroniąc przed światłem. Jodek propidyny wiązał się z DNA oraz z RNA, jednak by odróżnić barwienia została użyta w tym celu RNaza znajdująca się roztworze. Gdy barwnik jest związany z kwasami nukleinowymi, jego fluorescencja jest zwiększona od 20 do 30 razy. Po upływie czasu inkubacji, próbki bez przemywania, zanalizowano na cytometrze FACSCalibur (Becton Dickinson, Polska) z użyciem programu Cell Quest przy użyciu lasera o długości fali 488 nm.

4.3.6. Analiza cytometryczna apoptozy

By zbadać apoptozę komórek został użyty zestaw Annexin V/ and PI (Invitrogen, ThermoFisher, Polska). Komórki obu grup po zakończonej ekspozycji zostały zebrane i policzone jak w punkcie 4.3.1. Zawiesinę 10^6 komórek/ml w trzech powtórzeniach przemyto roztworem zimnego PBS oraz odwirowano, zaś w kolejnym kroku przemyto 1x roztworem Binding Buffer, odwirowano i zdekantowano supernatant. Osad zawieszono w 190 µl 1x roztworu Binding Buffer by w dalszej kolejności dodać 10 µl aneksyny V celem oznakowania komórek apoptycznych. Próbki inkubowano przez 10 min w temperaturze

pokojowej po czym ponownie przemyto 1x roztworem Binding Buffer i odwirowano. Po dekantacji supernatantu osad zawieszono w 195 µl 1x roztworu Binding Buffer, następnie dodano 5 µl 100 µg/mL PI by zabarwić komórki martwe. Próbki zworteksowano po czym poddano analizie na cytometrze FACSCalibur (Becton Dickinson, Polska) z użyciem programu Cell Quest.

4.3.7. Analiza cytometryczna ilości wyprodukowanych reaktywnych form tlenu

Stres oksydacyjny wynika z nierównowagi pomiędzy wytwarzaniem reaktywnych form tlenu (ROS) a zdolnością komórek do ich szybkiej detoksykacji. ROS odgrywają ważną rolę w postępie wielu chorób, w tym chorób nowotworowych (94). Do pomiaru stresu oksydacyjnego w żywych komórkach użyto sond fluorogennych CellROX Green Reagent (Thermo Fisher, Polska).

Po zakończonej ekspozycji do wszystkich dołków z obu płytek dodano odczynnik CellROX® o końcowym stężeniu 5 µM, natomiast dodatkowo do trzech dołków z płytek z grupy kontrolnej 3% H_2O_2. Płytki inkubowano jeszcze przez 30 minut w 37°C, potem zebrano poprzez odklejenie trypsyną, przemyto trzykrotnie roztworem PBS a na końcu zawieszono w 300 µl PBS. Tak przygotowanie probówki poddano analizie na cytometrze FACSCalibur (Becton Dickinson, Polska) z użyciem programu Cell Quest.

4.3.8. Analiza poziomu cytokin przy użyciu Bio-Plex

Dzięki rozpuszczalnym czynnikom, w tym cytokinom, które są wytwarzane m.in. przez komórki nowotworowe, układ odpornościowy jest w stanie zachować homeostazę poprzez sygnały aktywujące i hamujące jednocześnie dostosowując reakcję na sygnały środowiskowe (79). Nowoczesne platformomy takie jak Bio-Plex firmy Bio-Rad pozwala na jednoczesne oznaczenie do 100 białek, peptydów i kwasów nukleinowych w pojedynczej próbce. Ta technika obejmuje 100 kolorowych zestawów kulek utworzonych przy użyciu dwóch barwników fluorescencyjnych w różnych proporcjach. Kulki są sprzężone z odczynnikiem specyficznym dla konkretnego testu biologicznego. Odczynniki mogą obejmować antygeny, przeciwciała, oligonukleotydy, substraty enzymatyczne lub receptory. W tej technologii jedno przeciwciało określonego analitu jest przyłączone do zestawu kulek o tym samym kolorze,

a drugie przeciwciało służy do oznaczenia ilościowego związanego antygenu. Zastosowanie różnokolorowych kulek umożliwia jednoczesne wykrywanie wielu różnych analitów w tej samej próbce. Następnie stosuje się obrazowanie lub wzbudzenie laserowe by na podstawie kolorów kulek określić stężenie analitu poprzez pomiar fluorescencji barwnika reporterowego. System Bio-Plex 200 łączy w sobie 2 lasery (czerwony 635 nm oraz zielony 532 nm), wysokoprzepustową technologię strumieniową i cyfrowe przetwarzanie sygnału w czasie rzeczywistym, rejestrując sygnały fluorescencyjne jednocześnie dla każdej kulki, przekształcając je na dane dla każdego testu. Testy xMAP mogą zawierać niemagnetyczne lub magnetyczne kulki jako podłoża. Magnetyczne kulki COOH są najnowszymi podstawowymi składnikami testów xMAP, wykazujące zarówno właściwości fluorescencyjne, jak i magnetyczne. Kulki wybarwione są preparatem barwnika fluorescencyjnego zastrzeżonym dla Luminex. Proces barwienia obejmuje pęcznienie cząstek kulek w rozpuszczalniku zawierającym barwnik, umożliwiając cząsteczkom barwnika przeniknąć przez powłokę lub warstwę polimeru. Usunięcie rozpuszczalnika w kolejnym etapie powoduje kurczenie się kulek i zatrzymywanie cząsteczek barwnika w ich środku (95).

W celu wykonania tego badania, każdego dnia bezpośrednio po zakończeniu ekspozycji zostały zebrane nadsącze grupy badanej oraz kontrolnej a następnie zamrożone w -80^{o}C do czasu wykonania analizy. Do badań zostały wykorzystane dwa zestawy: Bio-Plex Pro TGF-β Panel 3-Plex (Bio-Rad) i Bio-Plex Pro Human Cytokine Grp I Panel 27-Plex (Bio-Rad). Zestaw Bio-Plex Pro TGF-β Panel 3-Plex pozwalał na określenie stężenia: TGF-β1, TGF-β2 i TGF-β3. Wszelkie czynności były wykonywane zgodnie z zaleceniami producenta. Przed przystąpieniem do testu do 50µl supernatantu medium każdej badanej próbki dodano 10µl 1N HCl a następnie inkubowano mieszaninę przez 30min w temperaturze pokojowej. Po upływie tego czasu zneutralizowano próbki dodając 10µl mieszaniny 1,2N NaOH/0.5 HEPES, potem zaś dodano 130µl medium RPMI-1640 jako rozpuszczalnika. Na płytkę, na której zostały dodane wcześniej magnetyczne kulki przeniesiono po 50µl rozcieńczonych próbek i inkubowano przez 2h. Kulki przemyto i ponownie inkubowano 1h z 25 µl przeciwciałem wykrywającym. Kulki następnie ponownie przemyto i inkubowano z 50 µl 2 µg / ml streptawidyny-fikoerytryny (SA-PE) rozcieńczonej w buforze przez 30 minut. Kulki przemyto ostatni raz i zawieszono w 125 µl buforu testowego do analizy za pomocą systemu Bio-Plex 200. Wszystkie testy przeprowadzono w temperaturze pokojowej i chroniono przed światłem. Wszystkie etapy płukania przeprowadzono za pomocą buforu do płukania z automatyczną myjką do płytek (stacja myjąca Bio-Plex Pro ™ II, Bio-Rad). Krzywe kalibracji

ustalono za pomocą 9 kalibratorów w 2-krotnych seriach rozcieńczeń i wykorzystano do określenia stężenia białek.

Przy użyciu tej samej technologii został wykorzystany zestaw Bio-Plex Pro Human Cytokine Grp I Panel 27-Plex, dzięki któremu został określony poziom następujących cytokin:

- IL-1β
- interleukin 1 receptor antagonist α (IL-1ra)
- IL-2
- IL-4
- IL-5
- IL-6
- IL-7
- IL-8
- IL-9
- IL-10
- IL-12(p70)
- IL-13
- IL-15
- IL-17
- fibroblast growth factor (FGF)
- Eotaxin
- G-CSF
- GM-CSF
- IFN-γ
- interferon-inducible protein (IP)-10
- monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1)
- macrophage inflammatory protein 1α (MIP-1α)
- MIP-1β
- platelet-derived growth factor (PDGF-BB)
- regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted (RANTES)
- TNF-α
- VEGF

Również i w przypadku tego testu wszelkie czynności były wykonywane zgodnie z zaleceniami producenta. Do wcześniej dodanych i przemytych kulek magnetycznych dodano 50 µl próbki rozcieńczonej w rozcieńczalniku do próbek przez 1 godzinę. Kulki przemyto i inkubowano z 25 µl przeciwciała wykrywającego przez 30 minut. Kulki następnie ponownie przemyto i inkubowano z 50 µl 2 µg / ml streptawidyny-fikoerytheriny przez 10 minut. Kulki przemyto ostatni raz i zawieszono w 125 µl buforu testowego do analizy za pomocą systemu Bio-Plex 200. Wszystkie testy przeprowadzono w temperaturze pokojowej i chroniono przed światłem. Wszystkie etapy płukania również przeprowadzono przy pomocy buforu do płukania z automatyczną myjką do płytek. Krzywe kalibracji ustalono za pomocą 9 kalibratorów w 2-krotnych seriach rozcieńczeń i wykorzystano do określenia stężenia białka.

Analizę danych przeprowadzono w systemie Bio-Plex 200 w połączeniu z oprogramowaniem Bio-Plex Manager w wersji 6.1.1 przy użyciu 5-parametrycznego (5-PL) nieliniowego modelu

dopasowania krzywej regresji logistycznej (Bio-Rad). Zgodnie z informacją o multipleksowym teście immunologicznym Bio-Rad Bio-Plex (http://www.bio-rad.com/en-us/applications-technologies/bio-plex-multiplex-immunoassay), w tym badaniu czułość testu zdefiniowano jako stężenie analitu odpowiadające medianie intensywności fluorescencji (MFI) tła plus dwa odchylenia standardowe (SD) średniego MFI tła.

4.3.9. Izolacja RNA

Komórki z grupy kontrolnej oraz badanej, bezpośrednio po zakończeniu ekspozycji zostały zebrane metodą enzymatyczną by wykorzystać je do izolacji RNA zestawem Total RNA mini kit (AA Biotechnology), zgodnie z zaleceniami producenta. Komórki odklejano trypsyną, przepłukiwano PBS, a następnie osad komórek lizowano odczynnikiem Fenozol Plus, pipetując oraz inkubując próby w 50^{o}C przez 5 min. Następnie dodawano wodę jałową i inkubowano przez 5 min w celu wytrącenia białek i DNA. Próby wirowano przez 15 min w 12000 rpm i do otrzymanego supernatant zawierającego RNA dodano w stosunku 1:1 izopropanol.

Próbki nakładano na kolumny ze złożem krzemionkowym i wirowano. RNA związane ze złożem płukano 3 krotnie buforem płuczącym, a następnie eluowano z kolumny wodą wolną od RNaz. Stężenie oczyszczonego RNA określano w czytniku spektrofotometrycznym DeNovix DS-11 Spectrofotometer, mierząc absorbancję przy długościach fali 230, 260 i 280 nm. Ślepą próbę stanowiła woda wolna od RNaz. Miarą czystości kwasów nukleinowych był stosunek absobrancji (A) fali o długości 260 nm do absobrancji fali 230 nm, oraz A 260/280. Otrzymane RNA przechowywano w -80^{o}C do czasu kolejnych analiz.

4.3.10. Analiza ekspresji genów metodą Real-Time-PCR

By przeprowadzić reakcję Real-Time PCR koniecznym było przepisać wyizolowany RNA na cDNA.Syntezę cDNA wykonywano przy pomocy zestawu TransScriba firmy AA Biotechnology. Wyizolowany RNA (2,5 μg) inkubowano z uniwersalnymi starterami oligo(dT)$_{18}$ w temperaturze 65^{o}C przez 5 minut w celu denaturacji matrycowego RNA. Następnie dodawano odwrotną transkryptazę, inhibitor, mieszaninę dNTP oraz bufor reakcyjny. Następnie przeprowadzano reakcję odwrotnej transkrypcji przez 60 min w temperaturze 42^{o}C w objętości 20 μl. Reakcję kończono przez podgrzewanie przez 5 min w temperaturze 70^{o}C. Wszystkie inkubacje przeprowadzano w termocyklerze T100 firmy Bio-

Rad. Otrzymany cDNA wykorzystywano w Real-Time-PCR, w której używano zestaw Sensitive RT HS-PCR Mix SYBR.

Do analizy ekpresji genów: *VEGFC, ADAM28, NCAM1* oraz dwóch genów referencyjnych: *GAPDH, RPL30* (sekwencja primerów została przedstawiona w Tabeli 1.) przygotowywano płytki 96-dołkowe o przezroczystych, cienkich ściankach do których dodawano odpowiednie primery w stężeniu 1 μM, mieszaninę Master Mix zawierającą niespecyficzny barwnik SYBR Green i 1 μg cDNA uzyskanego w poprzedniej reakcji. Próbę ślepą stanowiły próbki w których zamiast cDNA dodawana była woda wolna od nukleaz.

Tabela 1. Sekwencje wybranych primerów użytych do badania RT-PCR.

Nazwa genu	Forward primer	Reverse primer
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
RPL30	ACAGCATGCGGAAAATACTAC	AAAGGAAAATTTTGCAGGTTT
VEGFC	AATCACACTTCCTGCCGATG	TCTTGTTCGCTGCCTGACAC
ADAM28	GGCTGTTCAACCCCAAGAGATGAG	TTTGGATTTGAGTCCTTAGGTGTAGAC
NCAM1	GGAATTAGAGGAGCAGGTCACTCTTAC	GATGCTCTTCAGGGTCAGCGAC

Uzyskane roztwory umieszczano w termocyklerze CFX Connect Real-Time System firmy Bio-Rad i przeprowadzano reakcję RT-PCR w warunkach: 95^{o}C 20 s, 54^{o}C 20 s, 72^{o}C dla *GAPDH* i *VEGFC* przez 35 cykli. Dla genów *RPL30, ADAM28* i *NCAM1* reakcję RT-PCR przeprowadzono w następujących warunkach: 95^{o}C 20 s, 58,5^{o}C 20 s, 72^{o}C przez 35 cykli. Barwnik SYBR Green emitował światło po związaniu się z nowopowstającymi niciami DNA, aż do momentu całkowitej zakończenia reakcji.

Analizę uzyskanych wyników przeprowadzono w programie Microsoft Excel 2016 według zamieszczonych poniżej wzorów:

1. Wyliczanie różnicy dla poszczególnych prób pomiędzy wartościami Cq Real- Time PCR przebiegającej dla genu badanego (Cq genu badanego) i wybranego genu referencyjnego (Cq ref).

$$\Delta Cq \text{ (próba nieznana)} = Cq \text{ genu badanego} - Cq \text{ ref}$$

2. Ze wszystkich prób dla danego genu była wyciągana średnia (śrΔCq)

$$Średnia\ ekspresja = \frac{\Delta Cq1 + \Delta Cq2 + \cdots + \Delta Cqn}{n}$$

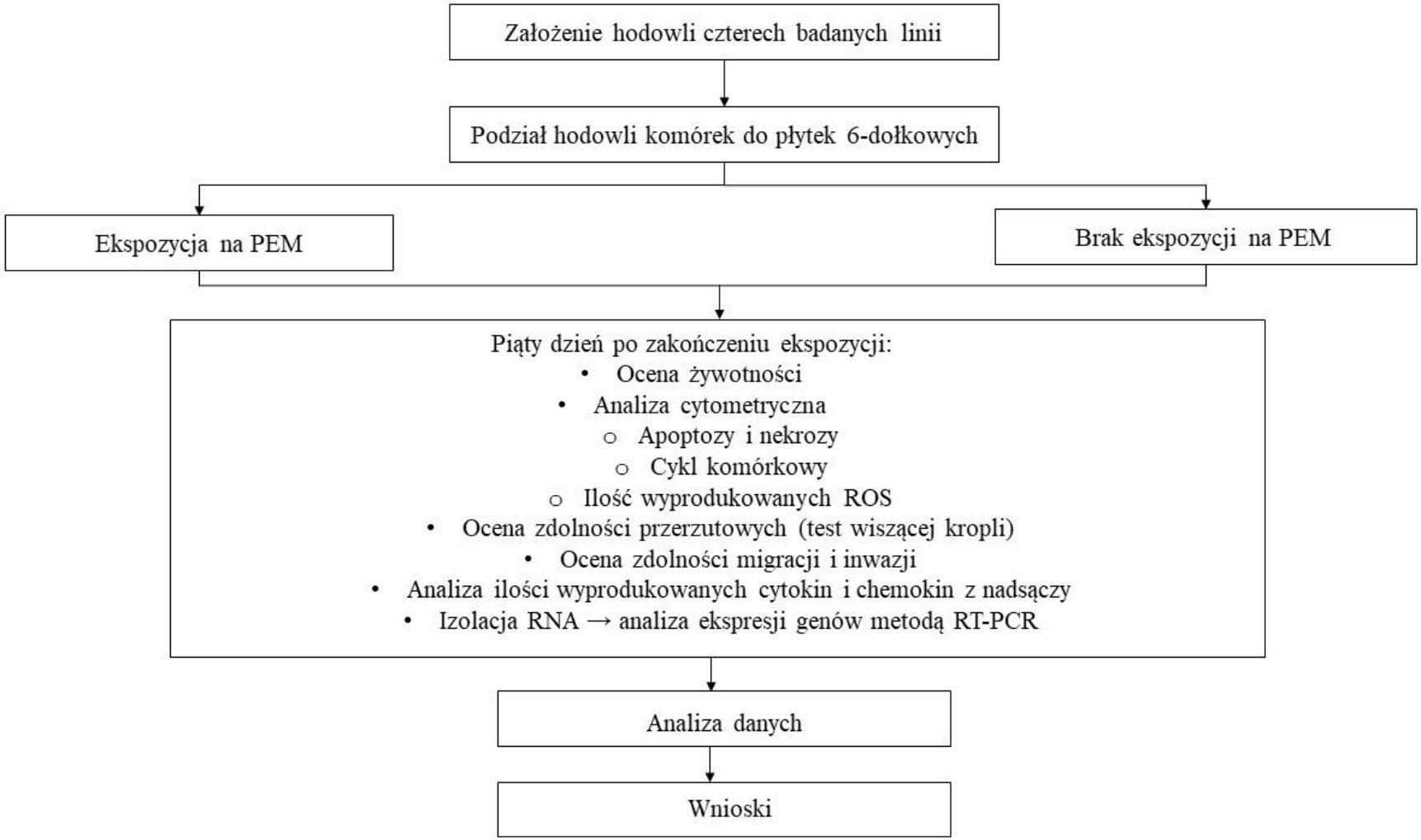
3. Obliczanie znormalizowanej wartości względnego poziomu ekspresji badanego genu w próbie nieznanej badanej względem kalibratora genu referencyjnego

$$R = 2^{-śr\Delta Cq}$$

4.4. Analiza statystyczna

Ze względu na to, że uzyskane zbiory danych są różne, wymagały one zastosowania odpowiednio dobranych testów. Ocena dystrybucji danych za pomocą testu Shapiro-Wilka wykazała rozkład normalny uzyskanych wyników. Statystyczna ocena uzyskanych wyników została przeprowadzona przy pomocy dwustronnej analizy wariancji (ANOVA) dla wyników badań cytometrycznych, analizy wyników migracji, inwazji oraz RT-PCR została przeprowadzona z użyciem testu t-Studenta. Ocena dystrybucji analizy stężeń cytokin i chemokin oraz wielkości sfer w badaniu wiszącej kropli wykazała rozkład nienormalny, dlatego do analizy wyników został użyty test Mann-Whitney'a. Wyniki przedstawiono jako średnią ± odchylenie standardowe. Wyniki na poziomie $p<0,05$ uznano za statystycznie istotne. Do przeprowadzenia obliczeń statystycznych użyto oprogramowania GraphPad Prism ver. 7 (La Jolla, CA, USA) oraz Microsoft Excel 2016. W opisach wyników wyrażenie „w stosunku do kontroli" oznacza kontrolę wewnętrzną, którą jest dana populacja komórek niepoddana ekspozycji na PEM.

5. Schemat badań



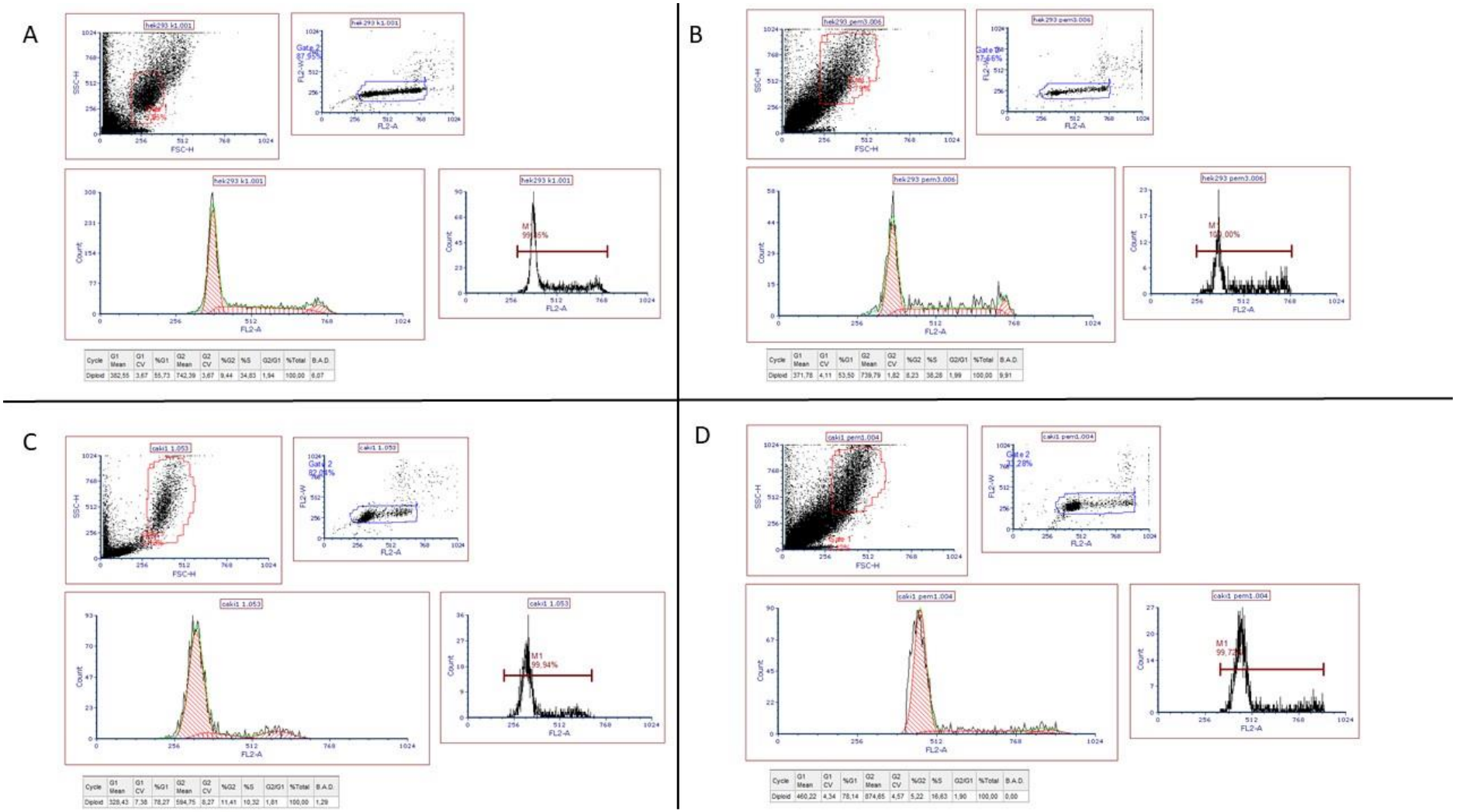
6. Wyniki

6.1. Wpływ promieniowania elektromagnetycznego o niskiej częstotliwości na morfologię oraz żywotność komórek

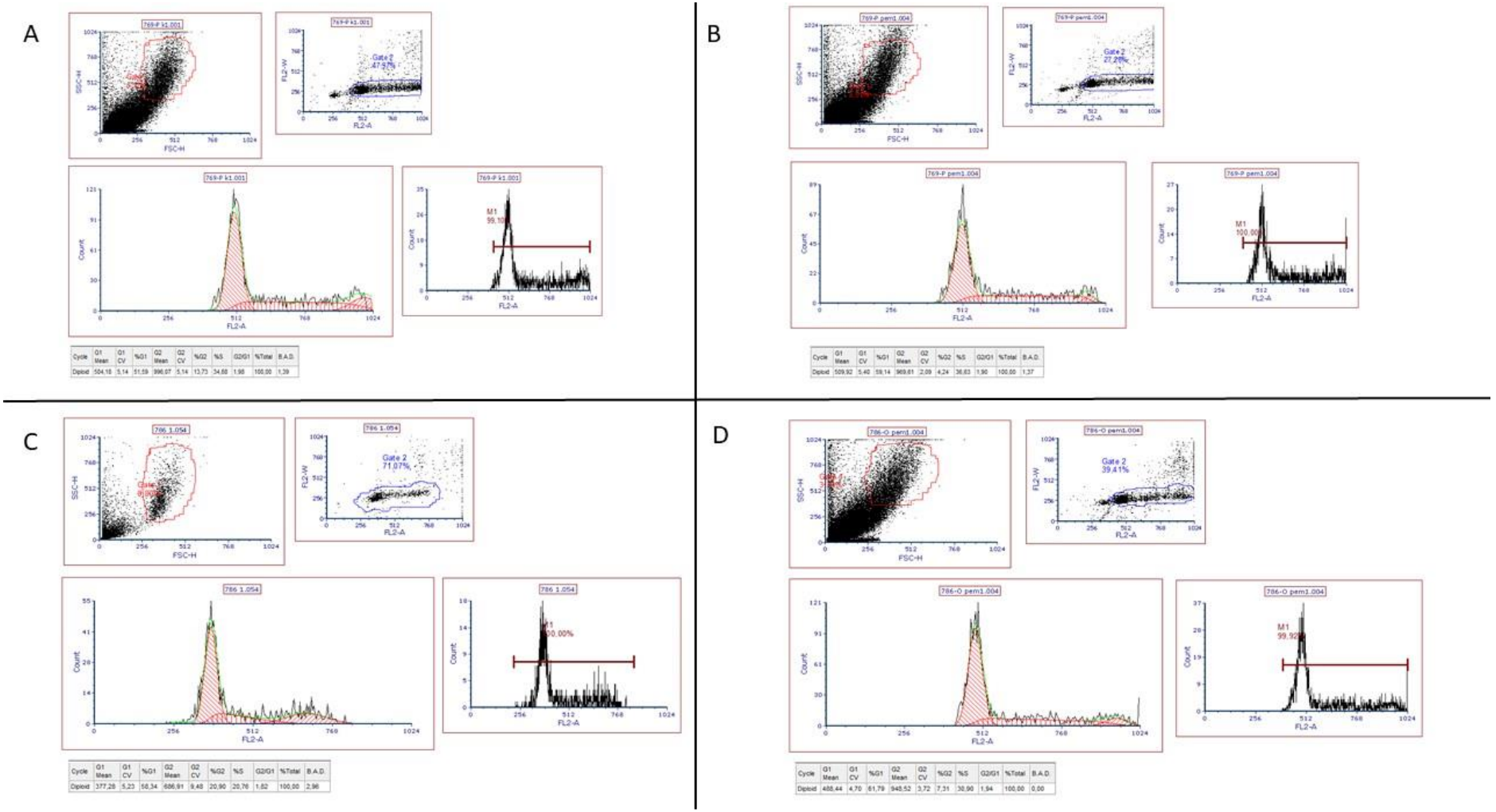
Ekspozycja na PEM o niskiej częstotliwości nie miało wpływu na morfologię oraz kurczenie się komórek. W celu zbadania wpływu ekspozycji na PEM o niskiej częstotliwości na tempo wzrostu komórek, określono żywotność komórek po 72h od zakończonej ekspozycji na PEM. Dla tego badania został użyty test In vitro TOX8 z rezasuryną. Na podstawie uzyskanych wyników, z użyciem wzoru przedstawionego w podpunkcie 4.3.2. został obliczony procent żywotności komórek. Zauważono, że żywotność komórek nowotworowych poddanych na ekspozycję PEM jest mniejsza w stosunku do grupy kontrolnej, natomiast żywotność linii HEK293 jest większa w porównaniu do kontroli.

6.2. Analiza cytometryczna: cykl komórkowy oraz apoptoza i nekroza komórek

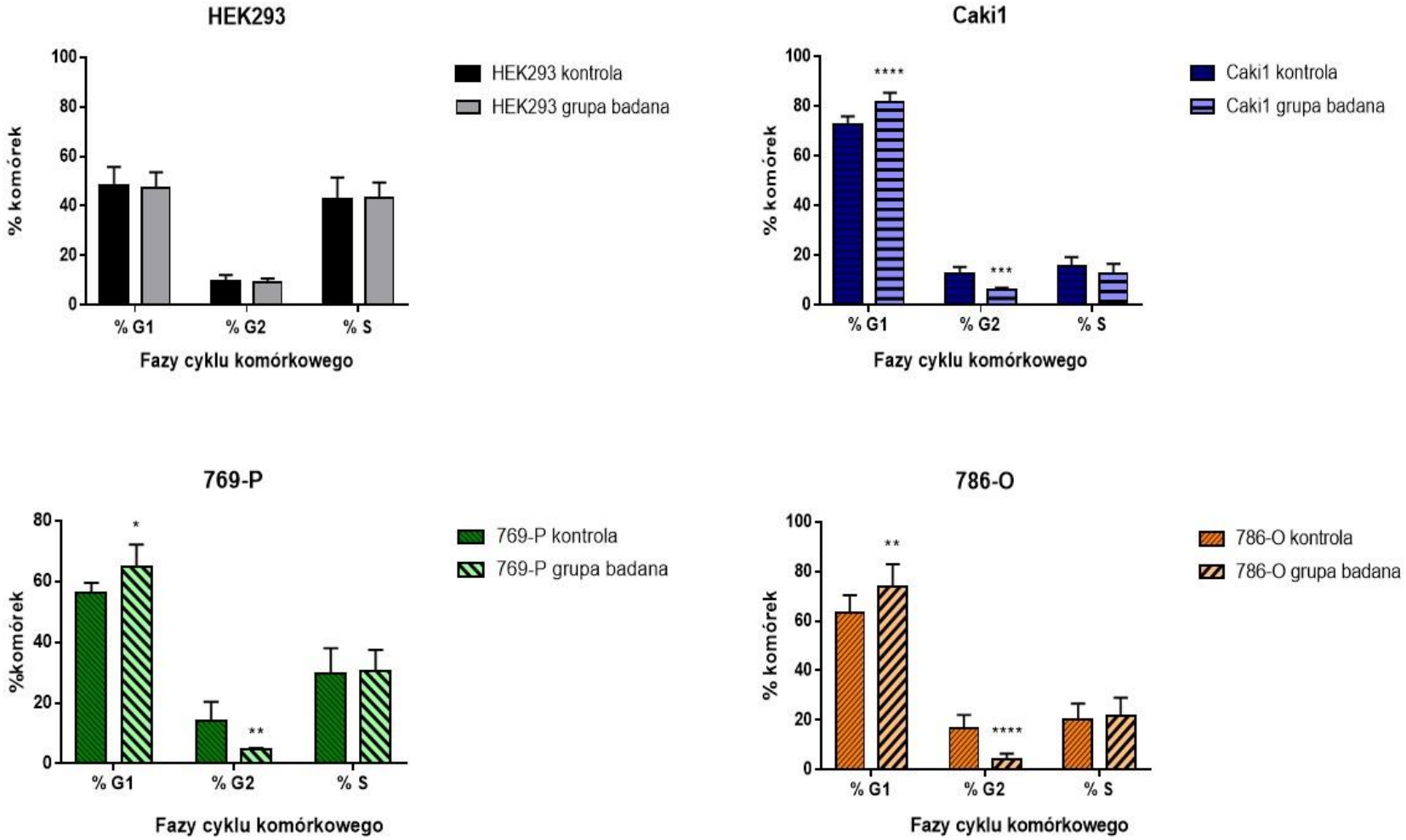
Przy pomocy analizy cytometrycznej w piątym dniu po zakończeniu ekspozycji na PEM, wykazano, że w liniach komórek nowotworowych poddanych ekspozycji na PEM o niskiej częstotliwości populacja komórek G1 była większa, zaś populacja G2 mniejsza w porównaniu do komórek tej samej linii nie poddanej na ekspozycję (grupa kontrolna). Rycina 10 i 11 przedstawiają przykładowe histogramy pomiaru ilości DNA w badanych liniach komórkowych. Analiza cytometryczna pozwoliła na procentowe określenie ilości komórek w fazie G1, G2 oraz S (rycina 12).



Rycina 7. Przykładowe wykresy gęstościowe przedstawiające analizę cyklu komórkowego badanych linii: a) analiza próbki z grupy kontrolnej HEK293; b) próbka z grupy badanej linii HEK293; c) analiza próbki z grupy kontrolnej Caki1, d) próbka z grupy badanej linii Caki1.



Rycina 8. Przykładowe wykresy gęstościowe przedstawiające analizę cyklu komórkowego badnaych linii: a): analiza próbki z grupy kontrolnej 769-P; b) próbka z grupy badanej linii 769-P; c) analiza próbki z grupy kontrolnej 786-O; d) próbka z grupy badanej linii 786-O

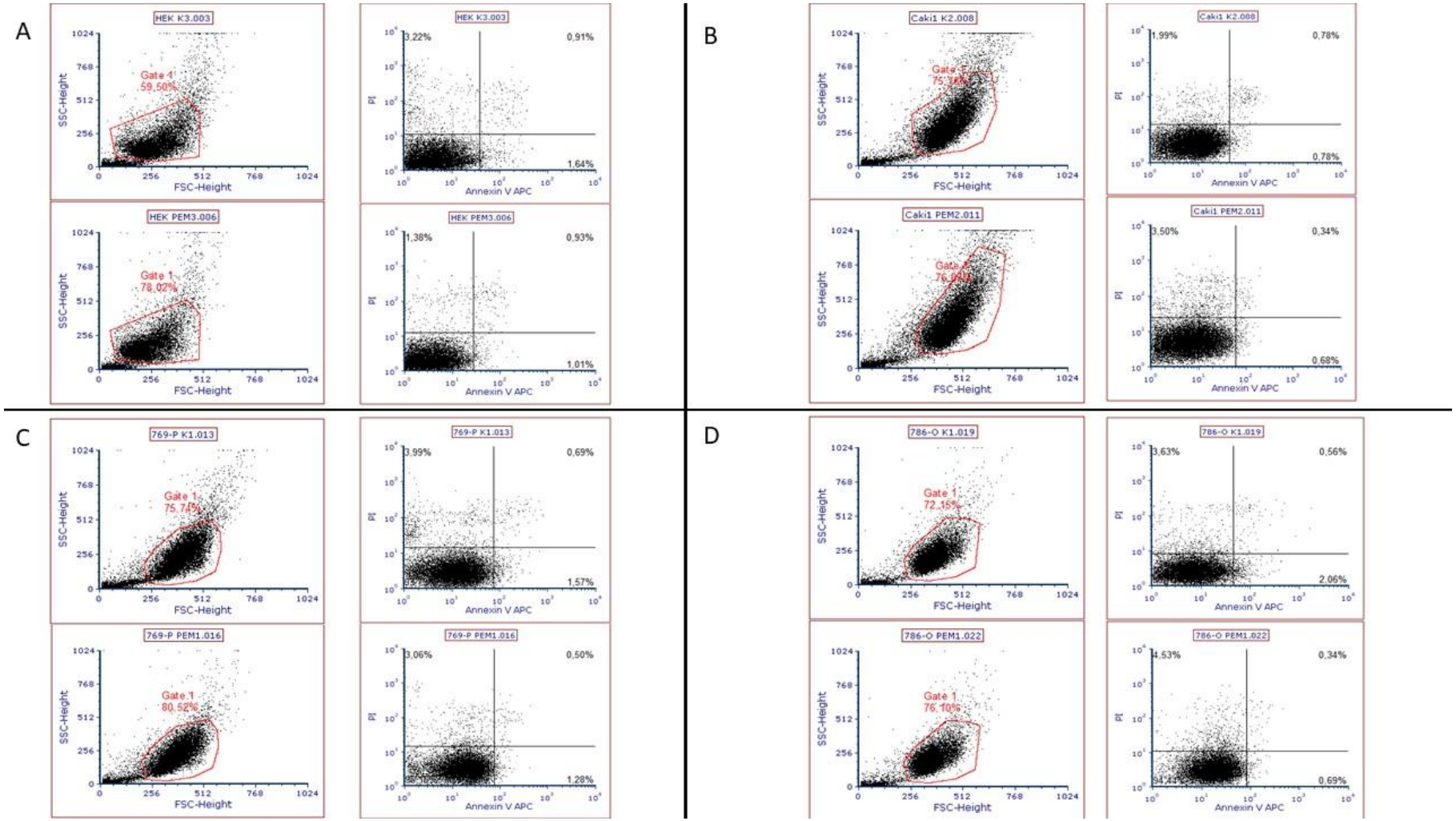


Rycina 9. Wyniki analizy cytometrycznej faz cyklu komórkowego pod wpływem ELF-EMF. Dane zaprezentowane jako średnia ± odchylenie standardowe: * - p<0,05, ** - p<0,005,*** - p<0,001, **** p<0,0001

Uzyskane dane wskazują także na to, że promieniowanie elektromagnetyczne o niskiej częstotliwości hamuje proliferację komórek nowotworowych co prowadzi do śmierci komórek ccRCC.

Także w 5 dniu po zakończonej ekspozycji, komórki zostały poddane analizie cytometrycznej w celu określenia rodzaju śmierci komórkowej wykorzystując podwójne barwienie komórek jodkiem propidyny (PI) i aneksyną V.

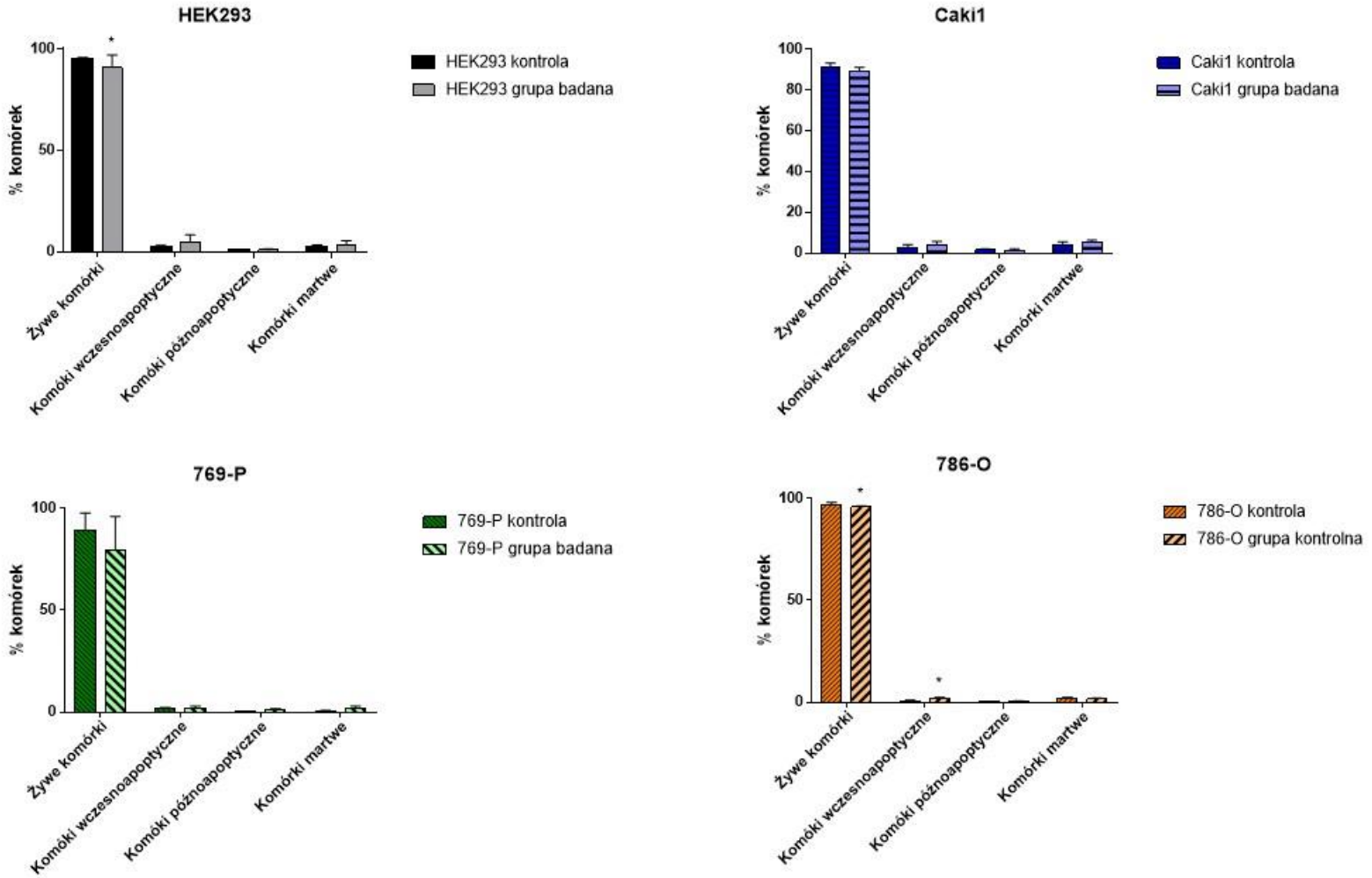
Rycina 13 przedstawia reprezentatywne wykresy gęstościowe i sposób bramkowania populacji wczesno i późnoapoptotycznej badanych linii komórkowych.



Rycina 10. Przykładowe wykresy gęstościowe przedstawiające analizę nekrozy oraz apoptozy badanych komórek: a) górny rząd analiza próbki z grupy kontrolnej HEK293, dolny rząd próbka z grupy badanej linii HEK293; b) górny rząd analiza próbki z grupy kontrolnej Caki1, dolny rząd próbka z grupy badanej linii Caki1; c) górny rząd analiza próbki z grupy kontrolnej 769-P, dolny rząd próbka z grupy badanej linii 769-P; d) górny rząd analiza próbki z grupy kontrolnej 786-O, dolny rząd próbka z grupy badanej linii 786-O

PEM które indukowało zatrzymanie komórek w fazie G1, skutkowało zwiększeniem liczby komórek wcześnie apoptycznych oraz zmniejszeniem liczby żywych komórek w linii 786-O (rycina 13d). Pomimo, że w pozostałych liniach ccRCC zmiany w populacji komórek były podobne nie wykazano żadnych istotnie statystycznie różnic.

Wykresy słupkowe (Rycina 14) przedstawiają dane otrzymane z oceny wykresów gęstościowych w 9 powtórzeniach każdej linii poddanej oraz nie poddanej na ekspozycję PEM.

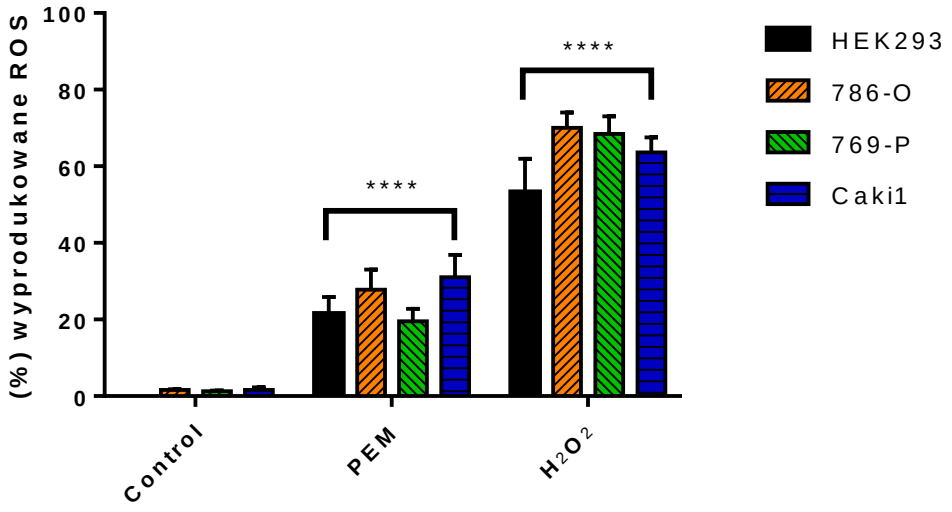


Rycina 11. Wyniki analizy cytometrycznej apoptozy komórek pod wpływem ELF-EMF. Dane zaprezentowane jako średnia ± odchylenie standardowe: * - $p<0,05$.

Nie zauważono istotnie statystycznie różnic w linii HEK293, co wskazywałoby na to, że PEM o niskiej częstotliwości nie ma wpływu na proliferację oraz żywotność zdrowych komórek nerki.

6.3. Produkcja reaktywnych form tlenu w komórkach poddanych ekspozycji ELF-EMF

Badania naukowe wykazały, że ROS pośredniczą w działaniu ELF-EMF w układach biologicznych (72,96,97). Aby ocenić udział ROS w efektach biologicznych ELF-EMF, zmierzyliśmy wewnątrzkomórkowe ROS w komórkach HEK293, 786-O, 769-P i Caki1 poddanych działaniu ELF-EMF w porównaniu do kontroli oraz komórek badanych linii inkubowanych przez 2h z H_2O_2. Ilość reaktywnych form tlenu została określona przy pomocy sond fluorogennych CellROX Green Reagent (Thermo Fisher, Polska). Zauważono, że komórki poddane promieniowaniu elektromagnetycznemu wydzielają znacznie więcej ROS w porównaniu do grupy kontrolnej (rycina 15). Dotyczyło to także linii HEK293.



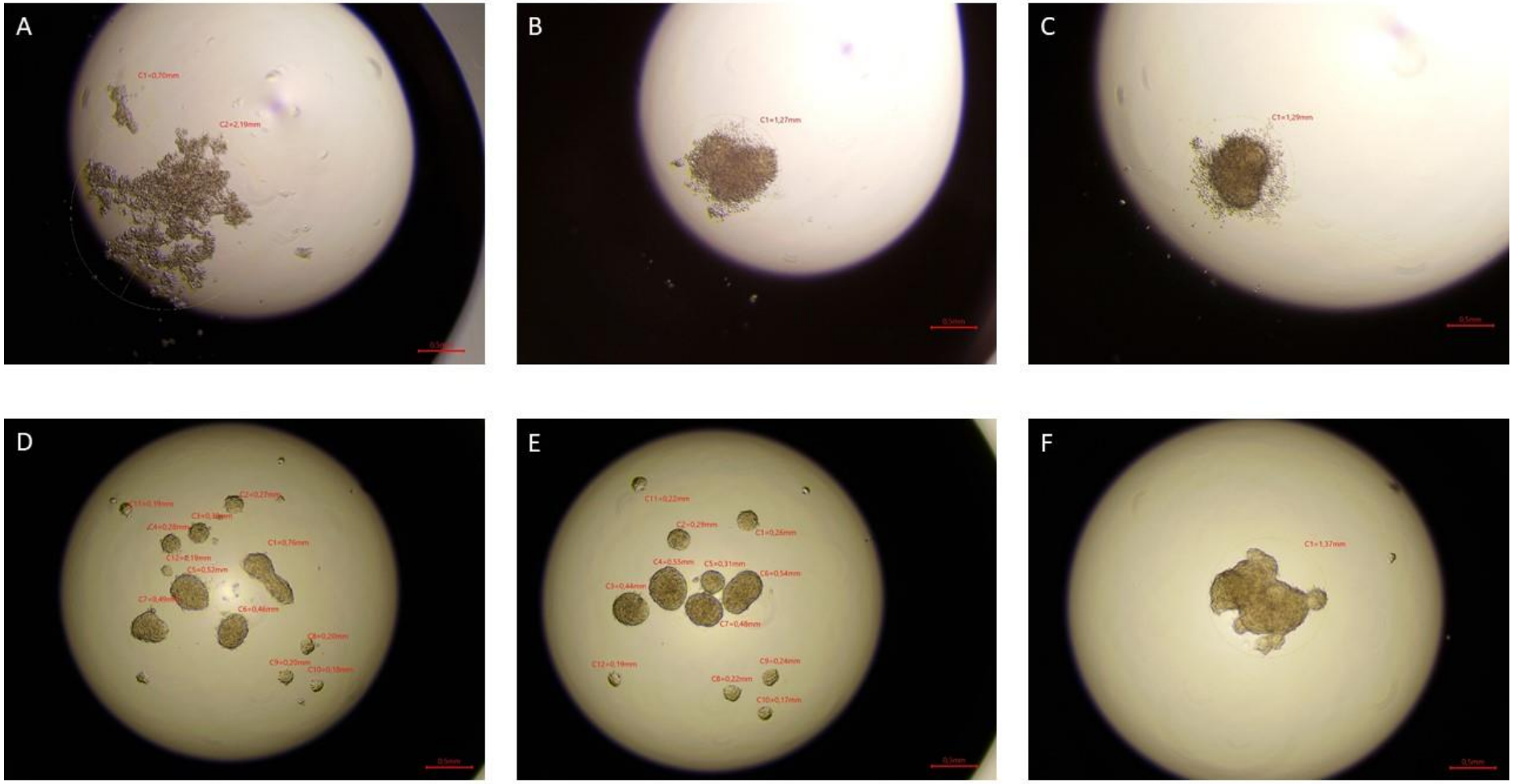
Rycina 12. Wyniki analizy cytometrycznej % wyprodukowanych reaktywnych form tlenu pod wpływem ELF-EMF. Dane zaprezentowane jako średnia ± odchylenie standardowe: **** p<0,0001

6.4. Wpływ promieniowania na agregację komórek

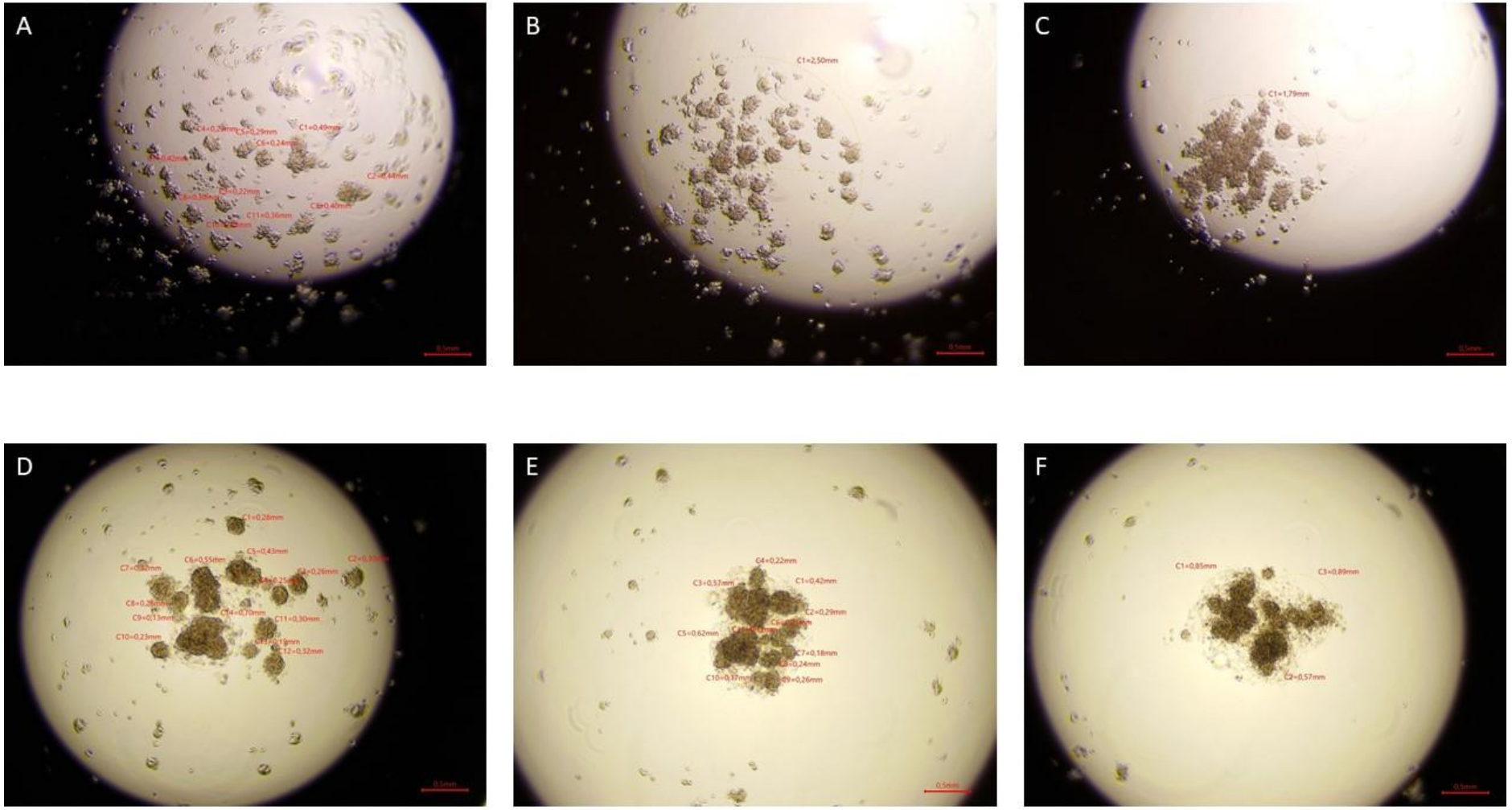
Test wiszącej kropli jest prostą, nie wymagającą specjalistycznego sprzętu metodą używaną do badania formowań wiązań międzykomórkowych i adhezji komórek do podłoża (z ang. extracellular matrix -ECM, macierz zewnątrzkomórkowa). Spójność komórek i adhezja komórek-ECM są podstawą badań nad rozwojem embrionalnym, oddziaływaniem komórek nowotworowo-zrębowych w inwazji złośliwej, gojeniu się ran i zastosowaniach w inżynierii tkankowej. Metoda ta zapewnia łatwy sposób wytwarzania tkankowych agregatów komórkowych do pomiaru właściwości biomechanicznych lub do analizy molekularnej i biochemicznej w fizjologicznie odpowiednim modelu. Formowanie sferoidu bądź warstwy komórek następuje zazwyczaj w ciągu 24 godzin. Proces ten może trwać jednak dłużej, w zależności od typu badanych komórek. Na rycinach 13, 14, 15 i 16 przedstawione zostały zdjęcia zrobione po 24, 48 i 72 h godzinach hodowli badanych linii komórkowych z grupy kontrolnej oraz badanej w wiszących kroplach.

We wszystkich badanych liniach została zmierzona wielkość średnicy „sferoidu", z użyciem oprogramowania DLT-Cam Viewer, określono różnice statystyczne pomiędzy grupą badaną a kontrolną w każdej godzinie badania (rycina 17)

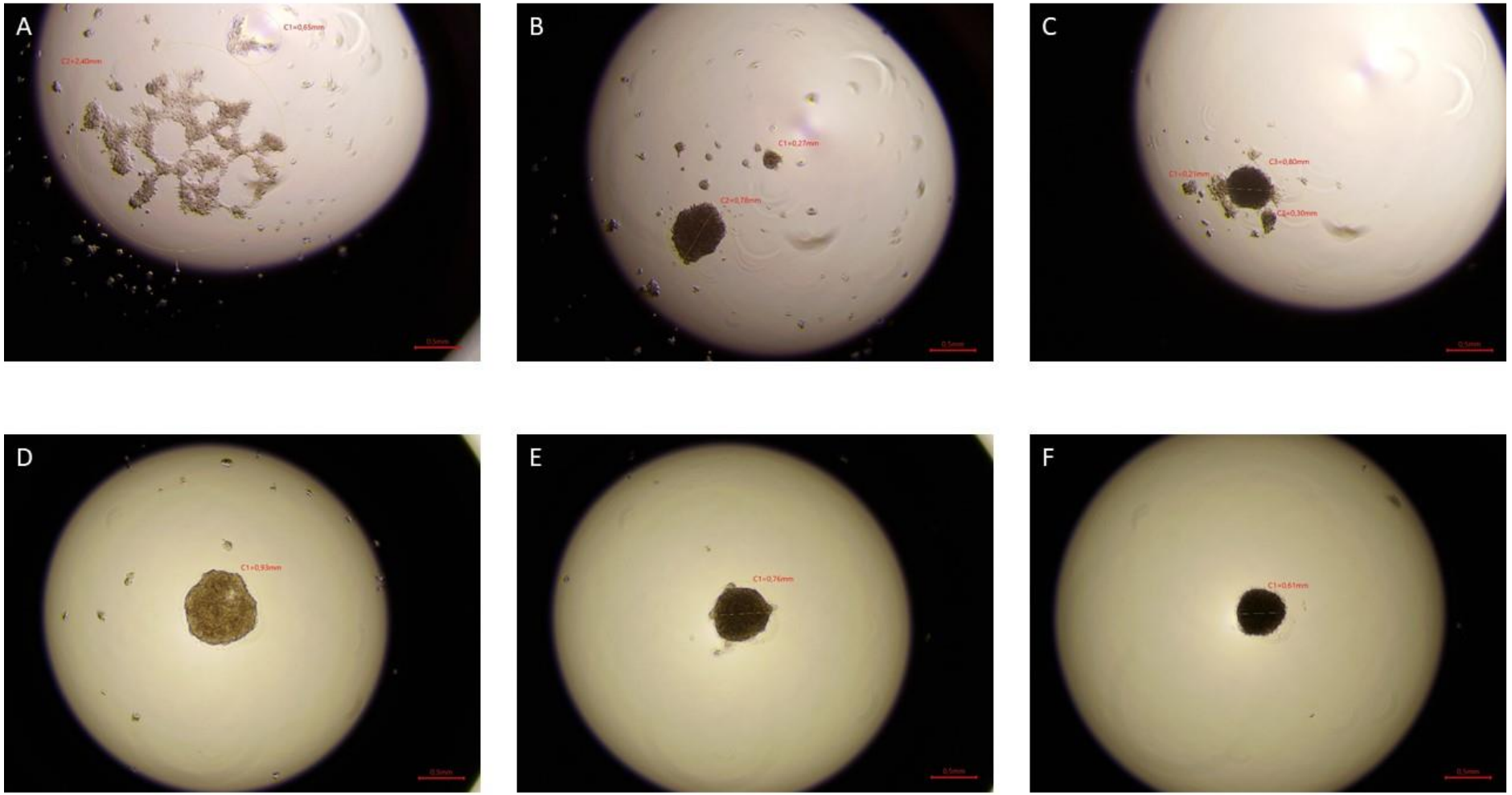
Po 72 h w kroplach komórek poddanych ekspozycji na PEM utworzyły się ciaśniejsze agregaty komórkowe we wszystkich badanych liniach, powstała także mniejsza liczba sfer w porównaniu do grupy kontrolnej. W przypadku linii nowotworowych kontrolnych (786-O,769-P i Caki1 niepoddanych ekspozycji na PEM) ciasne agregaty nie powstały nawet w 72h badania. Doświadczenie zakończono po upływie 72h.



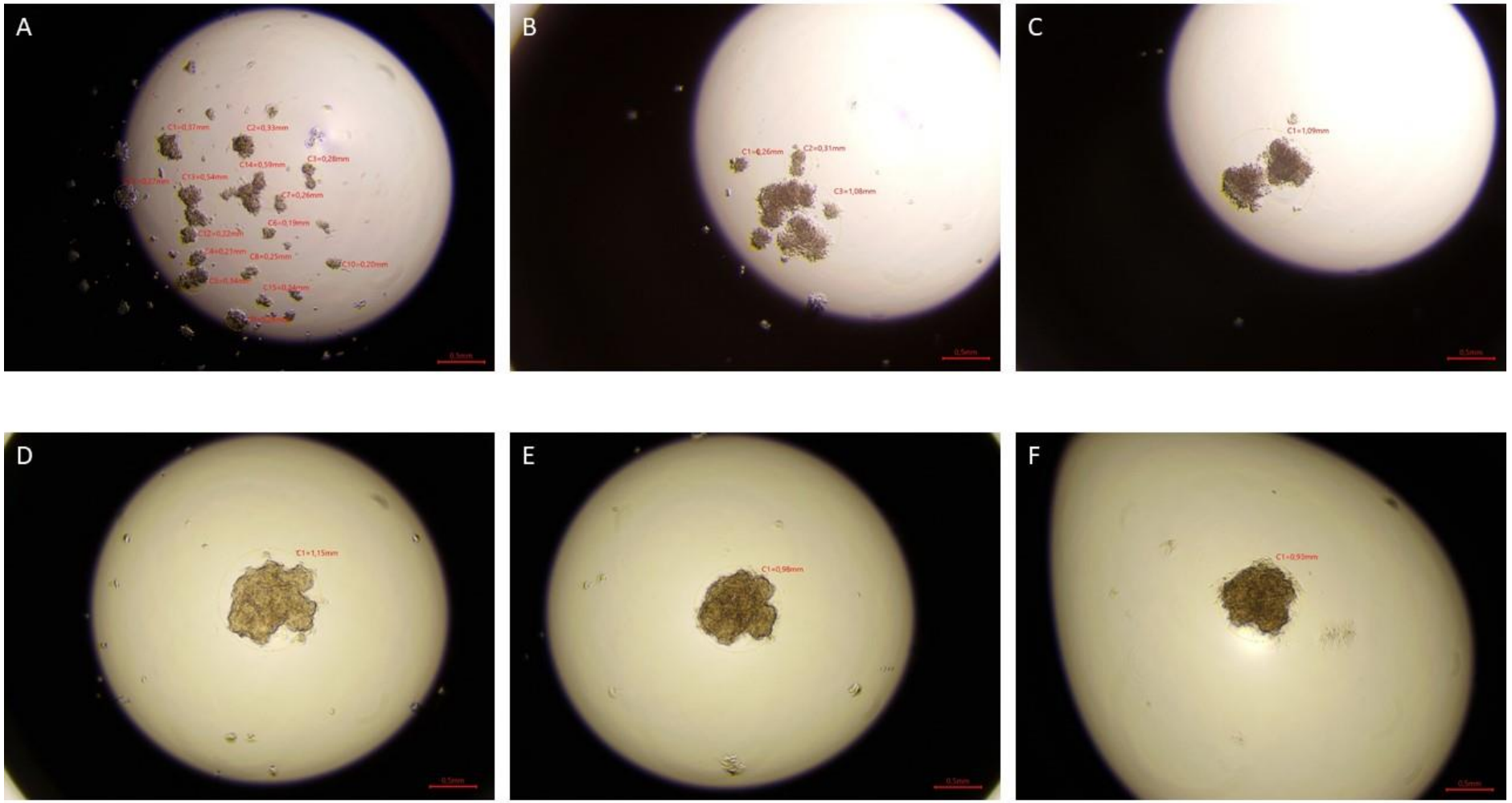
Rycina 13. Linia HEK293 w hodowli wiszącej kropli. Zdjęcia A, B i C przedstawiają komórki HEK293 z grupy kontrolnej odpowiednio po 24, 48 i 72h od początku założenia hodowli. Zdjęcia D, E i F przedstawiają komórki HEK293 poddane ekspozycji PEM odpowiednio po 24, 48 i 72h od założenia hodowli. Zdjęcia wykonane przy pomocy mikroskopu Delta-Optical IB-100, powiększenie 4x.



Rycina 14. Linia Caki1 w hodowli wiszącej kropli. Zdjęcia A, B i C przedstawiają komórki Caki1 z grupy kontrolnej odpowiednio po 24, 48 i 72h od początku założenia hodowli. Zdjęcia D, E i F przedstawiają komórki Caki1 poddane ekspozycji PEM odpowiednio po 24, 48 i 72h od założenia hodowli. Zdjęcia wykonane przy pomocy mikroskopu Delta-Optical IB-100, powiększenie 4x.

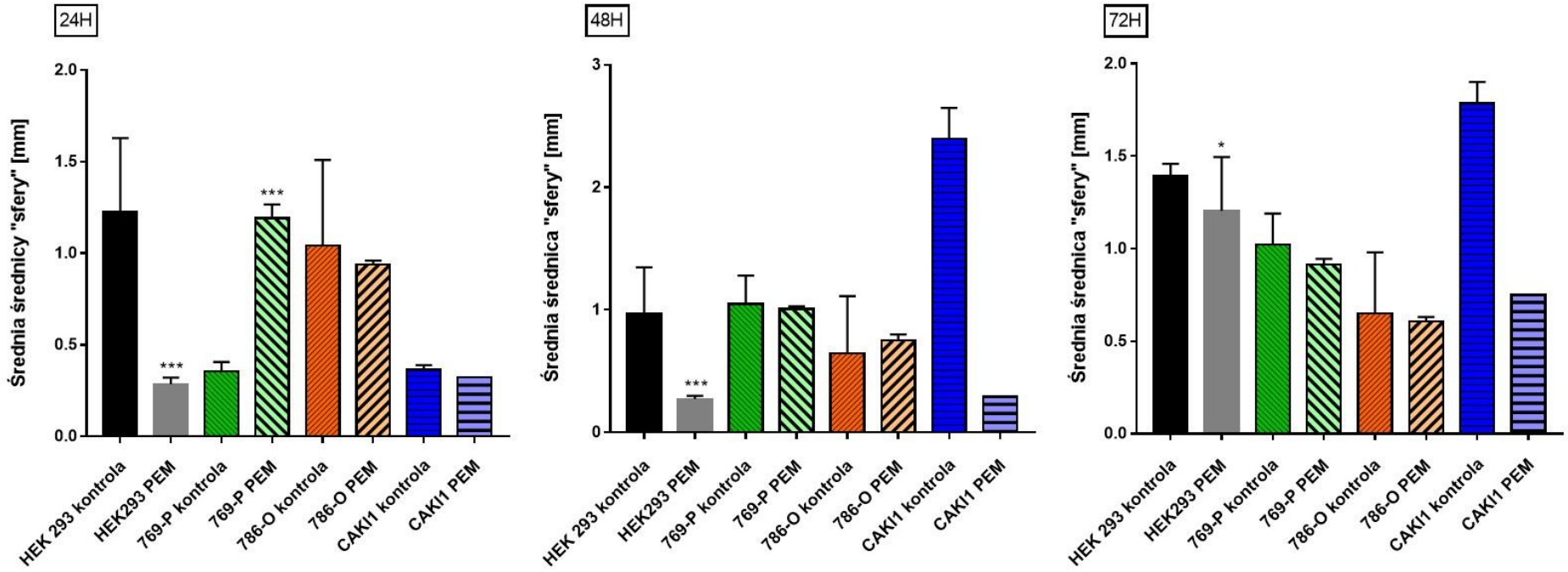


Rycina 15. Linia 786-O w hodowli wiszącej kropli. Zdjęcia A, B i C przedstawiają komórki 786-O z grupy kontrolnej odpowiednio po 24, 48 i 72h od początku założenia hodowli. Zdjęcia D, E i F przedstawiają komórki 786-O poddane ekspozycji PEM odpowiednio po 24, 48 i 72h od założenia hodowli. Zdjęcia wykonane przy pomocy mikroskopu Delta-Optical IB-100, powiększenie 4x



Rycina 16. Linia 769-P w hodowli wiszącej kropli. Zdjęcia A, B i C przedstawiają komórki 769-P z grupy kontrolnej odpowiednio po 24, 48 i 72h od początku założenia hodowli. Zdjęcia D, E i F przedstawiają komórk 769-P poddane ekspozycji PEM odpowiednio po 24, 48 i 72h od założenia hodowli. Zdjęcia wykonane przy pomocy mikroskopu Delta-Optical IB-100, powiększenie 4x

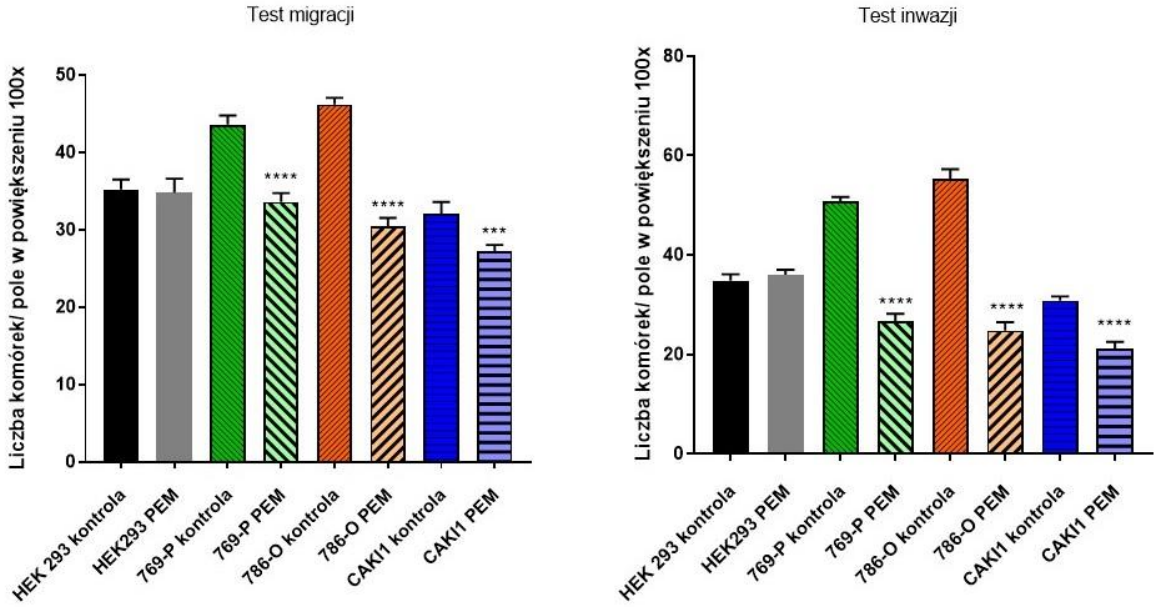
.



Rycina 17. Analizę średnicy sferoidu przeprowadzono w 24, 48 i 72h, średnie wartości średnic „sfer" przedstawiono na wykresie. Analizę przeprowadzono za pomocą oprogramowania DLT-Cam Viewer, a pomiary wykonano z dwóch niezależnych eksperymentów w dziewięciu powtórzeniach. (*- $p<0,05$; *** - $p<0,0005$)

6.5. Zdolności do migracji i inwazji komórek poddanych na PEM o niskiej częstotliwości

Badanie migracji komórek w badaniach nad nowotworami jest szczególnie interesujące, ponieważ jedną z głównych przyczyn śmierci pacjentów z nowotworami jest związana z progresją przerzutów. Aby nowotwory mógły się rozprzestrzeniać w organizmie, komórki rakowe muszą migrować i przedostać się przez macierz zewnątrzkomórkową by następnie przejść do krwiobiegu, przyczepić się do odległego miejsca i ostatecznie wynaczynić, tworząc odległe ognisko. Test migracji i inwazji są testami które pozwalają na ocenę zdolności przerzutowych komórek nowotworowych. Oba testy można wykorzystywać do analizy zdolności pojedynczych komórek do kierunkowej odpowiedzi na różne chemoatraktanty, niezależnie od tego, czy są to chemokiny, czynniki wzrostu, lipidy czy nukleotydy. Pozwalają również ocenić zdolność migracyjną spowodowaną nadekspresją receptorów. Za pomocą tych testów można ponadto określić tryb migracji komórek i zdolność komórki do inwazji na matrycę 3-D. Ocenę wpływu PEM na migrację oraz inwazję komórek prawidłowych oraz komórek raka jasnokomórkowego nerki przeprowadzono za pomocą testu opracowanego przez Justus i in. (93). Ocena zdolności inwazyjnych została zbadana z wykorzystaniem tych samych insertów co w teście migracji jednak membrany były pokryte Matrigel. By określić różnice w zdolnościach przerzutowych przy pomocy mikroskopu Delta Optical IB-100 zostały policzone komórki, które przemigrowały w kierunku chemoatraktantu jakim była pożywka z 10% FBS. PEM o niskiej częstotliwości znacznie hamował zdolności migracyjne oraz inwazyjne komórek nowotworowych, nie zmieniając tych właściwości w komórkach zdrowych.



Rycina 18. Liczba komórek migrujących w kierunku chemoatraktantu (średnia z 5 pól przy całkowitym powiększeniu 100x). (*** - p<0,0005; **** - p<0,00005).

6.6. Ekspresja genów *VEGFC, ADAM28* i *NCAM1*

By określić ekspresję pięciu genów (*VEGFC, ADAM28, NCAM1, RPL30* i *GAPDH*) z badanych linii komórkowych hodowanych w 2 różnych warunkach (komórki nie poddane ekspozycji, komórki poddane ekspozycji na PEM) wyizolowano najpierw RNA. Następnie przy pomocy reakcji odwrotnej transkrypcji otrzymano cDNA na którym przeprowadzono Real-Time PCR używając znacznika fluoresencyjnego SYBRGreen.

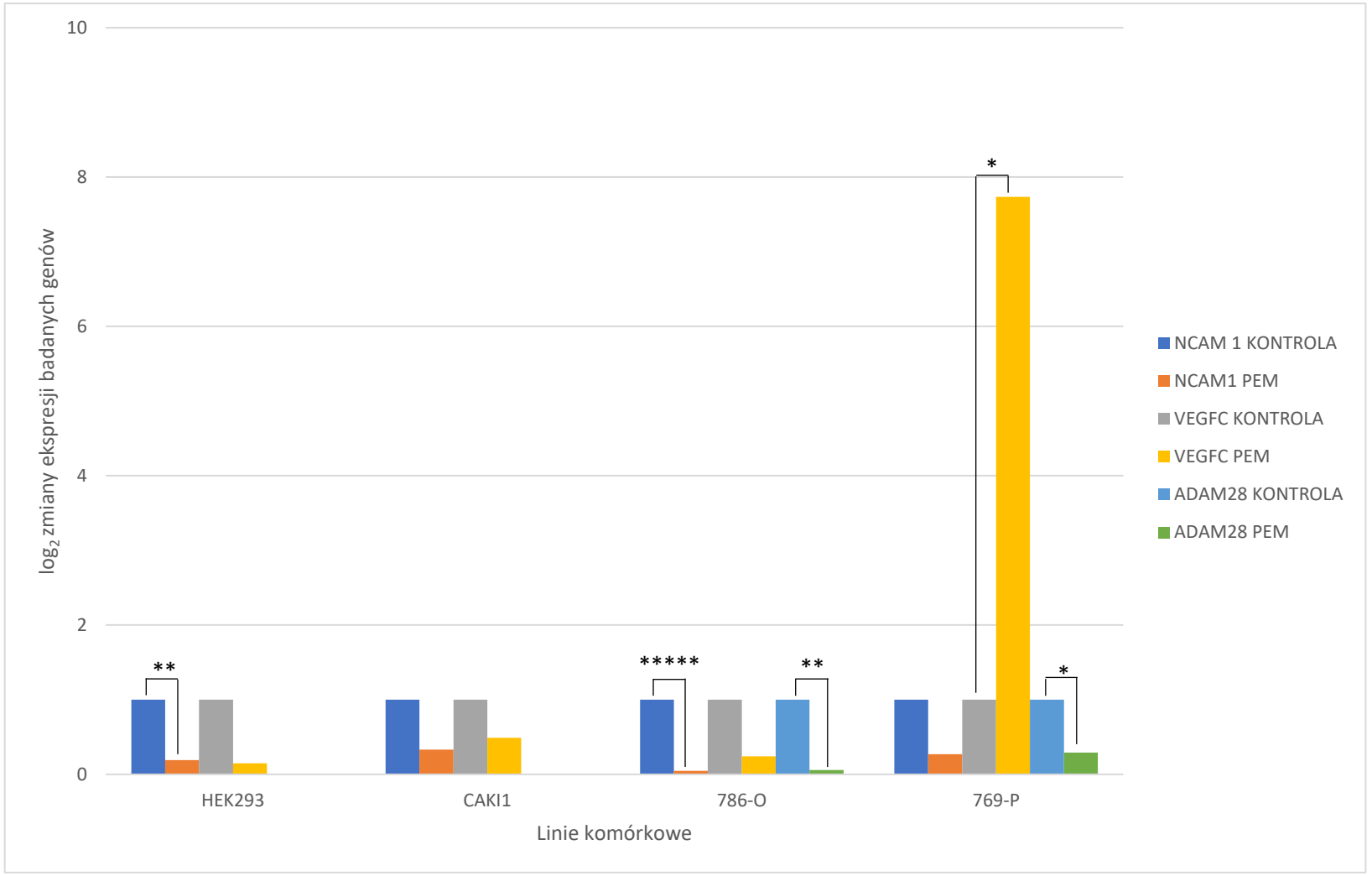
Jako gen referencyjny został wybrany *RPL30,* ponieważ poziomy ekspresji *GAPDH* zmieniały się istotnie w różnych badanych liniach komórkowych a także pomiędzy poszczególnymi powtórzeniami, co potwierdza doniesienia de Jonge i wsp, że *RPL-30* jest bardziej stabilnym genem referencyjnym (98).

Różnice pomiędzy warunkami hodowlanymi badano przy pomocy testu t-Studenta. Dane reprezentują znormalizowaną ilość genu docelowego w stosunku do kontroli, którą uważa się za wartość równą 1 (rycina 22).

Ekspresja *NCAM1* malała we wszystkich badanych liniach po ekspozycji na ELF-EMF, w HEK293 i 786-O została potwierdzona statystycznie istotna różnica (p<0,05 dla HEK293, p<0,00005 dla 786-O).

Ekspresja *ADAM28* była wyciszana tylko w pierwotnych liniach nowotworowych i w obu ekspresja znacznie malała po PEM ($p<0,005$ dla 786-O i $p<0,05$ dla 769-P). W HEK293 oraz Caki1 nie została odnotowana jakakolwiek ekspresja tego genu nawet w grupie kontrolnej.

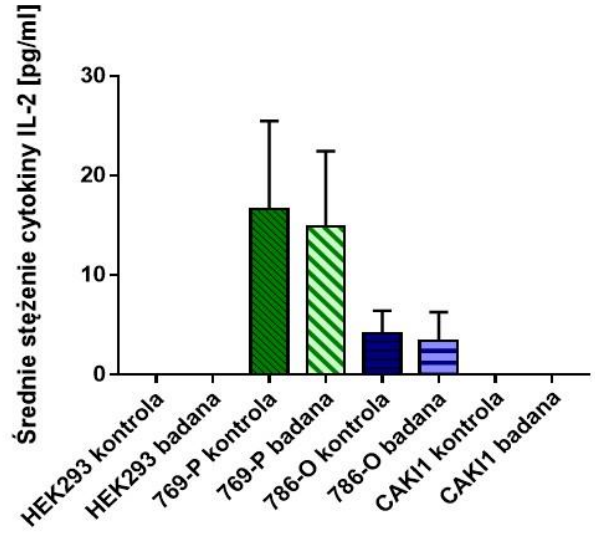
Znaczny wzrost ekspresji geny *VEGFC* został odnotowany w linii 769-P poddanej promieniowaniu elektromagnetycznemu (prawie 9-krotnie podwyższona ekspresja, $p<0,05$). W pozostałych liniach ekspresja *VEGFC* była wyciszana.



Rycina 19. Wpływ pola elektromagnetycznego o niskiej częstotliwośći na ekspresję genów *ADAM29, NCAM1* i *VEGFC*. (* - p<0,05, ** - p<0,005, ***** - p<0,00005)

6.7. Analiza stężenia cytokin i chemokin w nadsączach znad hodowli komórkowych badanych linii

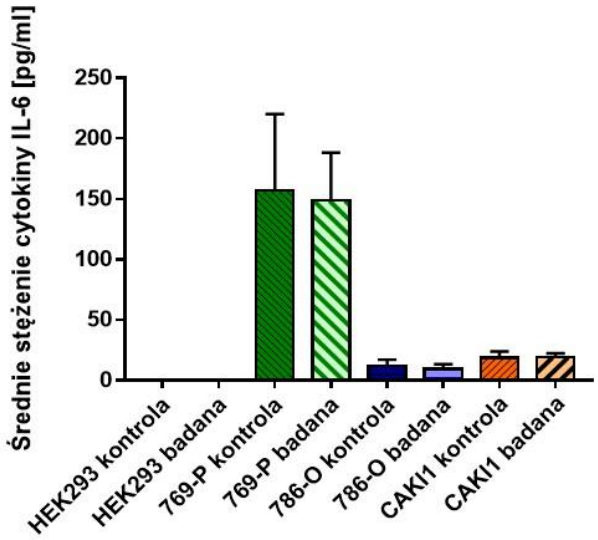
Analiza stężenia cytokiny IL-2 po 5 dniach ekspozycji linii komórkowej HEK293, 769-P, 786-O i Caki1 z obu grup (kontrolnej oraz badanej), wykazała niższe stężenie IL-2 w nadsączach z hodowli komórek w linii 769-P i 786-O w stosunku do kontroli. Jednak mimo to nie wykazano żadnych statystycznie istotnych różnic. Wyniki przedstawiono na Rycinie 23.



Test Mann-Whitney	Różnica średnich	95% przedział ufności	Istotność statystyczna?	Wartość p
HEK293 kontrola vs HEK293 badana	0	brak	Nie	> 0,9999
769-P kontrola vs 769-P badana	-1,51	-16,88 – 11.24	Nie	0,8413
786-O kontrola vs 786-O badana	-0,03	-7,37 – 4,41	Nie	0,7429
Caki1 kontrola vs Caki1 badana	0	brak	Nie	> 0,9999

Rycina 20. Wyniki analizy stężenia IL-2 w nadsączach z hodowli komórkowych po 5 dniach ekspozycji na PEM. Wyniki przedstawione w pg/mL jako średnia ± odchylenie standardowe

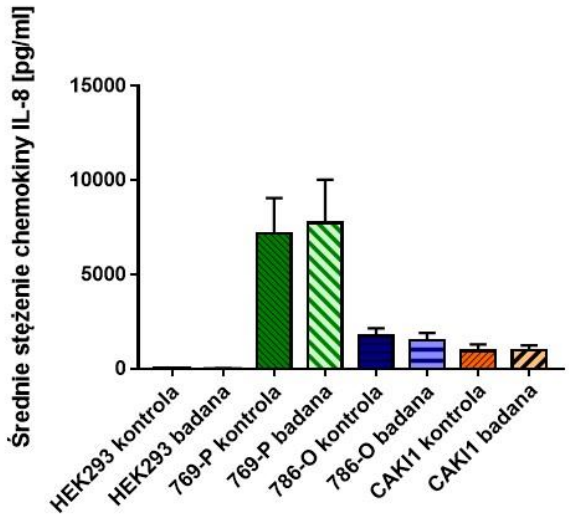
Analiza stężenia cytokiny IL-6 po 5 dniach ekspozycji linii komórkowej HEK293, 769-P, 786-O i Caki1 z obu grup (kontrolnej oraz badanej), wykazała niższe stężenie IL-6 w nadsączach z hodowli komórek w linii 769-P i 786-O w stosunku do kontroli, zaś wyższe w linii Caki1 w stosunku do kontroli. Tutaj również nie wykazano żadnych statystycznie istotnych różnic. Wyniki przedstawiono na Rycinie 24.



Test Mann-Whitney	Różnica średnich	95% przedział ufności	Istotność statystyczna?	Wartość p
HEK293 kontrola vs HEK293 badana	0	brak	Nie	> 0,9999
769-P kontrola vs 769-P badana	-62.83	-86,19 – 94.06	Nie	> 0,9999
786-O kontrola vs 786-O badana	-2,39	-11,34 – 5,02	Nie	0,4206
Caki1 kontrola vs Caki1 badana	-0,95	-10.35 – 7.71	Nie	0,8413

Rycina 21. Wyniki analizy stężenia IL-6 w nadsączach z hodowli komórkowych po 5 dniach ekspozycji na PEM. Wyniki przedstawione w pg/mL jako średnia ± odchylenie standardowe

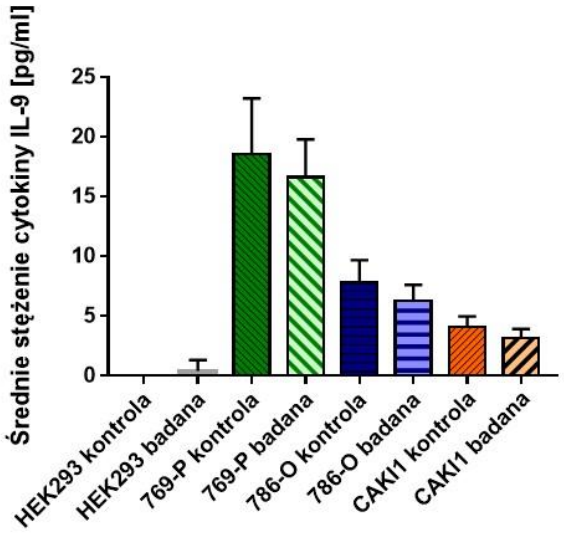
Analiza stężenia chemokiny IL-8 po 5 dniach ekspozycji linii komórkowej HEK293, 769-P, 786-O i Caki1 z obu grup (kontrolnej oraz badanej), wykazała niższe stężenie, nieistotnie statystycznie, IL-8 w nadsączach z hodowli komórek w linii 769-P i 786-O w stosunku do kontroli, zaś wyższe, również nieistotne statystycznie, w linii Caki1 w stosunku do kontroli. Wyniki przedstawiono na Rycinie 25.



Test Mann-Whitney	Różnica średnich	95% przedział ufności	Istotność statystyczna?	Wartość p
HEK293 kontrola vs HEK293 badana	11,02	-18,45 – 29,13	Nie	0,4127
769-P kontrola vs 769-P badana	173,9	-2825 – 3353	Nie	0,5476
786-O kontrola vs 786-O badana	-394,5	-920,8 – 375,1	Nie	0,4206
Caki1 kontrola vs Caki1 badana	173,7	-482,1 – 513,6	Nie	0,8413

Rycina 22. Wyniki analizy stężenia IL-8 w nadsączach z hodowli komórkowych po 5 dniach ekspozycji na PEM. Wyniki przedstawione w pg/mL jako średnia ± odchylenie standardowe

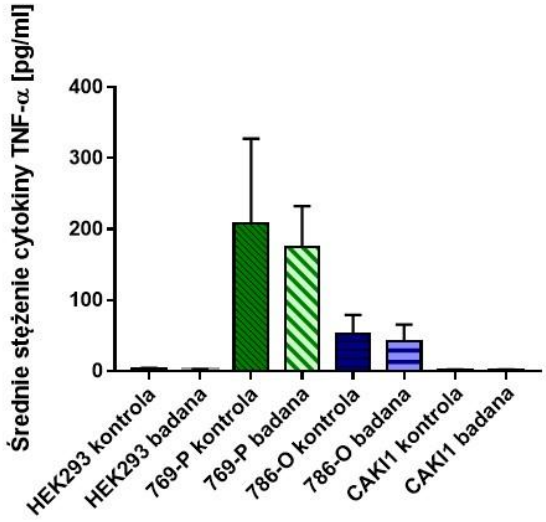
Analiza stężenia cytokiny IL-9 po 5 dniach ekspozycji linii komórkowej HEK293, 769-P, 786-O i Caki1 z obu grup (kontrolnej oraz badanej), wykazała niższe stężenie IL-9 w nadsączach z hodowli komórek w linii 769-P, 786-O i Caki1 w stosunku do kontroli. Jednak mimo to nie wykazano, żadnych statystycznie istotnych różnic. Wyniki przedstawiono na Rycinie 26.



Test Mann-Whitney	Różnica średnich	95% przedział ufności	Istotność statystyczna?	Wartość p
HEK293 kontrola vs HEK293 badana	0	0 – 2,05	Nie	> 0,9999
769-P kontrola vs 769-P badana	-1,05	-9,05 – 5,22	Nie	0,5873
786-O kontrola vs 786-O badana	-2,08	-3,81 – 1,38	Nie	0,2381
Caki1 kontrola vs Caki1 badana	-0,865	-2,41 – 0,34	Nie	0,1429

Rycina 23. Wyniki analizy stężenia IL-9 w nadsączach z hodowli komórkowych po 5 dniach ekspozycji na PEM. Wyniki przedstawione w pg/mL jako średnia ± odchylenie standardowe

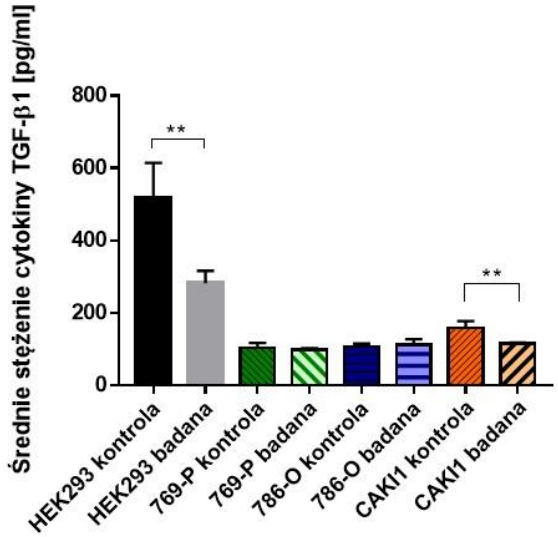
Analiza stężenia cytokiny TNF-α po 5 dniach ekspozycji linii komórkowej HEK293, 769-P, 786-O i Caki1 z obu grup (kontrolnej oraz badanej), wykazała nieistotne statystycznie różnice w stężeniu stężenie TNF-α w nadsączach – niższe z hodowli komórek w linii HEK293, 769-P i 786-O w stosunku do kontroli i wyższe w linii Caki1 w stosunku do kontroli. Wyniki przedstawiono na Rycinie 27.



Test Mann-Whitney	Różnica średnich	95% przedział ufności	Istotność statystyczna?	Wartość p
HEK293 kontrola vs HEK293 badana	-1,06	-2.48 – 1,43	Nie	0,6032
769-P kontrola vs 769-P badana	-27,48	-217,7 – 99,31	Nie	0,6905
786-O kontrola vs 786-O badana	-4,5	-49,78 – 32,95	Nie	0,5476
Caki1 kontrola vs Caki1 badana	0,71	-0,7 – 1,43	Nie	0,3651

Rycina 24. Wyniki analizy stężenia TNF-α w nadsączach z hodowli komórkowych po 5 dniach ekspozycji na PEM. Wyniki przedstawione w pg/mL jako średnia ± odchylenie standardowe

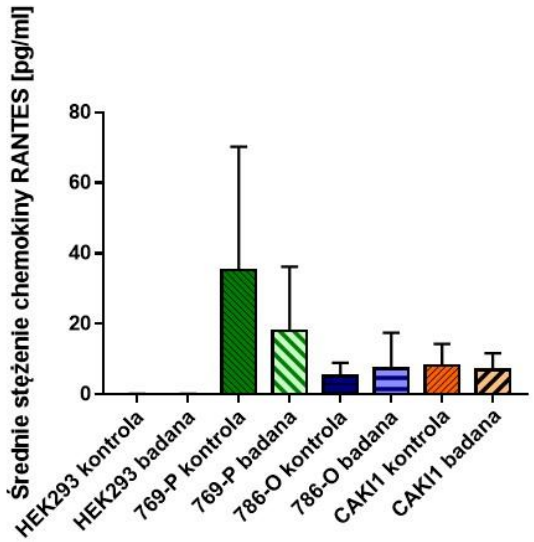
Analiza stężenia cytokiny TGF-β1 po 5 dniach ekspozycji linii komórkowej HEK293, 769-P, 786-O i Caki1 z obu grup (kontrolnej oraz badanej), wykazała statystycznie niższe stężenie TGF-β1w nadsączach z hodowli komórek w linii HEK293 ($\bar{x}$ = 519 ± 95,54, $\bar{x}$ = 282,5 ± 33,66) i Caki1 ($\bar{x}$ = 158,1 ± 19,74, $\bar{x}$ = 115,3 ± 3,067). W linii 769-P i 786-O również zanotowano spadek stężenia cytokiny, nie potwierdzono jednak statystycznie istotnych różnic. Wyniki przedstawiono na Rycinie 28.



Test Mann-Whitney	Różnica średnich	95% przedział ufności	Istotność statystyczna?	Wartość p
HEK293 kontrola vs HEK293 badana	-219,3	-334,6 – -79.87	Tak	0,0079
769-P kontrola vs 769-P badana	0	-29,59 – 5,37	Nie	0,8333
786-O kontrola vs 786-O badana	-5,38	-12,1 – 29,62	Nie	0,6508
Caki1 kontrola vs Caki1 badana	-48,53	-64,76 – -16,15	Tak	0,0079

Rycina 25. Wyniki analizy stężenia TGF-β1 w nadsączach z hodowli komórkowych po 5 dniach ekspozycji na PEM. Wyniki przedstawione w pg/mL jako średnia ± odchylenie standardowe

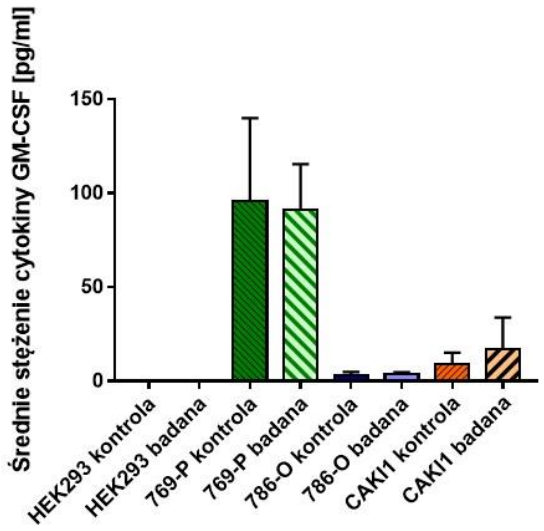
Analiza stężenia cytokiny RANTES po 5 dniach ekspozycji linii komórkowej HEK293, 769-P, 786-O i Caki1 z obu grup (kontrolnej oraz badanej), wykazała niższe, niesitstne statystycznie stężenie RANTES w nadsączach z hodowli komórek w linii 769-P i Caki1 w stosunku do kontroli, zaś wyższe, również nieistotne statystycznie, w linii 786-O w stosunku do kontroli. Wyniki przedstawiono na Rycinie 29.



Test Mann-Whitney	Różnica średnich	95% przedział ufności	Istotność statystyczna?	Wartość p
HEK293 kontrola vs HEK293 badana	0	-0,23 – 0,23	Nie	> 0,9999
769-P kontrola vs 769-P badana	-8,25	-79,07 – 30,68	Nie	0,5476
786-O kontrola vs 786-O badana	-1,04	-8,27 – 21,14	Nie	0,7381
Caki1 kontrola vs Caki1 badana	-0,47	-12,87 – 8,5	Nie	0,,8889

Rycina 26. Wyniki analizy stężenia RANTES w nadsączach z hodowli komórkowych po 5 dniach ekspozycji na PEM. Wyniki przedstawione w pg/mL jako średnia ± odchylenie standardowe

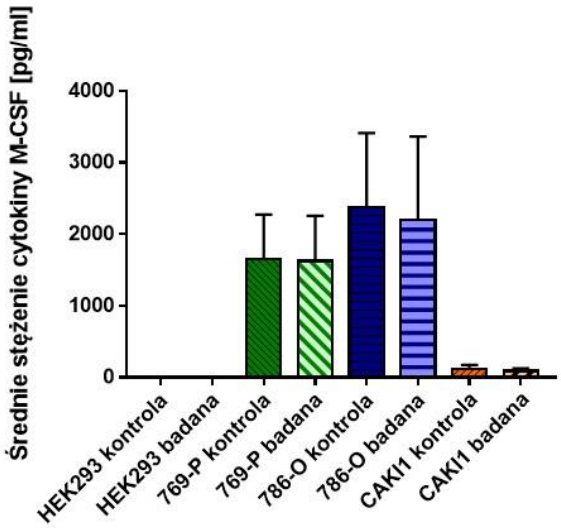
Analiza stężenia cytokiny GM-CSF po 5 dniach ekspozycji linii komórkowej HEK293, 769-P, 786-O i Caki1 z obu grup (kontrolnej oraz badanej), wykazała niższe stężenie GM-CSF w nadsączach z hodowli komórek w linii 769-P w stosunku do kontroli, zaś wyższe w linii 786-O i Caki1 w stosunku do kontroli. Nie wykazano, żadnych statystycznie istotnych różnic. Wyniki przedstawiono na Rycinie 30.



Test Mann-Whitney	Różnica średnich	95% przedział ufności	Istotność statystyczna?	Wartość p
HEK293 kontrola vs HEK293 badana	0	brak	Nie	> 0,9999
769-P kontrola vs 769-P badana	10,24	-67,37 – 46,99	Nie	> 0,9999
786-O kontrola vs 786-O badana	0,705	-2,71 – 3,52	Nie	0,7302
Caki1 kontrola vs Caki1 badana	4,52	-6,91 – 39,55	Nie	0,,5476

Rycina 27. Wyniki analizy stężenia GM-CSF w nadsączach z hodowli komórkowych po 5 dniach ekspozycji na PEM. Wyniki przedstawione w pg/mL jako średnia ± odchylenie standardowe

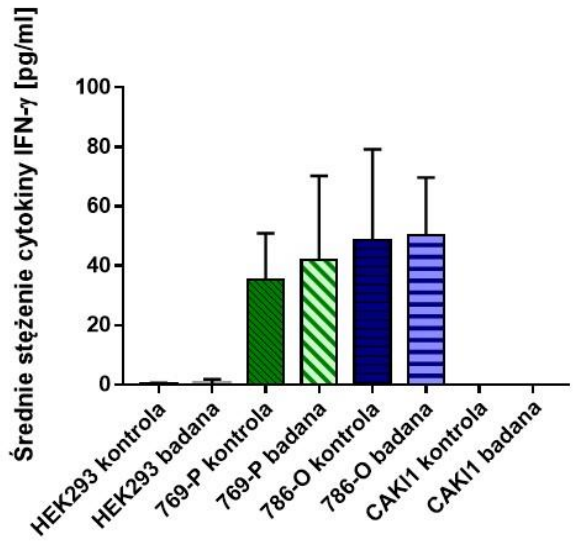
Analiza stężenia cytokiny MCP-1 po 5 dniach ekspozycji linii komórkowej HEK293, 769-P, 786-O i Caki1 z obu grup (kontrolnej oraz badanej), wykazała niższe stężenie MCP-1 w nadsączach z hodowli komórek w linii 769-P, 786-O i Caki1 w stosunku do kontroli. Także i w przypadku tej cytokiny nie wykazano statystycznie istotnych różnic. Wyniki przedstawiono na Rycinie 31.



Test Mann-Whitney	Różnica średnich	95% przedział ufności	Istotność statystyczna?	Wartość p
HEK293 kontrola vs HEK293 badana	0	-8,56 – 5,4	Nie	> 0,9999
769-P kontrola vs 769-P badana	34,24	-1016 - 1100	Nie	0,8413
786-O kontrola vs 786-O badana	28,4	-2186 - 1823	Nie	0,6905
Caki1 kontrola vs Caki1 badana	-16,32	-123,4 – 42,53	Nie	0,,3095

Rycina 28. Wyniki analizy stężenia M-CSF w nadsączach z hodowli komórkowych po 5 dniach ekspozycji na PEM. Wyniki przedstawione w pg/mL jako średnia ± odchylenie standardowe.

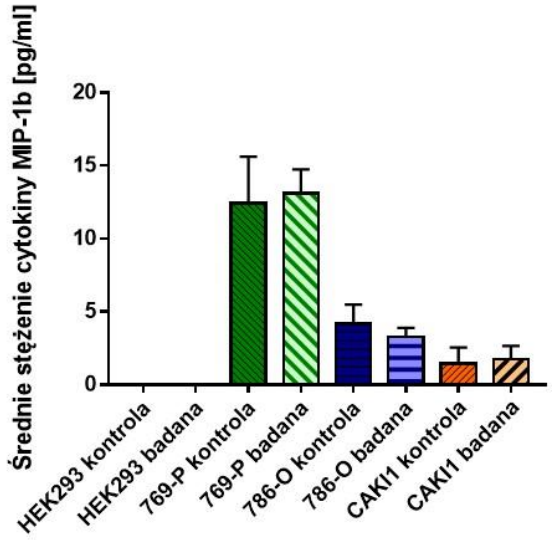
Analiza stężenia cytokiny IFN-γ po 5 dniach ekspozycji linii komórkowej HEK293, 769-P, 786-O i Caki1 z obu grup (kontrolnej oraz badanej), wykazała nieistotnie statystycznie wyższe stężenie IFN-γ w nadsączach z hodowli komórek w linii 769-P i 786-O w stosunku do kontroli. Wyniki przedstawiono na Rycinie 32.



Test Mann-Whitney	Różnica średnich	95% przedział ufności	Istotność statystyczna?	Wartość p
HEK293 kontrola vs HEK293 badana	0	-1,03 – 2,88	Nie	> 0,9999
769-P kontrola vs 769-P badana	34,24	-34 – 38,19	Nie	0,8413
786-O kontrola vs 786-O badana	1,58	-42,99 – 47,14	Nie	> 0,9999
Caki1 kontrola vs Caki1 badana	0	brak	Nie	> 0,9999

Rycina 29. Wyniki analizy stężenia IFN-γ w nadsączach z hodowli komórkowych po 5 dniach ekspozycji na PEM. Wyniki przedstawione w pg/mL jako średnia ± odchylenie standardowe.

Analiza stężenia cytokiny MIP-1b po 5 dniach ekspozycji linii komórkowej HEK293, 769-P, 786-O i Caki1 z obu grup (kontrolnej oraz badanej), wykazała wyższe stężenie MIP-1b w nadsączach z hodowli komórek w linii 769-P i Caki1, zaś niższe w 786-O w stosunku do kontroli. Mimo to nie wykazano statystycznie istotnych różnic. Wyniki przedstawiono na Rycinie 33.



Test Mann-Whitney	Różnica średnich	95% przedział ufności	Istotność statystyczna?	Wartość p
HEK293 kontrola vs HEK293 badana	0	brak	Nie	> 0,9999
769-P kontrola vs 769-P badana	0,45	-3,76 – 4,61	Nie	0,6905
786-O kontrola vs 786-O badana	-1,07	-2,29 – 1,01	Nie	0,1984
Caki1 kontrola vs Caki1 badana	0,77	-2,55 – 20,6	Nie	0,7714

Rycina 30. Wyniki analizy stężenia MIP-1b w nadsączach z hodowli komórkowych po 5 dniach ekspozycji na PEM. Wyniki przedstawione w pg/mL jako średnia ± odchylenie standardowe.

Analiza stężeń wszystkich wybranych cytokin oraz chemokin, wykazała, że sekrecja większości analitów w badanych liniach zarówno w grupie kontrolnej jak i badanej, jest bardzo niska (przedstawiony w tabeli 2), bądź praktycznie w ogóle nie były wykrywalne.

Tabela 2. Lista cytokin oraz chemokin, których sekrecja była na niskim poziomie.

Linia komórkowa	Badana cytokina/ chemokina w grupie	
	kontrolnej	badanej
HEK 293	IL-1β, IL-1ra, IL-17, IFN-γ, MCP-1	IL-5, IL-9, IL-10, G-CSF, IFN-γ, MCP-1, MIP-1b, RANTES, VEGF
Caki1	TGF-β2, IL-7, VEGF	IL-7, FGF basic
786-O	IL-4, IL-5, IL-17, FGF basic, VEGF	IL-7, eotaxin, FGF basic, VEGF
769-P	TGF-β3, IL-1β, IL-1ra, IL-17, FGF basic, G-CSF, IP-10, PDGF-bb	TGF-β3, IL-5, IL-17, FGF basic, G-CSF, IP-10, PDGF-bb

6. Dyskusja

Od wielu lat wśród badaczy toczy się dyskusja dotycząca roli jaką odgrywa pole elektromagnetyczne o niskich częstotliwościach na komórki nowotworowe. Zostały zastosowane różne metody oraz modele badawcze, jednak osiągnięte rezultaty są dość kontrowersyjne oraz niestety rozbieżne. Liczne badania wykazały, że narażenie na ELF-EMF może powodować różne zmiany na poziomie komórkowym także w komórkach nowotworowych. Jedank jak już wspomniałam na początku swojej pracy, nie ma dotychczas publikacji nt. wpływu PEM o niskiej częstotliwości na komórki jasnokomórkowego raka nerki. W mojej pracy postanowiłam więc zbadać wpływ pola elektromagnetycznego o częstotliwości 50Hz na morfologię oraz aktywność komórek ccRCC *in vitro*.

By określić wpływ wybranego modelu badawczego pola elektromagnetycznego postanowiałam rozpocząć od wykrycia ewentualnych zmian morfologicznych w badanych liniach komórkowych. W przeprowadzonym badaniu nie zaobserwowałam widocznych zmian ani w wielkości, ani w kształcie badanych komórek nowotworowych. Rezaire-Taviraini i in. w swojej pracy postulują, że PEM o częstotliwości 50Hz wpływa na morfologię komórek SH-SY5Y (linia komórkowa nerwiaka zarodkowego) jednak bez podania konkretnych różnic. Badacze w swojej pracy starają się przekonać, iż różnice wynikają ze zmienionej ekspresji genów (99). Dokładniejsze badania cytoszkieletu komórek poddanych ekspozycji na ELF-EMF najpewniej wykazałyby czy istotnie nastąpiły zmiany w ich morfologii, choć prawdopodobnie różnic należałoby szukać w macierzy zewnątrzkomórkowej.
W przeprowadzonych przeze mnie badaniach *in vitro* linia HEK293 uznawana za linię „zdrowej" nerki nie zmieniła swojego kształtu i wielkości. Badania Lai i in. również nie wykazały morfologicznych oraz histologicznych zmian w budowie nerki szczurów poddanych na ekspozycję ELF-EMF. Dodatkowo badania biochemiczne nie wykazały zmian w funkcjonowaniu nerek badanych zwierząt (100).
Badane przeze mnie parametry ELF-EMF, powodowały zatrzymanie komórek nowotworowych w fazie G1 cyklu komórkowego, skutkując tym samym zwiększeniem liczby komórek wcześnie apoptycznych oraz zmniejszeniem liczby żywych komórek w linii 786-O. Z kolei Monache i in. w swoich badaniach otrzymali sprzeczne rezultaty tłumacząc je tzw hipotezą „biologicznego okna" efektów PEM, a zwłaszcza hipotezą „okna amplitudy" (101). Zgodnie z tą teorią sugerują oni o istnieniu „określonych dozwolonych" poziomów, które biosystemy mogą osiągnąć pod wpływem PEM. Jest to również związane ze stanem

metabolicznym komórek. Ponadto odpowiedź systemów biologicznych, które są w różnych warunkach metabolicznych, może skutkować odmiennymi rezultatami. Zakładając, że PEM wpływa tylko na niewielką część komórek prawdopodobnie tych znajdujących się w określonym stanie metabolicznym lub na określonym etapie ich cyklu komórkowego, czas trwania ekspozycji na ELF-EMF może znacząco zmienić zarejestrowane efekty. Być może inne rezultaty zostaną uzyskane przy stymulacji większej populacji komórek. Przy zmianie warunków ekspozycji pole elektromagnetyczne mogłoby też powodować negatywne skutki zwiększając prawdopodobieństwo wystąpienia efektu termalnego a w rezultacie uszkodzić badane komórki.

Do oceny agresywności i zdolności przerzutowych wybranych linii użyto testu wiszącej kropli oraz testu migracji i inwazji. Komórki nowotworowe jasnokomórkowego raka nerki pod wpływem zastosowanego PEM tworzyły agregaty znacznie szybciej od tych z grupy kontrolnej, co wyraźnie sugeruje hamujący wpływ ELF-EMF na właściwości rozsiewu ccRCC. Linia komórkowa HEK293 tworzyła agregaty najwolniej ze wszystkich badanych linii także i po poddaniu jej na ekspozycję PEM. Obserwowane różnice nie były istotnie statystyczne. Zmniejszone właściwości przerzutowe linii nowotworowych potwierdzają również wyniki testu migracji i inwazji. Może to być spowodowane niewielkimi zmianami w macierzy zewnątrzkomórkowej, a nie jak twierdzą niektórzy naukowcy wpływem PEM na cytoszkielet komórek nowotworowych (99,102,103).

Przy ocenie agresywności nowotworu ważna jest także ocena proliferacji oraz żywotności komórek. Linia HEK293 w moich badaniach wykazywała zwiększoną proliferację pod wpływem PEM, w przeciwieństwie do komórek nowotworowych, których proliferacja zmalała. Podobne wyniki uzyskali Koziorowska i wsp., którzy w swoich badaniach zaznaczył, iż najkorzystniejszymi warunkami ekspozycji była fala elektromagnetyczna o kształcie sinusoidalnym i częstotliwościach 50 oraz 60Hz. (74) Wyniki uzyskane przez Provenzano i in. również wskazują, że ELF-EMF promuje różnicowanie komórek NB4 indukowanych tretynoiną. Po 96 godzinach ekspozycji przy 2 mT liczba komórek była o około jedną trzecią niższa w porównaniu do komórek traktowanych samą tretynoiną bez wykrywalnych oznak śmierci komórek. (104). Najkorzystniejszy czas na wywołanie śmierci komórek nowotworowych to krótki czas ekspozycji, wynoszący maksymalnie 72h (74,77,105,106).

Wraz ze spadkiem proliferacji w liniach pierwotnych komórek nowotworowych, w przeprowadzonym badaniu, koreluje spadek ekspresji *ADAM28* potwierdzając tym samym jego znaczenie w rozwoju raka jasnokomórkowego nerki. Z drugiej strony *ADAM28* nie był eksprymowany w HEK293 oraz Caki1 zarówno w grupie badanej jak i kontrolnej. Do tej pory

ekspresja *ADAM28* u ludzi została potwierdzona w limfocytach, tkankach limfoidalnych i komórkach nabłonka. Gen ulega nadekspresji w komórkach nowotworowych raka piersi, chrzęstniakomięsaku, raku głowy i szyi, ostrej białaczce limfoblastycznej z komórek B, raku pęcherza moczowego, drobnokomórkowym raku płuca, raku prostaty oraz raku trzustki (107). Z kolei Mochizuki i in. w lini 769-P nie potwierdzili produkcji białka ADAM28. Mochizuki i in. w swojej pracy zaznaczyli, że wyciszenie genu *ADAM28* zmniejsza zarówno wzrost guza pierwotnego, jak i spontaniczne przerzuty (108). W uzyskanych przeze mnie wynikach można zauważyć, że w pierwotnych liniach nowotworowych poddanych ekspozycji ELF-EMF osłabione są właściwości migracji, inwazji oraz przerzutowości w badaniu wiszącej kropli przy jednoczesnym spadku ekspresji białka ADAM28. ADAM28 był zalecany jako obiecujący cel terapeutyczny w walce z rozprzestrzenianiem się i progresją nowotworów. Gérard i in. w pokazali, że w genetycznie modyfikowanych myszach z pełnym brakiem ekspresji (z ang *knock out*) *ADAM28*, zwierzęta nieoczekiwanie wykazują zwiększoną kolonizację komórek nowotworowych w płucach lub piersi a ponadto zmniejszoną liczbę limfocytów T CD8 + (109). Uzyskane przeze mnie wyniki również potwierdzają, że *ADAM28* może być dobrym celem terapeutycznym w leczeniu ccRCC.

Na proliferację komórek ma także pośrednio wpływ gen *VEGFC*. Niestety efekty działania tego genu pod wpływem ELF-EMF nie są dobrze poznane. Zmiany w jego ekspresji w komórkach nowotworowych sugerują, że ELF-EMF zmniejsza ich wzrost poprzez zwiększenie ich apoptozy w wyniku zależnego od EMF wzrostu reaktywnych form tlenu, czy także szybkiego napływu jonów Ca^{2+} lub aktywacji określonych szlaków sygnałowych. Ndiaye i in. (110) badając ekspresję *VEGFC* wykazali, że jest ona zwiększona w komórkach nowotworowych w porównaniu do komórek zdrowych, jednak jej poziomy nie były jednakowe. Ekspresja *VEGFC* w komórkach z guzów przerzutowych osiągała porównywalny poziom do komórek zdrowych, przez co autorzy wywnioskowali, iż *VEGFC* ma istotny wpływ we wczesnych etapach rozwoju raka. Natomiast jego wysoki poziom staje się poniekąd szkodliwy podczas rozsiewu przerzutów. W przypadku genu *VEGFC*, autorzy publikacji przestrzegają przed wybieraniem tego genu jako celu terapeutycznego. W swoich badaniach dowiedli dodatkowo, że nadekspresja *VEGFC* była powiązana ze zwiększonym czasem wolnym od choroby i całkowitym przeżyciem u pacjentów z guzami bez przerzutów. Z drugiej strony, w niektórych przypadkach korelowała również ze zmniejszonym całkowitym przeżyciem pacjentów z obecnymi przerzutami. Wyniki uzyskane prze Furudoi i in.(111) wykazały natomiast, że nadekspresja *VEGFC* była dodatnio skorelowana ze stopniem patologicznym guza, inwazją limfatyczną i przerzutami, inwazją żylną, przerzutami do wątroby, stadium Dukes

i angiogenezą. W swojej pracy także zauważyłam, że poziom ekspresji *VEGFC* znacząco różnił się nie tylko w grupie badanej, ale również po poddaniu badanych linii ekspozycji na PEM. W szczególności w linii 769-P *VEGFC* był znacznie bardziej eksprymowany w porównaniu do pozostałych linii co by częściowo mogło potwierdzić teorię Ndiaye. Jednak w moich badaniach w 769-P po ekspozycji na ELF-EMF zostały zahamowane jej zdolności przerzutowe. Pomimo że liczne badania dowodzą istotną rolę *VEGFC* w tworzeniu przerzutów do węzłów chłonnych w wielu typach nowotworów należałoby dokładniej zbadać zachowanie i wpływ tego genu także i na szlaki sygnałowe po poddaniu komórek nowotworowych ekspozycji na PEM.

Funkcjonalnie ekspresja *NCAM1* jest związana z progresją choroby nowotworowej. Sasca i in. w badaniach nad ostrą białaczką szpikową zauważyli, że białko NCAM1 reguluje przeżycie, odporność na stres i jest odpowiedzialne za samoodnawianie blastów w ostrej białaczce szpikowej in vitro i in vivo. Jednak w różnych typach ostrej białaczki szpikowej ekspresja tego genu jest niejednorodna, wskazując na niespecyficzny mechanizm regulacji tegoż genu (112). Ponowna ekspresja *NCAM1* jest wykrywana w procesie regeneracji w niektórych kanalikach, a także w raku nerkowokomórkowym oraz w przerzutach RCC w ośrodkowym układzie nerwowym i nadnerczach (113). Cirović i in. wywnioskowali, że *NCAM1* wydaje się być obecny w tkance RCC niezależnie od typu histologicznego. Ekspresja *NCAM1* jest skorelowana z rozmiarem guza, inwazją okołonerkową, zajęciem żył nerkowych oraz stopniem Fuhrmana, więc gen ten jest użytecznym markerem określającym złośliwość nowotworu (114). W swojej pracy potwierdziłam spadek ekspresji *NCAM1* w stosunku do kontroli po poddaniu komórek na promieniowanie elektromagnetyczne o niskiej częstotliwości. Gen ten mógł wpłynąć na zdolności przerzutowe badanych linii powodując szybszą agregację komórek w badaniu wiszącej kropli, sugerując tym samym ponownie pozytywny wpływ PEM na badane linie komórkowe.

Wstępnie zaproponowano, że ROS pośredniczy w działaniu ELF-EMF. Dokładnie skoordynowana regulacja wewnątrzkomórkowych poziomów ROS jest ważnym procesem biorącym udział w kontroli proliferacji i różnicowania w komórkach ssaków (115). Wysoki poziom wewnątrzkomórkowego ROS jest cytotoksyczny i prowadzi do starzenia się i śmierci komórki (116), podczas gdy łagodne obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu ROS indukowanego przez przeciwutleniacze zwiększa proliferację komórek poprzez aktywację Akt i Erk1 / 2 (117,118). Co ciekawe, niektóre badania sugerują, że ekspozycja na ELF-EMF zwiększa lub zmniejsza poziomy wewnątrzkomórkowego ROS, wywołując w ten sposób różne efekty komórkowe. Doniesiono, że ekspozycja ELF-EMF 50 Hz przez 3 lub 24 godziny

zwiększa wytwarzanie ROS i uszkodzenie DNA w fibroblastach szczura (119). Z drugiej strony ekspozycja ludzkiej linii komórkowej mikrogleju na EMF 50 Hz o wartości 1 mT tłumiła śmierć komórki przez zmniejszenie wewnątrzkomórkowych poziomów ROS (120). Ekspozycja na 0,11 mT ELF-EMF zwiększała aktywność izoenzymów dysmutazy ponadtlenkowej i peroksydazy glutationowej, które są przeciwutleniaczami w celu katalizowania redukcji wewnątrzkomórkowego ROS, tym samym obniżając poziomy wewnątrzkomórkowego ROS w mysich komórkach płaskonabłonkowych (121).

Song i in. zaobserwowali podwyższone poziomy p-Akt i p-Erk1/2 spowodowane prawdopodobnie ekspozycją na jednolite ELF-EMF, które mogą wyjaśniać zwiększoną proliferację komórek indukowaną przez ELF-EMF (122). W przeciwieństwie do Song i in. wkrótce po zakończonej ekspozycji ELF-EMF zaobserwowałam znaczny wzrost poziomów ROS, tak jak Provenzano i in. (104). Zwiększoną produkcję ROS odnotowałam ponadto w linii komórkowej HEK293 choć mogło to wynikać z faktu, że komórki były poddawane działaniu PEM poza inkubatorem. Zbadanie tego szczegółowo jest dość ważne ze względu na fakt iż najbardziej wrażliwe na stres oksydacyjny są komórki nabłonka cewek nerkowych a ich uszkodzenie może prowadzić do uszkodzenia nerki (123). Mechanizm kryjący się za ekspozycją na ELF-EMF zmieniający poziomy wewnątrzkomórkowego ROS powinien być dalej badany w celu wyjaśnienia biologicznych skutków ELF-EMF.

Większość naukowców badających wpływ ELF-EMF twierdzi, że wykorzystali urządzenie wytwarzające „jednolite ELF-EMF", podczas gdy urządzenie zostało umieszczone w inkubatorze CO_2. Inkubator, a zwłaszcza jego wewnętrzne komory, są zwykle wykonane z metalu, dlatego PEM, na ekspozycję którego były poddane komórki, nie byłby jednolity. Zaprojektowany przez Son i in. nowy generator ELF-EMF miał utrzymywać jednorodność PEM w inkubatorze komórkowym. Wyniki przez nich uzyskane wykazały, że ekspozycja na jednolite ELF-EMF nie indukowała uszkodzenia DNA ani śmierci komórki, ale raczej promowała proliferację komórek zarówno w pierwotnych fibroblastach IMR-90, jak i komórkach HeLa w sposób zależny od siły pola magnetycznego i czasu. Zwiększona proliferacja indukowana przez ELF-EMF była odwracalna i nie modyfikowała rozkładu cyklu komórkowego (122). Pomimo tego, że w niniejszym badaniu komórki znajdowały się 30min poza inkubatorem uzyskane rezultaty są podobne do tych uzyskanych przez Song i in., choć w moim badaniu komórki nowotworowe wykazywały się zmniejszoną proliferacją. Nasze wyniki wskazują również, że ELF-EMF indukował zatrzymanie G0 / G1, co może prowadzić do apoptozy w komórkach nowotworowych.

Analiza sekrecji cytokin wykazała, że PEM istotnie wpływa na sekrecję TGF-β1. TGF-β1 który jest dimeryczną izoformą polipeptydu TGF-β1 o masie 25 kDa, odpowiada za wiele ważnych aspektów funkcjonowania komórek: różnicowanie, adhezję, migrację, angiogenezę, apoptozę, proliferację i nadzór immunologiczny. Paradoksalnie, pomimo swojej zdolności do hamowania proliferacji komórek, TGF-β1 jest silnie eksprymowany w tkance nowotworowej wielu pacjentów z różnym rodzajem nowotworu. Jako cytokina TGF-β1 moduluje aktywację limfocytów w konsekwencji lokalnie wpływając na odpowiedź immunologiczną w ccRCC hamując działanie immunologiczne na nowotwór i promując powstawanie przerzutów. Wiele badań potwierdziło korelację zwiększonych poziomów ekspresji TGF-β1 z zaawansowanym stadium nowotworu i zmniejszoną przeżywalnością pacjentów.

Podwyższona ekspresja TGF-β1 u tych pacjentów jest związana z kilkoma specyficznymi aspektami progresji guza, które obejmują m.in. przemianę nabłonkowo-mezenchymalną, angiogenezę oraz przerzuty (124–126). Model ELF-EMF użyty przeze mnie wykazał istotny wpływ na linię przerzutową Caki1, w której stężenie TGF-β1 zmalało, co może sugerować immunosupresyjny charakter ELF-EMF. PEM o niskiej częstotliwości może więc zmniejszać „złośliwość" linii przerzutowej.

Co ważne, podwyższone stężenie TGF-β1 w komórkach nowotworowych mogą wynikać nie tylko ze zwiększonej sekrecji tej cytokiny przez same komórki nowotworowe, ale także z rekrutacji do mikrośrodowiska nowotworu przez inne rodzaje komórek, również produkujące TGF-β1, powiązane bezpośrednio z komórkami nowotworowymi w tym fibroblasty zrębu, makrofagi związane z guzem, komórki dendrytyczne i niedojrzałe komórki szpikowe (124). Tak więc ELF-EMF w warunkach *in vivo* niestety może już utracić swój immunosupresyjny charakter. Ponadto TGF-β wywiera wpływ na komórki śródbłonka i powoduje wzrost ekspresji VEGF, który też sprzyja angiogenezie. Dodatkowo, wydaje się, że zwiększone stężenie VEGF rekrutuje więcej komórek śródbłonka, co prowadzi do przedłużonej angiogenezy. W niniejszym badniu cytokina VEGF jest sekrecjonowana w śladowych ilościach przez większość linii komórkowych, bądź w ogóle nie ulega sekrecji, ciężko więc określić korelację pomiędzy stężeniem TGF-β1 a VEGF (126).

Uzyskane przeze mnie wyniki pozostałych, badanych sekrecjonowanych cytokin, zdają się potwierdzać założenia innych badaczy, jakoby ELF-EMF nie ma istotnego wpływu na układ immunologiczny człowieka, a tym samym na mikrośrodowisko immunologiczne nowotworu, w tym przypadku raka jasnokomórkowego nerki, przez swój niski poziom energii. Niski poziom cytokin w nadsączu może mieć jednak wpływ na pozostałe czynniki

jak produkcja białek związanych z proliferacją czy agresywnością nowotworów. Sitaram i in.(127) wykazali, że wysoka ekspresja *ADAM28* jest skorelowana z równie wysoką ekspresją i produkcją TNF-α, co mogłoby wytłumaczyć niski poziom produkcji białka ADAM28 w badanych przeze mnie liniach komórkowych.

Moja praca pokazuje inny wpływ ekspozycji ELF-EMF na komórki nowotworowe ccRCC i nienowotworowe nerki. Badania te ujawniły, że EMF może służyć jako potencjalne narzędzie do manipulowania żywotnością komórek, poprzez udział ROS, prawdopodobnie związanych z nimi szlaków sygnałowych oraz genów mających ważny udział w charakteryzowaniu złośliwości nowotworu, otwierając nowe pole badań cenne dla przyszłych zastosowań klinicznych. Pomimo ograniczeń naszego badania, przedstawiam ważny dowód koncepcji pokazujący, że ELF-EMF można uznać za czynnik hamujący progresję ccRCC.

Niestety niespójność wyników, uzyskanych w różnych badaniach, w których analizowany był wpływ ELF-EMF, silnie sugeruje, że istnieje przeoczony parametr, który odgrywa kluczową rolę w modulowaniu efektów EMF na komórki. Działanie komórkowe jednolitego ELF-EMF powinno być dalej badane w różnych typach komórek ludzkich, aby zrozumieć ogólne efekty ELF-EMF. Analizując wpływ PEM nie tylko na komórki nowotworowe, należałoby ujednolicić model eksperymentalny. Niemniej jednak przy tak przyspieszonym rozwoju technologicznym może być to praktycznie niemożliwe.

7. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań można wysunąć następujące wnioski:

- PEM o niskiej częstotliwości ma zróżnicowany wpływ na produkcję białek ADAM28, NCAM1 i VEGFC

- PEM o niskiej częstotliwości wykazuje hamujący wpływ na proliferację komórek nowotworowych pierwotnych, ich zdolności migracyjne oraz inwazyjne a także zdolności przerzutowe

- PEM o niskiej częstotliwości powoduje zwiększenie apoptozy komórek nowotworowych oraz ilości reaktywnych form tlenu

- PEM o niskiej częstotliwości nie ma znaczącego wpływu na środowisko immunologiczne badanych linii raka jasnokomórkowego nerki

- Efekt działania PEM zależy od określonego stanu metabolicznego lub etapu cyklu komórkowego badanych komórek

8. Bibliografia

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, i in. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. International Journal of Cancer. 2015;136(5):E359–86.

2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 1 listopad 2018;68(6):394–424.

3. Ljungberg B, Albiges L, Abu-Ghanem Y, Bensalah K, Dabestani S, Montes SF-P, i in. European Association of Urology Guidelines on Renal Cell Carcinoma: The 2019 Update. European Urology [Internet]. 22 luty 2019 [cytowane 28 luty 2019];0(0). Dostępne na: https://www.europeanurology.com/article/S0302-2838(19)30152-6/abstract

4. Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Weltgesundheitsorganisation, International Agency for Research on Cancer, redaktorzy. WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs: ... consensus and editorial meeting at the University Hospital Zürich, Zürich, 11-13 March, 2015. Lyon: IARC Press; 2016. 356 s. (World Health Organization classification of tumours).

5. Stewart BW, Wild C. World cancer report 2014. 2014.

6. Wojciechowska U, Didkowska J. Zachorowania i zgony na nowotwory złośliwe w Polsce. Krajowy Rejestr Nowotworów, Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej - Curie. Dostępne na stronie http://onkologia.org.pl/raporty/ dostęp z dnia 26/02/2019. s. http://onkologia.org.pl/raporty/.

7. Cho E, Adami H-O, Lindblad P. Epidemiology of renal cell cancer. Hematol Oncol Clin North Am. sierpień 2011;25(4):651–65.

8. Hunt JD, van der Hel OL, McMillan GP, Boffetta P, Brennan P. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. Int J Cancer. 10 marzec 2005;114(1):101–8.

9. Kabaria R, Klaassen Z, Terris MK. Renal cell carcinoma: links and risks. Int J Nephrol Renovasc Dis. 7 marzec 2016;9:45–52.

10. Ljungberg B, Campbell SC, Choi HY, Cho HY, Jacqmin D, Lee JE, i in. The epidemiology of renal cell carcinoma. Eur Urol. październik 2011;60(4):615–21.

11. Renehan AG, Soerjomataram I, Tyson M, Egger M, Zwahlen M, Coebergh JW, i in. Incident cancer burden attributable to excess body mass index in 30 European countries. Int J Cancer. 1 luty 2010;126(3):692–702.

12. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. Lancet. 16 luty 2008;371(9612):569–78.

13. Lee JE, Männistö S, Spiegelman D, Hunter DJ, Bernstein L, van den Brandt PA, i in. Intakes of fruit, vegetables, and carotenoids and renal cell cancer risk: a pooled analysis

of 13 prospective studies. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. czerwiec 2009;18(6):1730–9.

14. Lee JE, Spiegelman D, Hunter DJ, Albanes D, Bernstein L, van den Brandt PA, i in. Fat, protein, and meat consumption and renal cell cancer risk: a pooled analysis of 13 prospective studies. J Natl Cancer Inst. 3 grudzień 2008;100(23):1695–706.

15. Schlehofer B, Pommer W, Mellemgaard A, Stewart JH, McCredie M, Niwa S, i in. International renal-cell-cancer study. VI. the role of medical and family history. Int J Cancer. 11 czerwiec 1996;66(6):723–6.

16. Denton MD, Magee CC, Ovuworie C, Mauiyyedi S, Pascual M, Colvin RB, i in. Prevalence of renal cell carcinoma in patients with ESRD pre-transplantation: a pathologic analysis. Kidney Int. czerwiec 2002;61(6):2201–9.

17. Neuzillet Y, Tillou X, Mathieu R, Long J-A, Gigante M, Paparel P, i in. Renal Cell Carcinoma (RCC) in Patients With End-Stage Renal Disease Exhibits Many Favourable Clinical, Pathologic, and Outcome Features Compared With RCC in the General Population. European Urology. 1 sierpień 2011;60(2):366–73.

18. Montani M, Heinimann K, von Teichman A, Rudolph T, Perren A, Moch H. VHL-gene deletion in single renal tubular epithelial cells and renal tubular cysts: further evidence for a cyst-dependent progression pathway of clear cell renal carcinoma in von Hippel-Lindau disease. Am J Surg Pathol. czerwiec 2010;34(6):806–15.

19. Weikert S, Boeing H, Pischon T, Weikert C, Olsen A, Tjonneland A, i in. Blood pressure and risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. Am J Epidemiol. 15 luty 2008;167(4):438–46.

20. McCredie M, Pommer W, McLaughlin JK, Stewart JH, Lindblad P, Mandel JS, i in. International renal-cell cancer study. II. Analgesics. Int J Cancer. 27 styczeń 1995;60(3):345–9.

21. Cho E, Curhan G, Hankinson SE, Kantoff P, Atkins MB, Stampfer M, i in. Prospective evaluation of analgesic use and risk of renal cell cancer. Arch Intern Med. 12 wrzesień 2011;171(16):1487–93.

22. WHO. Arsenic in Drinking-water Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Geneva: World Health Organization; 2011. Report No.: WHO/SDE/WSH/03.04/75/Rev/1.

23. Mostafa MG, Cherry N. Arsenic in drinking water and renal cancers in rural Bangladesh. Occup Environ Med. 1 listopad 2013;70(11):768–73.

24. Kelsh MA, Alexander DD, Mink PJ, Mandel JH. Occupational trichloroethylene exposure and kidney cancer: a meta-analysis. Epidemiology. styczeń 2010;21(1):95–102.

25. WHO. Trichloroethene in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Geneva: World Health Organization; 2003. Report No.: WHO/SDE/WSH/05.08/22.

26. Scott CS, Jinot J. Trichloroethylene and cancer: systematic and quantitative review of epidemiologic evidence for identifying hazards. Int J Environ Res Public Health. 2011;8(11):4238–72.

27. Guha N, Loomis D, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, i in. Carcinogenicity of trichloroethylene, tetrachloroethylene, some other chlorinated solvents, and their metabolites. Lancet Oncol. grudzień 2012;13(12):1192–3.

28. Escudier B, Porta C, Schmidinger M, Rioux-Leclercq N, Bex A, Khoo V, i in. Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol [Internet]. [cytowane 28 luty 2019]; Dostępne na: https://academic.oup.com/annonc/advance-article/doi/10.1093/annonc/mdz056/5345645

29. Thorstenson A, Bergman M, Scherman-Plogell A-H, Hosseinnia S, Ljungberg B, Adolfsson J, i in. Tumour characteristics and surgical treatment of renal cell carcinoma in Sweden 2005–2010: a population-based study from the National Swedish Kidney Cancer Register. Scandinavian Journal of Urology. 1 czerwiec 2014;48(3):231–8.

30. Kim HL, Belldegrun AS, Freitas DG, Bui MHT, Han K-R, Dorey FJ, i in. Paraneoplastic Signs and Symptoms of Renal Cell Carcinoma: Implications for Prognosis. The Journal of Urology. 1 listopad 2003;170(5):1742–6.

31. Ma H, Shen G, Liu B, Yang Y, Ren P, Kuang A. Diagnostic performance of 18F-FDG PET or PET/CT in restaging renal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. Nuclear Medicine Communications. luty 2017;38(2):156–63.

32. Volpe A, Kachura J, Geddie W, Evans A, Gharajeh A, Saravanan A, i in. Techniques, Safety and Accuracy of Sampling of Renal Tumors by Fine Needle Aspiration and Core Biopsy. The Journal of Urology. 1 sierpień 2007;178(2):379–86.

33. Marconi L, Dabestani S, Lam TB, Hofmann F, Stewart F, Norrie J, i in. Systematic Review and Meta-analysis of Diagnostic Accuracy of Percutaneous Renal Tumour Biopsy. European Urology. 1 kwiecień 2016;69(4):660–73.

34. Dagher J, Delahunt B, Rioux-Leclercq N, Egevad L, Srigley JR, Coughlin G, i in. Clear cell renal cell carcinoma: validation of World Health Organization/International Society of Urological Pathology grading. Histopathology. 2017;71(6):918–25.

35. Neumann HP, Bender BU, Berger DP, Laubenberger J, Schultze-Seemann W, Wetterauer U, i in. Prevalence, morphology and biology of renal cell carcinoma in von Hippel-Lindau disease compared to sporadic renal cell carcinoma. J Urol. październik 1998;160(4):1248–54.

36. Bonsib SM. The renal sinus is the principal invasive pathway: a prospective study of 100 renal cell carcinomas. Am J Surg Pathol. grudzień 2004;28(12):1594–600.

37. Hoffmann NE, Gillett MD, Cheville JC, Lohse CM, Leibovich BC, Blute ML. Differences in organ system of distant metastasis by renal cell carcinoma subtype. J Urol. luty 2008;179(2):474–7.

38. Gong J, Maia MC, Dizman N, Govindarajan A, Pal SK. Metastasis in renal cell carcinoma: Biology and implications for therapy. Asian J Urol. październik 2016;3(4):286–92.

39. Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, Swanton C, Albiges L, Schmidinger M, i in. Renal cell carcinoma. Nat Rev Dis Primers. 9 marzec 2017;3:17009.

40. Muglia VF, Prando A. Renal cell carcinoma: histological classification and correlation with imaging findings. Radiol Bras. 2015;48(3):166–74.

41. Goyal R, Gersbach E, Yang XJ, Rohan SM. Differential Diagnosis of Renal Tumors With Clear Cytoplasm: Clinical Relevance of Renal Tumor Subclassification in the Era of Targeted Therapies and Personalized Medicine. Archives of Pathology & Laboratory Medicine. kwiecień 2013;137(4):467–80.

42. Andeen NK, Tretiakova M. Clear cell renal cell carcinoma. PathologyOutlines.com website [Internet]. 2016 [cytowane 6 marzec 2019]. Dostępne na: http://www.pathologyoutlines.com/topic/kidneytumormalignantrccclear.html

43. Sountoulides P, Metaxa L, Cindolo L. Atypical presentations and rare metastatic sites of renal cell carcinoma: a review of case reports. J Med Case Reports. 2 wrzesień 2011;5:429.

44. Trpkov K, Grignon DJ, Bonsib SM, Amin MB, Billis A, Lopez-Beltran A, i in. Handling and staging of renal cell carcinoma: the International Society of Urological Pathology Consensus (ISUP) conference recommendations. Am J Surg Pathol. październik 2013;37(10):1505–17.

45. Delahunt B, Cheville JC, Martignoni G, Humphrey PA, Magi-Galluzzi C, McKenney J, i in. The International Society of Urological Pathology (ISUP) grading system for renal cell carcinoma and other prognostic parameters. Am J Surg Pathol. październik 2013;37(10):1490–504.

46. Renshaw AA, Cheville JC. Quantitative tumour necrosis is an independent predictor of overall survival in clear cell renal cell carcinoma. Pathology. styczeń 2015;47(1):34–7.

47. Tan PH, Cheng L, Rioux-Leclercq N, Merino MJ, Netto G, Reuter VE, i in. Renal tumors: diagnostic and prognostic biomarkers. Am J Surg Pathol. październik 2013;37(10):1518–31.

48. Yan F, Wang Y, Liu C, Zhao H, Zhang L, Lu X, i in. Identify clear cell renal cell carcinoma related genes by gene network. Oncotarget. 30 listopad 2017;8(66):110358–66.

49. Brugarolas J. Molecular Genetics of Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. J Clin Oncol. 20 czerwiec 2014;32(18):1968–76.

50. Rosner I, Bratslavsky G, Pinto PA, Linehan WM. The Clinical Implications of the Genetics of Renal Cell Carcinoma. Urol Oncol. 2009;27(2):131–6.

51. Bierer S, Herrmann E, Köpke T, Neumann J, Eltze E, Hertle L, i in. Lymphangiogenesis in kidney cancer: Expression of VEGF-C, VEGF-D and VEGFR-3 in clear cell and papillary renal cell carcinoma. Oncology Reports. 1 październik 2008;20(4):721–5.

52. Gunningham SP, Currie MJ, Han C, Turner K, Scott PA, Robinson BA, i in. Vascular endothelial growth factor-B and vascular endothelial growth factor-C expression in renal cell carcinomas: regulation by the von Hippel-Lindau gene and hypoxia. Cancer Res. 1 kwiecień 2001;61(7):3206–11.

53. Đorđević G, Matušan-Ilijaš K, Babarović E, Hadžisejdić I, Grahovac M, Grahovac B, i in. Hypoxia inducible factor-1α correlates with vascular endothelial growth factor A and C indicating worse prognosis in clear cell renal cell carcinoma. J Exp Clin Cancer Res. 20 marzec 2009;28(1):40.

54. Mochizuki S, Okada Y. ADAMs in cancer cell proliferation and progression. Cancer Science. 2007;98(5):621–8.

55. Mochizuki S, Soejima K, Shimoda M, Abe H, Sasaki A, Okano HJ, i in. Effect of ADAM28 on Carcinoma Cell Metastasis by Cleavage of von Willebrand Factor. J Natl Cancer Inst. 20 czerwiec 2012;104(12):906–22.

56. Murphy G. The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. Nature Reviews Cancer. grudzień 2008;8(12):932–41.

57. Mochizuki S, Tanaka R, Shimoda M, Onuma J, Fujii Y, Jinno H, i in. Connective tissue growth factor is a substrate of ADAM28. Biochemical and Biophysical Research Communications. 26 listopad 2010;402(4):651–7.

58. Ćirović S, Vještica J, Mueller CA, Tatić S, Vasiljević J, Milenković S, i in. NCAM and FGFR1 coexpression and colocalization in renal tumors. Int J Clin Exp Pathol. 15 marzec 2014;7(4):1402–14.

59. Yap L-W, Brok J, Pritchard-Jones K. Role of CD56 in Normal Kidney Development and Wilms Tumorigenesis. Fetal and Pediatric Pathology. 2 styczeń 2017;36(1):62–75.

60. Şenbabaoğlu Y, Gejman RS, Winer AG, Liu M, Van Allen EM, de Velasco G, i in. Tumor immune microenvironment characterization in clear cell renal cell carcinoma identifies prognostic and immunotherapeutically relevant messenger RNA signatures. Genome Biol. 17 2016;17(1):231.

61. Ishibashi K, Koguchi T, Matsuoka K, Onagi A, Tanji R, Takinami-Honda R, i in. Interleukin-6 induces drug resistance in renal cell carcinoma. Fukushima J Med Sci. 8 grudzień 2018;64(3):103–10.

62. Kamińska K, Czarnecka AM, Escudier B, Lian F, Szczylik C. Interleukin-6 as an emerging regulator of renal cell cancer. Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations. listopad 2015;33(11):476–85.

63. Fu Q, Xu L, Wang Y, Jiang Q, Liu Z, Zhang J, i in. Tumor-associated Macrophage-derived Interleukin-23 Interlinks Kidney Cancer Glutamine Addiction with Immune Evasion. European Urology. maj 2019;75(5):752–63.

64. Guan X, Liu Z, Zhang J, Jin X. Myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma is correlated with CCL2, IL-17 and IL-18 expression in blood and tumors. Adv Clin Exp Med. 31 lipiec 2018;27(7):947–53.

65. Zhang T, Zhu J, George DJ, Nixon AB. Metastatic clear cell renal cell carcinoma: Circulating biomarkers to guide antiangiogenic and immune therapies. Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations. listopad 2016;34(11):510–8.

66. An H, Zhu Y, Xie H, Liu Y, Liu W, Fu Q, i in. Increased expression of interleukin-8 is an independent indicator of poor prognosis in clear-cell renal cell carcinoma. Tumor Biol. kwiecień 2016;37(4):4523–9.

67. Promieniowanie elektromagnetyczne. Wikipedia [Internet]. 2008 [cytowane 9 październik 2018]. Dostępne na: https://pl.wikipedia.org/wiki/Promieniowanie_elektromagnetyczne#/media/File:EM_Spectrum_Properties_pl.svg

68. Schüz J, Ahlbom A. Exposure to electromagnetic fields and the risk of childhood leukaemia: a review. Radiat Prot Dosimetry. 2008;132(2):202–11.

69. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Non-ionizing radiation, Part 1: static and extremely low-frequency (ELF) electric and magnetic fields. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 2002;80:1–395.

70. Arockiasamy P, Mohan S. Design of compact electromagnetic impulse radiating antenna for melanoma treatment. Electromagnetic Biology and Medicine. 2 kwiecień 2016;35(2):134–42.

71. Sanie-Jahromi F, Saadat I, Saadat M. Effects of extremely low frequency electromagnetic field and cisplatin on mRNA levels of some DNA repair genes. Life Sciences. grudzień 2016;166:41–5.

72. Provenzano AE, Amatori S, Nasoni MG, Persico G, Russo S, Mastrogiacomo AR, i in. Effects of Fifty-Hertz Electromagnetic Fields on Granulocytic Differentiation of ATRA-Treated Acute Promyelocytic Leukemia NB4 Cells. CPB. 2018;46(1):389–400.

73. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. Cell. 9 marzec 2017;168(6):960–76.

74. Koziorowska A, Romerowicz-Misielak M, Sołek P, Koziorowski M. Extremely low frequency variable electromagnetic fields affect cancer and noncancerous cells in vitro differently: Preliminary study. Electromagnetic Biology and Medicine. 2 styczeń 2018;37(1):35–42.

75. Destefanis M, Viano M, Leo C, Gervino G, Ponzetto A, Silvagno F. Extremely low frequency electromagnetic fields affect proliferation and mitochondrial activity of human cancer cell lines. International Journal of Radiation Biology. 2 grudzień 2015;91(12):964–72.

76. KEGG PATHWAY Database [Internet]. [cytowane 18 marzec 2019]. Dostępne na: https://www.genome.jp/kegg/pathway.html#disease

77. Zimmerman JW, Pennison MJ, Brezovich I, Yi N, Yang CT, Ramaker R, i in. Cancer cell proliferation is inhibited by specific modulation frequencies. Br J Cancer. 17 styczeń 2012;106(2):307–13.

78. D'Angelo C, Costantini E, Kamal MA, Reale M. Experimental model for ELF-EMF exposure: Concern for human health. Saudi J Biol Sci. styczeń 2015;22(1):75–84.

79. Rosado MM, Simkó M, Mattsson M-O, Pioli C. Immune-Modulating Perspectives for Low Frequency Electromagnetic Fields in Innate Immunity. Front Public Health [Internet]. 26 marzec 2018 [cytowane 9 marzec 2020];6. Dostępne na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5879099/

80. Kleijn S de, Bouwens M, Verburg-van Kemenade BML, Cuppen JJM, Ferwerda G, Hermans PWM. Extremely low frequency electromagnetic field exposure does not modulate toll-like receptor signaling in human peripheral blood mononuclear cells. Cytokine. 1 kwiecień 2011;54(1):43–50.

81. Mahaki H, Jabarivasal N, Sardanian K, Zamani A. Effects of Various Densities of 50 Hz Electromagnetic Field on Serum IL-9, IL-10, and TNF-α Levels. Int J Occup Environ Med (The IJOEM). 5 styczeń 2020;11(1 January):1572-24–32.

82. Nie Y, Chen Y, Mou Y, Weng L, Xu Z, Du Y, i in. Low Frequency Magnetic Fields Enhance Antitumor Immune Response against Mouse H22 Hepatocellular Carcinoma. PLOS ONE. 20 listopad 2013;8(11):e72411.

83. Sobiczewska E, Szmigielski S. [Electromagnetic fields hypersensitivity]. Medycyna pracy. 2009;60(3):235–41.

84. Berthelot J-M. Is electromagnetic hypersensitivity entirely ascribable to nocebo effects? T. 83, Joint Bone Spine. 2016. s. 121–3.

85. Gaudin N. IARC classifies radiofrequency electromagnetic fields as possibly carcinogenic to humans. International Agency for Research on Cancer, press …. 2011;2008(May):1–6.

86. Xu H, Zhang J, Lei Y, Han Z, Rong D, Yu Q, i in. Low frequency pulsed electromagnetic field promotes C2C12 myoblasts proliferation via activation of MAPK/ERK pathway. Biochemical and Biophysical Research Communications. 7 październik 2016;479(1):97–102.

87. Vadalà M, Vallelunga A, Palmieri L, Palmieri B, Morales-Medina JC, Iannitti T. Mechanisms and therapeutic applications of electromagnetic therapy in Parkinson's disease. Behav Brain Funct [Internet]. 7 wrzesień 2015 [cytowane 6 marzec 2019];11. Dostępne na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4562205/

88. Mahaki H, Tanzadehpanah H, Jabarivasal N, Sardanian K, Zamani A. A review on the effects of extremely low frequency electromagnetic field (ELF-EMF) on cytokines of innate and adaptive immunity. Electromagnetic Biology and Medicine. 2 styczeń 2019;38(1):84–95.

89. Williams RD, Elliott AY, Stein N, Fraley EE. In vitro cultivation of human renal cell cancer. II. Characterization of cell lines. In Vitro. wrzesień 1978;14(9):779–86.

90. Brodaczewska KK, Szczylik C, Fiedorowicz M, Porta C, Czarnecka AM. Choosing the right cell line for renal cell cancer research. Mol Cancer [Internet]. 19 grudzień 2016 [cytowane 11 grudzień 2018];15. Dostępne na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5168717/

91. Fogh J, Wright WC, Loveless JD. Absence of HeLa Cell Contamination in 169 Cell Lines Derived From Human Tumors. J Natl Cancer Inst. 1 luty 1977;58(2):209–14.

92. Foty R. A Simple Hanging Drop Cell Culture Protocol for Generation of 3D Spheroids. J Vis Exp [Internet]. 6 maj 2011 [cytowane 8 wrzesień 2020];(51). Dostępne na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3197119/

93. Justus CR, Leffler N, Ruiz-Echevarria M, Yang LV. In vitro Cell Migration and Invasion Assays. J Vis Exp [Internet]. 1 czerwiec 2014 [cytowane 18 grudzień 2018];(88). Dostępne na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4186330/

94. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, i in. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. Oxid Med Cell Longev [Internet]. 2017 [cytowane 8 wrzesień 2020];2017. Dostępne na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5551541/

95. Houser B. Bio-Rad's Bio-Plex® suspension array system, xMAP technology overview. Arch Physiol Biochem. październik 2012;118(4):192–6.

96. Katsir G, Parola AH. Enhanced Proliferation Caused by a Low Frequency Weak Magnetic Field in Chick Embryo Fibroblasts Is Suppressed by Radical Scavengers. Biochemical and Biophysical Research Communications. 27 listopad 1998;252(3):753–6.

97. Morabito C, Guarnieri S, Fanò G, Mariggiò MA. Effects of Acute and Chronic Low Frequency Electromagnetic Field Exposure on PC12 Cells during Neuronal Differentiation. CPB. 2010;26(6):947–58.

98. Jonge HJM de, Fehrmann RSN, Bont ESJM de, Hofstra RMW, Gerbens F, Kamps WA, i in. Evidence Based Selection of Housekeeping Genes. PLOS ONE. 19 wrzesień 2007;2(9):e898.

99. Rezaie-Tavirani M, Hasanzadeh H, Seyyedi S, Zali H. Proteomic Analysis of the Effect of Extremely Low-Frequency Electromagnetic Fields (ELF-EMF) With Different Intensities in SH-SY5Y Neuroblastoma Cell Line. J Lasers Med Sci. 2017;8(2):79–83.

100. Lai J, Zhang Y, Zhang J, Liu X, Ruan G, Chaugai S, i in. Effects of 100-μT extremely low frequency electromagnetic fields exposure on hematograms and blood chemistry in rats. J Radiat Res. styczeń 2016;57(1):16–24.

101. Delle Monache S, Angelucci A, Sanità P, Iorio R, Bennato F, Mancini F, i in. Inhibition of Angiogenesis Mediated by Extremely Low-Frequency Magnetic Fields (ELF-MFs). PLoS One [Internet]. 14 listopad 2013 [cytowane 21 sierpień 2020];8(11). Dostępne na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3828379/

102. Hasanzadeh H, Rezaie-Tavirani M, Seyyedi SS, Zali H, Heydari Keshel S, Jadidi M, i in. Effect of ELF-EMF Exposure on Human Neuroblastoma Cell Line: a Proteomics Analysis. Iran J Cancer Prev. 2014;7(1):22–7.

103. Sulpizio M, Falone S, Amicarelli F, Marchisio M, Giuseppe FD, Eleuterio E, i in. Molecular basis underlying the biological effects elicited by extremely low-frequency magnetic field (ELF-MF) on neuroblastoma cells. Journal of Cellular Biochemistry. 2011;112(12):3797–806.

104. Provenzano AE, Amatori S, Nasoni MG, Persico G, Russo S, Mastrogiacomo AR, i in. Effects of Fifty-Hertz Electromagnetic Fields on Granulocytic Differentiation of ATRA-Treated Acute Promyelocytic Leukemia NB4 Cells. CPB. 2018;46(1):389–400.

105. Koh EK, Ryu B-K, Jeong D-Y, Bang I-S, Nam MH, Chae K-S. A 60-Hz sinusoidal magnetic field induces apoptosis of prostate cancer cells through reactive oxygen species. International Journal of Radiation Biology. 1 styczeń 2008;84(11):945–55.

106. Crocetti S, Beyer C, Schade G, Egli M, Fröhlich J, Franco-Obregón A. Low Intensity and Frequency Pulsed Electromagnetic Fields Selectively Impair Breast Cancer Cell Viability. PLoS One [Internet]. 11 wrzesień 2013 [cytowane 12 luty 2020];8(9). Dostępne na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3770670/

107. Wei L, Wen J-Y, Chen J, Ma X-K, Wu D-H, Chen Z-H, i in. Oncogenic ADAM28 induces gemcitabine resistance and predicts a poor prognosis in pancreatic cancer. World J Gastroenterol. 7 październik 2019;25(37):5590–603.

108. Mochizuki S, Soejima K, Shimoda M, Abe H, Sasaki A, Okano HJ, i in. Effect of ADAM28 on Carcinoma Cell Metastasis by Cleavage of von Willebrand Factor. J Natl Cancer Inst. 20 czerwiec 2012;104(12):906–22.

109. Gérard C, Hubeau C, Carnet O, Bellefroid M, Sounni NE, Blacher S, i in. Microenvironment-derived ADAM28 prevents cancer dissemination. Oncotarget. 14 grudzień 2018;9(98):37185–99.

110. Ndiaye PD, Dufies M, Giuliano S, Douguet L, Grépin R, Durivault J, i in. VEGFC acts as a double-edged sword in renal cell carcinoma aggressiveness. Theranostics. 21 styczeń 2019;9(3):661–75.

111. Furudoi A, Tanaka S, Haruma K, Kitadai Y, Yoshihara M, Chayama K, i in. Clinical Significance of Vascular Endothelial Growth Factor C Expression and Angiogenesis at the Deepest Invasive Site of Advanced Colorectal Carcinoma. Oncology. 2002;62(2):157–66.

112. Sasca D, Szybinski J, Schüler A, Shah V, Heidelberger J, Haehnel PS, i in. NCAM1 (CD56) promotes leukemogenesis and confers drug resistance in AML. Blood. 23 maj 2019;133(21):2305–19.

113. Matak D, Szymanski L, Szczylik C, Sledziewski R, Lian F, Bartnik E, i in. Biology of renal tumour cancer stem cells applied in medicine. Contemp Oncol (Pozn). 2015;19(1A):A44–51.

114. Cirović SL, Cegar BS, Vjestica JM, Dundjerović DM, Stojanović MM, Vuksanović AM, i in. Expression of neural cell adhesion molecule in renal cell carcinoma. Acta Chir Iugosl. 2012;59(1):39–44.

115. Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Reactive Oxygen Species as Intracellular Messengers During Cell Growth and Differentiation. CPB. 2001;11(4):173–86.

116. Panieri E, Gogvadze V, Norberg E, Venkatesh R, Orrenius S, Zhivotovsky B. Reactive oxygen species generated in different compartments induce cell death, survival, or senescence. Free Radical Biology and Medicine. 1 kwiecień 2013;57:176–87.

117. Ulrich-Merzenich G, Zeitler H, Panek D, Bokemeyer D, Vetter H. Vitamin C promotes human endothelial cell growth via the ERK-signaling pathway. Eur J Nutr. 1 marzec 2007;46(2):87–94.

118. Song J, Park J, Oh Y, Lee JE. Glutathione Suppresses Cerebral Infarct Volume and Cell Death after Ischemic Injury: Involvement of FOXO3 Inactivation and Bcl2 Expression. Oxid Med Cell Longev [Internet]. 2015 [cytowane 12 luty 2020];2015. Dostępne na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4334940/

119. Wolf FI, Torsello A, Tedesco B, Fasanella S, Boninsegna A, D'Ascenzo M, i in. 50-Hz extremely low frequency electromagnetic fields enhance cell proliferation and DNA damage: possible involvement of a redox mechanism. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. marzec 2005;1743(1–2):120–9.

120. Duong CN, Kim JY. Exposure to electromagnetic field attenuates oxygen-glucose deprivation-induced microglial cell death by reducing intracellular Ca2+ and ROS. International Journal of Radiation Biology. 2 kwiecień 2016;92(4):195–201.

121. Polaniak R, Bułdak RJ, Karoń M, Birkner K, Kukla M, Żwirska-Korczala K, i in. Influence of an Extremely Low Frequency Magnetic Field (ELF-EMF) on Antioxidative Vitamin E Properties in AT478 Murine Squamous Cell Carcinoma Culture In Vitro. Int J Toxicol. 1 marzec 2010;29(2):221–30.

122. Song K, Im SH, Yoon YJ, Kim HM, Lee HJ, Park GS. A 60 Hz uniform electromagnetic field promotes human cell proliferation by decreasing intracellular reactive oxygen species levels. PLoS One [Internet]. 16 lipiec 2018 [cytowane 12 luty 2020];13(7). Dostępne na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6047776/

123. Ficek J, Chudek J. Przewlekła choroba nerek jako czynnik zwiększający ryzyko nefrotoksycznego działania leków oraz metody wykrywania polekowych uszkodzeń nerek. Choroby Serca i Naczyń. 2015;12(4):233–9.

124. Hargadon KM. Dysregulation of TGFβ1 Activity in Cancer and Its Influence on the Quality of Anti-Tumor Immunity. J Clin Med [Internet]. 31 sierpień 2016 [cytowane 22 lipiec 2020];5(9). Dostępne na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5039479/

125. Hegele A, Varga Z, von Knobloch R, Heidenreich A, Kropf J, Hofmann R. TGF-β1 in patients with renal cell carcinoma. Urological Research. 1 maj 2002;30(2):126–9.

126. Haque S, Morris JC. Transforming growth factor-β: A therapeutic target for cancer. Hum Vaccin Immunother. 2 czerwiec 2017;13(8):1741–50.

127. Sitaram RT, Mallikarjuna P, Landström M, Ljungberg B. Transforming growth factor-β promotes aggressiveness and invasion of clear cell renal cell carcinoma. Oncotarget. 4 maj 2016;7(24):35917–31.

9. Załączniki

9.1 Streszczenie

Choroby nowotworowe są jedną z głównych przyczyn zachorowalności i umieralności ludzi na świecie. Rak nerki był dziewiątym co do częstości nowotworem u mężczyzn i szesnastym u kobiet na świecie w 2018 roku. Nowotwory te wywodzą się ze struktur tego narządu i rozwijają się w miąższu nerki – raki nerkowokomórkowe (RCC - renal cell carcinoma) – lub w obrębie miedniczki nerkowej. Jasnokomórkowy rak nerki (z ang. clear cell renal cell carcinoma – ccRCC) jest najczęstszym oraz jednym z gorzej rokujących typów raka nerki.

Do najchętniej badanych genów należy *VEGFC*. Jest on ligandem dla naczyniowego śródbłonkowego czynnika wzrostu-3, będący kinazą tyrozynową receptora, wykrywanej głównie w śródbłonku limfatycznym. *VEGFC*, jest silnym mediatorem angiogenezy. Wiąże się z receptorem VEGF na komórkach śródbłonka, co prowadzi do zwiększenia przepuszczalności naczyń, indukując proliferację komórek śródbłonka oraz ich przeżycie, migrację oraz różnicowanie. Dodatkowo promuje on degradację macierzy zewnątrzkomórkowej wokół komórek śródbłonka. Inną charakterystyczną mutacją jest mutacja w genie *ADAM28*. Gen ten należy do rodziny glikoprotein znajdujących się na powierzchni komórek, które wykazują właściwości proteolityczne i adhezyjne.

W raku jasnokomorkówym nerki wykryto nadekspresję genu *ADAM28*. Również mutacja genu *NCAM1* została odkryta w linia komórkowych 786-O i Caki1. Gen *NCAM1* jest odpowiedzialny za kodowanie białka adhezyjnego komórek, które jest członkiem nadrodziny immunoglobulin. Białko to jest zaangażowane w interakcje komórka- komórka, a także jest odpowiedzialne za oddziaływania matrycy komórkowej podczas ich rozwoju i różnicowania.

ccRCC jak każdy nowotwór posiada złożone środowisko w skład którego wchodzą transformowane komórki, nacieki zrębowe i immunologiczne. Niestety przez swoje unikalne środowisko i cechy biologiczne ccRCC słabo reaguje na konwencjonalną chemioterapię oraz radioterapię. Pomimo, że niektórzy badacze twierdzą o niezależności ccRCC od układu immunologicznego warto zaznaczyć, że to właśnie ccRCC był jednym z pierwszych nowotworów złośliwych, który pozytywnie zareagował na immunoterapię IL-2 i IFN-α Wpływ cytokin na RCC skupia na sobie dużą uwagę naukowców. Powstaje co raz więcej publikacji

dotyczących wpływu cytokin na proliferację i progresję komórek tego nowotworu oraz doszukujących się w nich roli potencjalnych markerów diagnostycznych, predykcyjnych i prognostycznych w RCC.

Rozwój nowych technologii oraz przemysłu sprzyja wzrostowi liczby oraz różnorodności źródeł pola elektromagnetycznego (PEM) w naszym środowisku. Głównym źródeł PEM są linie wysokiego napięcia, sprzęty AGD i RTV, telefony komórkowe jak również radiostacje i urządzenia radiolokacyjne. W dzisiejszych czasach rosnącego użycia sprzętów elektronicznych naukowcy są coraz bardziej zainteresowani efektami działania PEM na zdrowie ludzi. Pomimo tego, że przeprowadzono już wiele badań o wpływie PEM, żadne z nich nie wykazało znaczącego wpływu na ssaki, w tym ludzi. Ponadto nie jest do końca jasne, w jaki sposób PEM wpływa na zachowanie komórek. International Agency for Research on Cancer 31 maja 2011 roku zaklasyfikowała PEM jako możliwie kancerogenny czynnik.

Celem niniejszego badania było zbadanie wpływu promieniowania elektromagnetycznego na potencjalne zmiany morfologiczne i czynnościowe badanych komórek, na zmianę ekspresji genów *VEGFC, ADAM28* i *NCAM1* oraz na zmiany w sekrecji cytokin produkowanych przez komórki ccRCC.

Badania zostały przeprowadzone na hodowlach in vitro 4 linii komórkowych: HEK293 (komórki nabłonka nerki ludzkiej zarodkowej), 786-O (komórki pierwotnego raka jasnokomórkowego nerki), 769-P (komórki pierwotnego raka jasnokomórkowego nerki) i Caki-1 (linia wyprowadzona z przerzutu raka nerki do skóry).

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że PEM o niskiej częstotliwości miał nieznaczny wpływ na żywotność komórek. PEM które indukowało zatrzymanie komórek w fazie G1, skutkowało zwiększeniem liczby komórek wcześnie apoptycznych oraz zmniejszeniem liczby żywych komórek w linii 786-O. PEM nie miał wpływu na proliferację oraz żywotność linii HEK293. PEM wykazał również hamujący wpływ na właściwości migracyjne i przerzutowe komórek jasnokomórkowego raka nerki. Ponadto wkrótce po zakończonej ekspozycji ELF-EMF zaobserwowano znaczny wzrost poziomów ROS we wszystkich badnaych liniach komórkowych.

Poddane na ekspozcyję nowotworowe komórki 786-O i 769-P jako jedyne wykazywały zmiany w ekspresji *ADAM28*. Pole elektromagnetyczne powodowało spadek ekspresji tego genu ($p<0,005$ dla 786-O i $p<0,05$ dla 769-P). W tych badaniach największą ekspresję *VEGFC* odnotowano w lini 769-P ($p <0,05$), zaś w pozostałych badanych liniach ekspresja tego genu spadała. Ekspresja *NCAM1* malała we wszystkich badanych liniach po ekspozycji

na ELF-EMF, w HEK293 i 786-O została potwierdzona statystycznie istotna różnica ($p<0,05$ dla HEK293, $p<0,00005$ dla 786-O).
Analiza stężenia cytokiny TGF-β1 po ekspozycji na PEM, wykazała statystycznie niższe stężenie TGF-β1w nadsączach z hodowli komórek w linii HEK293 ($\bar{x} = 519 \pm 95,54$, $\bar{x} = 282,5 \pm 33,66$) i Caki1 ($\bar{x} = 158,1 \pm 19,74$, $\bar{x} = 115,3 \pm 3,067$). W linii 769-P i 786-O również zanotowano spadek stężenia cytokiny, nie potwierdzono jednak statystycznie istotnych różnic. Pozostałe zmiany w sekrecji badanych cytokin nie wykazywały istotnie statystycznie zmian, ponadto wykazano, że sekrecja większości analitów w badanych liniach zarówno w grupie kontrolnej jak i badanej, jest bardzo niska, bądź praktycznie w ogóle nie były wykrywalna.

W ramach zrealizowanej pracy wykazano, że:

- PEM o niskiej częstotliwości ma zróżnicowany wpływ na produkcję białek ADAM28, NCAM1 i VEGFC

- PEM o niskiej częstotliwości wykazuje hamujący wpływ na proliferację komórek nowotworowych pierwotnych, ich zdolności migracyjne oraz inwazyjne a także zdolności przerzutowe

- PEM o niskiej częstotliwości powoduje zwiększenie apoptozy komórek nowotworowych oraz ilości reaktywnych form tlenu

- PEM o niskiej częstotliwości nie ma znaczącego wpływu na środowisko immunologiczne badanych linii raka jasnokomórkowego nerki

- Efekt działania PEM zależy od określonego stanu metabolicznego lub określonego etapu cyklu komórkowego badanych komórek.

9.2 Abstract

The development of new technologies and industry is conducive to the increase in the number and variety of electromagnetic field (EMF) sources in our environment. The main sources of EMF are high-voltage lines, household appliances and audio / video devices, mobile phones as well as radio stations and radar devices. In the growing use of electronic devices, scientists are increasingly interested in the effects of EMF on human health. Despite the fact that many studies on the effects of EMF have already been carried out, none of them has shown a significant effect on mammals, including humans. Moreover, it is not entirely clear how EMF influences cell behavior. The International Agency for Research on Cancer on May 31, 2011 classified PEM as a possible carcinogenic factor.

Neoplastic diseases are one of the leading causes of human morbidity and mortality in the world. Kidney cancer was the ninth most common cancer in men and the sixteenth in women in the world in 2018. These tumors arise from the structures of this organ and develop in the parenchyma of the kidney - renal cell carcinoma (RCC) - or within the renal pelvis. Clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) is the most common and one with the worst prognosis types of kidney cancer.

VEGFC is one of the most studied genes. It is a ligand for vascular endothelial growth factor-3 which is a receptor tyrosine kinase found mainly in lymphatic endothelium. *VEGFC* is a potent mediator of angiogenesis. It binds to the VEGF receptor on endothelial cells, which leads to an increase in vascular permeability, inducing endothelial cell proliferation and their survival, migration and differentiation. Additionally, it promotes the degradation of the extracellular matrix around endothelial cells. Another characteristic mutation is the mutation in the *ADAM28* gene. This gene belongs to a family of cell surface glycoproteins that exhibit both proteolytic and adhesive properties. Overexpression of the *ADAM28* gene was detected in kidney clear cell carcinoma.

A mutation of the *NCAM1* gene was also found in the 786-O and Caki1 cell lines. The *NCAM1* gene is responsible for encoding the cell adhesion protein, which is a member of the immunoglobulin superfamily. This protein is involved in cell-cell interactions and is also responsible for the interactions of the cell matrix during their development and differentiation.

ccRCC, like any tumor, has a complex environment consisting of transformed cells, stromal and immune infiltrates. Unfortunately, due to its unique environment and biological features, ccRCC is poorly responsive to conventional chemotherapy and radiotherapy. Although some

researchers claim that ccRCC is independent from the immune system, it is worth noting that it was ccRCC that was one of the first malignant tumors to respond positively to IL-2 and IFN-α immunotherapy. The influence of cytokines on RCC attracts a lot of attention from scientists. There are many new publications on the influence of cytokines on the proliferation and progression of this tumor cells and on the role of potential diagnostic, predictive and prognostic markers in RCC.

The aim of this study was to investigate the effect of the electromagnetic field on morphological and functional changes in the studied cells, on changes in the expression of *VEGFC, ADAM28* and *NCAM1* genes, and on changes in the secretion of cytokines produced by ccRCC cells.

The research was carried out on *in vitro* cultures of 4 cell lines: HEK293 (human embryonic kidney epithelial cells), 786-O (primary renal clear cell carcinoma cells), 769-P (primary renal clear cell carcinoma cells) and Caki-1 (line derived from renal cancer metastasis to the skin).

The results of the research showed that the EMF of low frequency had a slight effect on the viability of cells. EMF, which induced cell arrest in G1 phase, resulted in an increase in the number of early apoptotic cells and a decrease in the number of viable cells in the 786-O line. EMF had no effect on the proliferation and viability of HEK293 cells. EMF also showed an inhibitory effect on the migration and metastatic properties of clear cell kidney cancer cells. Moreover, shortly after the end of ELF-EMF exposure, significant increases of ROS levels were observed in all tested cell lines.

Primary cancer cells exposed were the only ones to show changes in *ADAM28* expression. The electromagnetic field decreased the expression of this gene ($p < 0{,}005$ for 786-O and $p < 0{,}05$ for 769-P). In this research, the highest expression of *VEGFC* gene was recorded in the 769-P line ($p < 0{,}05$), while in the other tested lines the expression of this gene was decreased. The expression of *NCAM1* decreased in all tested lines after exposure to ELF-EMF, in HEK293 and 786-O a statistically significant difference was confirmed ($p < 0{,}05$ for HEK293, $p < 0{,}00005$ for 786-O).

Analysis of TGF-β1 cytokine concentration after exposure to EMF showed a statistically lower concentration of TGF-β1 in cell culture supernatants in the HEK293 line ($\bar{x} = 519 \pm 95{,}54$, $\bar{x} = 282{,}5 \pm 33{,}66$) and Caki1 ($\bar{x} = 158{,}1 \pm 19{,}74$, $\bar{x} = 115{,}3 \pm 3{,}067$). In lines 769-P and 786-O there was also a decrease in cytokine concentration, however, no statistically significant differences were confirmed. The remaining changes in the secretion of the tested cytokines did not show any statistically significant changes, moreover, it was shown that the

secretion of most analytes in the tested lines, both in the control group and the test group, was very low, or practically not detectable at all.

As part of the work, it was shown that:

• Low-frequency EMF has various effects on the production of ADAM28, NCAM1 and VEGFC proteins

• Low-frequency EMF shows an inhibitory effect on the proliferation of primary cancer cells, their migratory and invasive abilities as well as metastatic abilities

• Low frequency EMF increases the apoptosis of cancer cells and the amount of reactive oxygen species

• Low-frequency EMF has no significant effect on the immune environment of the RCC lines tested

• The effect of EMF depends on a specific metabolic state or at a specific stage in the cell cycle of the cells under study