

mgr Aleksandra Cios

Streszczenie

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

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 miększu 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 jasnokomórkowym nerki wykryto nadekspresję genu *ADAM28*. Również mutacja genu *NCAMI* została odkryta w linii komórkowych 786-O i Caki1. Gen *NCAMI* 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 wchodzi 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 91

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 źródłem 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 kancerogeny 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 wczesnie 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 badanych liniach komórkowych.

Poddane na ekspozycję 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 linii 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- β 1 po ekspozycji na PEM, wykazała statystycznie niższe stężenie TGF- β 1 w 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