



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM

Autoreferat

przedstawiający opis osiągnięć naukowych w języku polskim

dr Małgorzata Tyszka-Czochara

Zakład Bromatologii

Wydział Farmaceutyczny UJ CM

Kraków 2019

Spis treści

I.	Informacje osobowe	3
II.	Ogólna charakterystyka działalności naukowej	4
III.	Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.)	6
1.	Tytuł osiągnięcia naukowego	6
2.	Omówienie celu naukowego ww. prac	8
2.1	Wprowadzenie w tematykę badawczą	8
2.2	Model badawczy	13
3.	Szczegółowe omówienie osiągniętych wyników oraz ich znaczenia z uwzględnieniem aspektów nowości naukowej	16
4.	Podsumowanie	43
IV.	Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych	46
1.	Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia naukowego	46
2.	Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia naukowego	47
V.	Piśmiennictwo	50

I. Informacje osobowe

1. **Imię i nazwisko:** Małgorzata Tyszką – Czochara

2. Posiadane dyplomy

- dyplom doktora nauk farmaceutycznych z wyróżnieniem, 2004, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Wydział Farmaceutyczny, tytuł pracy: *„Wpływ wybranych polifenoli na aktywność kinazy kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej”*.
- dyplom magistra ochrony środowiska, 1998, Uniwersytet Jagielloński, Wydział Chemii Kraków, tytuł pracy: *„Biologiczne oczyszczanie ścieków metodą osadu czynnego. Wykorzystanie metod biotechnologii w optymalizacji procesów biodegradacji”*.
- Dyplom licencjata ochrony środowiska, 1996, Uniwersytet Jagielloński, Wydział Chemii, Kraków, tytuł pracy: *„Oczyszczanie ścieków metodą osadu czynnego. Rola biocenozy osadu w procesie oczyszczania ścieków na przykładzie biooczyszczalni w Krakowie-Płaszowie”*.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

- 2017-obecnie Adiunkt, Zakład Bromatologii, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński, Kraków
- 2013-2017 Adiunkt, Katedra Farmakobiologii, Zakład Radioligandów, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków
- 2009-2013 Adiunkt - etat naukowy na czas realizacji projektu badawczego, Katedra Chemii Nieorganicznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków
- 2004-2009 Adiunkt, Zakład Analityki Biochemicznej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków
- 2004-Asystent, Zakład Analityki Biochemicznej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków
- 1999-2003 Stypendysta Studium Doktoranckiego, Zakład Analityki Biochemicznej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

II. Ogólna charakterystyka działalności naukowej

Moja działalność naukowa dotyczy szeroko pojętych badań nad wpływem związków biologicznie aktywnych na molekularne procesy zachodzące w komórkach prawidłowych i nowotworowych. Moje prace naukowe są badaniami interdyscyplinarnymi, wykorzystującymi wiedzę oraz metody badawcze z zakresu biologii molekularnej, biochemii, mikrobiologii, immunologii, bromatologii, toksykologii, farmakologii i farmakognozji, a podejmowane przeze mnie zagadnienia dotyczą zarówno procesów zachodzących w komórkach mikroorganizmów, jak i w komórkach wyższych eukariontów. Celem moich badań jest poznanie molekularnych mechanizmów oddziaływania w komórkach, syntetycznych i naturalnych związków chemicznych oraz możliwość wykorzystania tych procesów w projektowaniu nowoczesnych podejść terapeutycznych.

Zainteresowanie naukami matematyczno-przyrodniczymi rozwijałam już w szkole średniej w ramach fakultetu matematyczno-fizycznego. W trakcie nauki szkolnej zdobyłam I miejsce w Olimpiadzie Wiedzy Ekologicznej na szczeblu wojewódzkim, a swoją pasję dotyczącą zrozumienia mechanizmów regulujących procesy przyrodnicze rozwijałam dalej podczas studiów na Wydziale Chemii UJ, kierunku Ochrona Środowiska. W czasie studiów licencjackich i magisterskich uczestniczyłam w licznych praktykach, szkoleniach i stażach, dzięki którym zdobyłam praktyczną wiedzę i przygotowanie do pracy naukowej. Tematyka mojej pracy licencjackiej dotyczyła badań nad rolą i funkcją mikroorganizmów osadu czynnego w procesach biologicznego oczyszczania ścieków. Zainteresowanie biochemią mikroorganizmów oraz wykorzystaniem w biotechnologii, modyfikowanych szczepów drobnoustrojów, kontynuowałam w trakcie realizacji pracy magisterskiej. W roku 1999 zostałam stypendystką Studium Doktoranckiego w Collegium Medicum UJ, pracę doktorską realizowałam pod kierunkiem prof. Jerzego Jaśkiewicza w Zakładzie Analityki Biochemicznej Wydziału Farmaceutycznego UJ. Główny temat badawczy, którym zajęłam się w tym czasie, dotyczył wpływu związków bioaktywnych pochodzenia roślinnego na metabolizm komórek eukariotycznych, w szczególności na regulację torów przemian węglowodanów i lipidów. Ponadto uzyskałam szeroką wiedzę i umiejętności praktyczne w zakresie metod badawczych i technik stosowanych w biochemii klinicznej i biologii molekularnej. Wyniki moich badań stały się podstawą do współpracy z I Uniwersytetem w Bordeaux, dotyczącej badania właściwości związków bioaktywnych izolowanych z czerwonego wina i prezentowane były na licznych międzynarodowych konferencjach. Pracę doktorską obroniłam z wyróżnieniem w roku 2004 r. Zostałam również zatrudniona w Zakładzie Analityki Biochemicznej, początkowo na etacie asystenta, a potem adiunkta. Swoje zainteresowania naukowe i warsztat badawczy poszerzyłam dzięki udziałowi w specjalistycznych stażach i szkoleniach oraz dzięki wyjazdom zagranicznym, w szczególności współpracy z Wydziałem Farmaceutycznym Uniwersytetu w Bonn, gdzie w 2006 roku przebywałam jako stypendystka programu wymiany akademickiej Leonardo da Vinci, a w 2007 roku - w ramach stypendium dla kadry akademickiej DAAD. W czasie zatrudnienia na Wydziale Farmaceutycznym UJCM byłam zaangażowana we współpracę z innymi jednostkami tego Wydziału, Wydziału Lekarskiego UJ CM, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ, Wydziału Chemii UJ oraz partnerami zagranicznymi (Izrael, Portugalia, Niemcy, Szwajcaria, Wielka Brytania), jak również z przemysłem. Podjęta

współpraca naukowa znalazła wyraz w realizacji wspólnych projektów naukowych oraz publikacji i doniesień zjazdowych.

Obecnie jestem zatrudniona w Zakładzie Bromatologii WF UJ CM, a prowadzone przeze mnie badania związane są z analizą oddziaływania bioaktywnych składników diety i pierwiastków na procesy komórkowe. W szczególności, moje zainteresowania skupiają się wokół poznania wpływu związków pozyskanych z roślin krzyżowych oraz pseudozbóż na białka regulujące przebieg procesów metabolicznych i ścieżek sygnałowych w komórkach. W oparciu o modele eksperymentalne *in vitro* poszukuję mechanizmów oddziaływania tych związków na komórki prawidłowe i nowotworowe, na poziomie molekularnym. Ponadto zajmuję się badaniem wpływu żywności fortyfikowanej pierwiastkami na procesy proliferacji, regeneracji oraz mechanizmy apoptozy w komórkach prawidłowych i nowotworowych. W pracach eksperymentalnych stosuję m.in. techniki analizy ekspresji genów, immunobloting i cytometrię przepływową. Uzyskałam finansowanie ze środków Komitetu Badań Naukowych na realizację własnego projektu zatytułowanego „*Badania molekularnego mechanizmu działania wybranych polifenoli na aktywność kinazy kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (PDH) w zależności dawka-efekt*”. Poza badaniami nutrigenomicznymi, w swojej pracy zajmuję się analizą aktywności biologicznej leków i kandydatów na leki w modelu *in vitro*. W tym zakresie uczestniczyłam w realizacji projektów: „*Opracowanie innowacyjnego leku stosowanego w terapii schorzeń ośrodkowego układu nerwowego (OUN) – schizofrenii, depresji, lęku*” współfinansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach programu Inicjatywa Technologiczna I oraz „*Kompleksy wanadu – innowacyjne metalofarmaceutyki w leczeniu cukrzycy*” finansowanego przez Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego (projekt POIG). Jestem współtwórcą patentu dotyczącego sposobu wytwarzania nowego związku koordynacyjnego wanadu(IV) o specyficznej aktywności przeciwnowotworowej. Współpracuję również w zakresie molekularnych badań nad funkcją i regulacją aktywności receptorów, zarówno w komórkach zróżnicowanych, jak i progenitorowych oraz macierzystych. Biorę udział w realizacji projektów dotyczących charakterystyki molekularnej oraz metabolizmu, ludzkich, indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych, w celu wykorzystania potencjału biologicznego tych komórek do regeneracji tkanek. Istotną część mojej pracy zawodowej stanowi praca ze studentami i pomoc w rozwijaniu naukowych pasji w ramach koła naukowego Biologii Molekularnej, a także opieka nad studentami zagranicznymi oraz doktorantami.

Aktualnie mój cały dorobek naukowy obejmuje **101** pozycji. Składa się na niego **41** publikacji naukowych, w tym **23** pełnotekstowych publikacji oryginalnych angielskojęzycznych, w recenzowanych czasopismach posiadających impact factor (oraz 2 prace pogładowe), **18** recenzowanych prac w czasopismach bez IF oraz polskie zgłoszenie patentowe. Jestem autorem **60** doniesień i komunikatów zjazdowych, z czego **34** międzynarodowych, **26** krajowych. Sumaryczny współczynnik oddziaływania IF publikacji recenzowanych wynosi **58,73**, co odpowiada **680** punktom w klasyfikacji MNiSW. Całkowita liczba cytowań wynosi **200**, a indeks Hirscha jest równy **9**.

III. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Przedmiotem przedstawionego do oceny osiągnięcia naukowego, będącego podstawą ubiegania się o stopień doktora habilitowanego, jest monotematyczny cykl 5 publikacji (**H-1 – H-5**) zatytułowany: „**Wpływ metforminy i kwasu kawowego na reprogramowanie metaboliczne ludzkich komórek raka szyjki macicy (RSM)**”. Obejmuje on 4 oryginalne (**H1-H4**), pełnotekstowe prace oraz 1 artykuł poglądowy (**H5**). Prace opublikowano w anglojęzycznych, recenzowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym. Zgodnie z analizą bibliometryczną, łączny współczynnik IF cyklu publikacji wynosi **18,025**, a odpowiadająca mu punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego **160** pkt. We wszystkich pracach jestem pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym.

Wykaz prac stanowiących podstawę habilitacji

H1. Tyszka-Czochara M., Bukowska-Strakova K., Kocemba-Pilarczyk K.A., Majka M. Caffeic Acid Targets AMPK Signaling and Regulates Tricarboxylic Acid Cycle Anaplerosis while Metformin Downregulates HIF-1 α -Induced Glycolytic Enzymes in Human Cervical Squamous Cell Carcinoma Lines. *Nutrients*, 2018, 10, 1-21

IF = 4,196 MNiSW=35

H2. Tyszka-Czochara M., Bukowska-Strakova K., Majka M. Metformin and caffeic acid regulate metabolic reprogramming in human cervical carcinoma SiHa/HTB-35 cells and augment anticancer activity of Cisplatin via cell cycle regulation. *Food and Chemical Toxicology*, 2017, 106(Pt A), 260-272.

IF = 3,977 MNiSW=40

H3. Tyszka-Czochara M., Konieczny P., Majka M. Caffeic acid expands anti-tumor effect of Metformin in human metastatic cervical carcinoma HTB-34 cells: implications of AMPK activation and impairment of fatty acids de novo biosynthesis. *International Journal of Molecular Science*, 2017, 18, 1-16.

IF = 3,687 MNiSW=30

H4. Tyszka-Czochara M., Lasota M., Majka M. Caffeic acid and Metformin inhibit invasive phenotype induced by TGF- β 1 in C-4I and HTB-35/SiHa human cervical squamous carcinoma cells by acting on different molecular targets. *International Journal of Molecular Science*, 2018, 19, 1-19.

IF = 3,687 MNiSW=30

H5. Tyszka-Czochara M., Konieczny P, Majka M. Recent advances in the role of AMP-activated protein kinase in metabolic reprogramming of metastatic cancer cells: targeting cellular bioenergetics and biosynthetic pathways for anti-tumor treatment. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2018, 69 (3), 337-349.

IF = 2,478 MNiSW=25

2. Omówienie celu naukowego ww. prac

Jedną z głównych cech odróżniających komórkę nowotworową od prawidłowej jest zmiana regulacji procesów metabolicznych. Metabolizm komórek nowotworowych jest bardziej autonomiczny i pozostaje pod mniejszym wpływem czynników zewnętrznych, niż w przypadku komórek prawidłowych, a związki wysokoenergetyczne w nowotworach syntetyzowane są głównie w procesie glikolizy. W wyniku transformacji nowotworowej w komórce dochodzi do szeregu charakterystycznych zmian, określanych mianem **reprogramowania metabolicznego** (ang. „*metabolic reprogramming*”). Wiadomo, że reprogramowanie metaboliczne może nadawać komórkom nowotworowym przewagę adaptacyjną nad komórkami prawidłowymi, szczególnie w trudnych warunkach środowiskowych, umożliwiając ich przetrwanie i, co szczególnie ważne, rozprzestrzenianie się w organizmie. Obecnie trwają intensywne poszukiwania **selektywnych „molekularnych celów” dla terapii przeciwnowotworowych** z uwzględnieniem **mechanizmów regulujących procesy metaboliczne** w komórkach nowotworowych, a w szczególności procesy **mitochondrialne**. Dlatego też **celem prac** przedstawionych w punkcie III.1 autoreferatu, było **zbadanie czy metformina i kwas kawowy mogą wywierać regulacyjny wpływ na reprogramowanie metaboliczne komórek raka szyjki macicy (RSM)**. Przeprowadzone badania, w efekcie których powstał cykl składający się na moje osiągnięcie habilitacyjne, pozwoliły na zbadanie, czy **poprzez regulację przemian energetycznych, biosyntezy oraz związanych z nimi procesów komórkowych; metformina i kwas kawowy mogą hamować proliferację komórek raka szyjki macicy i kierować je na drogę śmierci apoptotycznej**. Celem eksperymentów było również ustalenie, czy **badane związki chemiczne mogą wspierać cytotoksyczne działanie cisplatyny na komórki RSM** oraz wskazanie **mechanizmów regulujących te procesy**. Dodatkowo, badania miały na celu ustalenie czy działanie metforminy i kwasu kawowego jest **specyficzne (selektywne) względem komórek nowotworowych**. Uzyskane wyniki mogą pomóc w poznaniu procesów molekularnych i wyznaczeniu **molekularnych celów** dla strategii w leczeniu RSM, charakteryzujących się wysoką **efektywnością i selektywnością działania**. Badania nad regulacją molekularnych mechanizmów metabolicznych realizowano w modelu *in vitro* z zastosowaniem linii ludzkich komórek raka szyjki macicy o różnym fenotypie, z uwzględnieniem różnych stopni klinicznego zaawansowania nowotworu.

Dla realizacji głównego celu badań sformułowano **cele szczegółowe**, wśród których wyróżniono:

- ocenę wpływu metforminy oraz kwasu kawowego na metabolizm mitochondrialny, w tym na regulację **cyklu kwasów trikarboksylowych** (ang. *tricarboxylic acids cycle*,

TCA cycle) i przemian **substratów energetycznych** w komórkach nowotworowych, także na **bioenergetykę** komórek RSM, ze szczególnym uwzględnieniem efektów regulowanych działaniem **kinazy aktywowanej przez 5'-monofosforan adenozyiny (AMPK)**,

- określenie potencjału metforminy oraz kwasu kawowego do generowania **stresu oksydacyjnego w mitochondriach** i wywoływania **śmierci apoptotycznej** komórek - zależnej od metabolizmu,
- poznanie wpływu metforminy oraz kwasu kawowego na regulację **syntezy *de novo* kwasów tłuszczowych** w komórkach RSM,
- zbadanie wpływu metforminy oraz kwasu kawowego na białka regulatorowe **glikolizy** oraz określenie wpływu badanych związków na poziom ekspresji wybranych **onkogenów**, kontrolujących aktywność białek i enzymów regulujących **fenotyp metaboliczny** komórek RSM, w warunkach zmiennej dostępności tlenu w mikrośrodku (**normoksji i hipoksji**),
- zbadanie wpływu metforminy oraz kwasu kawowego na zmianę **fenotypu** komórek i ich **zdolność do migracji** w procesie indukowanego **przejścia epithelialno-mezenchymalnego** (ang. *Epithelial-to-Mesenchymal Transition, EMT*) w komórkach RSM,
- określenie potencjału metforminy oraz kwasu kawowego do **wzmacniania działania przeciwnowotworowego cisplatyny**, poprzez regulację **cyklu komórkowego** w komórkach RSM,
- zbadanie, czy **łącznie zastosowanie metforminy, kwasu kawowego oraz cisplatyny**; wywoła **silniejszy efekt antyproliferacyjny** na komórki RSM niż zastosowanie tych związków **osobno** lub jako **ko-terapię**,
- zbadanie, na ile aktywność **metforminy i kwasu kawowego** jest **specyficzna** względem komórek nowotworowych w **kokulturze** z ludzkimi komórkami prawidłowymi, w obecności fibroblastów,
- charakterystyka efektu antyproliferacyjnego **metforminy, kwasu kawowego i cisplatyny** względem komórek nowotworowych w **kokulturze z ludzkimi komórkami prawidłowymi (fibroblastami)**.

2.1 Wprowadzenie w tematykę badawczą

Rak szyjki macicy (RSM) jest jednym z najczęściej występujących **nowotworów** u kobiet. Szczególnie wysoką zapadalność stwierdzono w populacjach krajów rozwijających się [1,2]. Obecnie wiadomo, że najistotniejszym **czynnikiem sprzyjającym rozwojowi neoplazji komórek nabłonka szyjki macicy**, jest **infekcja szczepami** z grupy wysokiego ryzyka, **wirusami brodawczaka ludzkiego** (ang. *Human Papilloma Virus, HPV*) [3,4]. Ekspresja onkogenów wirusowych w komórkach cerwikalnych, prowadzi do zaburzenia przebiegu cyklu komórkowego i rozregulowania ścieżek sygnałowych, co może skutkować progresją procesu kancerogenezy i nasiloną proliferacją komórek neoplastycznych, do której przyczynia się dodatkowo osłabienie mechanizmów kontrolujących apoptozę [4]. Powszechne stosowanie cytologicznych badań przesiewowych oraz wprowadzenie szczepień przeciwko HPV, w większości krajów rozwiniętych umożliwia rozpoznanie choroby we wczesnym jej

stadium i w konsekwencji powoduje zmniejszenie częstości występowania inwazyjnego RSM. Z drugiej strony, obecnie dostępne szczepionki chronią przed zachorowaniem jedynie w 70% przypadków [5]. W konsekwencji, **śmiertelność** z powodu zaawansowanego raka szyjki macicy na świecie jest nadal **wysoka** [6], a rokowanie przeżycia jednego roku u pacjentek w zaawansowanym stadium raka nie przekracza 20 procent [7]. Wiadomo, że **przeżywalność** ściśle zależy od stopnia zaawansowania nowotworu i zdolności komórek guza do inwazji i metastazy (tworzenia przerzutów). Pomimo zastosowania powyższych, intensywnych metod prewencji (badania przesiewowe, szczepienia), **śmiertelność** z powodu RSM w Polsce nadal należy do **najwyższych w Europie** [8].

Obecnie, standardowa **terapia RSM** obejmuje chemioterapię, najczęściej z użyciem cytostatyku - **cisplatyny** (cis-diaminodichloroplatyna(II)). Wprowadzenie określonej procedury leczenia zależy od stopnia zaawansowania nowotworu; u pacjentek z późno zdiagnozowanym nowotworem lub ze stwierdzoną wznową, protokoły leczenia przewidują łączne stosowanie cisplatyny z 5-fluorouracylem (5-FU). Cisplatyna jest powszechnie stosowanym u ludzi chemioterapeutykiem, lek ten znalazł zastosowanie kliniczne również w terapiach innych nowotworów, w tym raka pęcherza moczowego, płuc, jajników i jąder, a także nowotworów głowy i szyi [9]. Po przedostaniu się do komórki, cisplatyna wywołuje uszkodzenie struktury DNA, zahamowanie syntezy materiału genetycznego oraz podziałów mitotycznych. **Molekularny mechanizm cytotoksycznego oddziaływania** cisplatyny w komórce obejmuje przede wszystkim wywołanie **stresu oksydacyjnego**, związanego z **nadprodukcją wolnych rodników tlenowych - reaktywnych form tlenu (RFT)** (ang. *Reactive Oxygen Species*, **ROS**), zatrzymaniem **cyklu komórkowego** i podziałów mitotycznych, zahamowaniem ekspresji **protoonkogenów** i białek regulatorowych **apoptozy**, co ostatecznie prowadzi do **śmierci komórki** [10]. Jak wykazano, stres oksydacyjny wywołany w komórce działaniem cisplatyny wpływa w szczególności na **procesy mitochondrialne**, czego wynikiem jest utrata funkcji biologicznych i śmierć komórkowa, wywołana mechanizmami niezależnymi od uszkodzeń w strukturze DNA. Niestety, leczenie z użyciem cisplatyny charakteryzuje się wysoką toksycznością w stosunku do komórek prawidłowych; głównymi **efektami niepożądanymi** w organizmie człowieka może być ciężka neurotoksyczność oraz hepatotoksyczność, nefrotoksyczność, uszkodzenia komórek mięśnia sercowego i komórek krwiotwórczych [11]. **Oporność na leczenie cytostatykami** oraz **nawrót choroby**, to główne problemy terapii przeciwnowotworowych w leczeniu RSM; ocenia się, że mogą one występować nawet u połowy chorych [7]. W celu przeciwdziałania tym komplikacjom często wykorzystuje się łączenie kilku strategii przeciwnowotworowych, które działają skuteczniej, jeśli są zaaplikowane pacjentowi jednocześnie lub w ustalonej sekwencji. Cisplatyna stosowana jest w kombinacji z innymi lekami, takimi jak etopozyd, winorelbina, topotektan, paklitaksel, gemcytabina i irinotekan. Terapie chorych z zaawansowanymi stopniami klinicznymi RSM, obejmują także skojarzenie leczenia cisplatyną z interwencjami chirurgicznymi oraz/lub radioterapią, w ramach terapii adjuwantowej. Uwzględniając dynamikę wzrostu komórek nowotworowych, stosuje się chemioterapię neoadjuwantową, polegającą na leczeniu cytostatykiem, które może poprzedzać radioterapię i/ lub zabiegi chirurgiczne. Można też łączyć chemioterapię z radioterapią. Wykazano, że w przypadku nowotworów szyjki macicy, na wczesnych etapach

choroby, zastosowanie standardowych rozwiązań terapeutycznych może znacząco przedłużyć życie pacjentek a nawet całkowicie wyeliminować nawrót choroby. Natomiast rokowania dla chorych w zaawansowanym stadium RSM są dużo gorsze. W szczególności dla tej grupy, niezbędne jest poszukiwanie nowych, bardziej skutecznych rozwiązań [3,11,9,12]. Wyniki najnowszych badań nad zastosowaniem strategii terapeutycznych w leczeniu RSM u ludzi, zostały obszernie przedstawione przez Kumara i wsp. [11]. **Oporność** na leczenie cytostatykiem, znacząco pogarsza wrażliwość komórek nowotworowych na inny zastosowany czynnik terapeutyczny. Co gorsza, proces oporności na lek często rozwija się w oparciu, nie o jeden mechanizm, lecz angażuje wiele ścieżek. W obrębie heterogennego guza, często występują obok siebie komórki o różnej charakterystyce, cechach genetycznych i, co się z tym wiąże, różnej wrażliwości na leczenie. Komórki guza mogą **zmienić fenotyp na migracyjny** i przerzutować do innych tkanek w organizmie. Wtedy problem oporności na stosowane leczenie nabiera szczególnej wagi [10].

Uwzględniając przyczyny niepowodzeń terapii stosowanych obecnie w walce z nowotworami oraz konieczność poprawy efektywności leczenia, zachodzi potrzeba nowego, szerszego spojrzenia na problem i poszukiwania innowacyjnych strategii, opartych **o mechanizmy specyficzne** dla komórek nowotworowych. Obecnie podejmowane są próby **kombinowanych terapii** niszczących nowotwory, w których stosowane są związki chemiczne działające **synergistycznie**. Inne podejście, zakłada **celowanie w dwa lub więcej niezależnych mechanizmów**, które uwrażliwiają komórki nowotworowe na działanie leków przeciwnowotworowych, czynią zwalczanie choroby nowotworowej bardziej skutecznym. Biorąc pod uwagę fakt, że jedną z podstawowych cech komórek nowotworowych jest łatwość rozwijania **kompensacyjnych ścieżek sygnałowych**, drugie podejście wydaje się być szczególnie uzasadnionym [13,14]. Aby przeciwdziałać rozwojowi oporności na cytostatyki oraz ich wysokiej toksyczności w organizmie człowieka, zwrócono się w stronę takich terapii kombinowanych i adjuwantowych, w których oprócz cytostatyków stosuje się także leki oraz substancje pochodzenia naturalnego, wykazujące **działanie regulacyjne na określone procesy komórkowe** [15]. Dlatego też, artykuły opublikowane ostatnio w wiodących czasopismach, istotną wagę przykładają do wskazywania potencjalnych, **specyficznych, molekularnych celów** dla precyzyjnych, kombinowanych terapii przeciwnowotworowych. Wiele badań klinicznych już potwierdziło **skuteczność** takich rozwiązań. W tym kontekście, szczególnie istotne jest poznanie molekularnych mechanizmów regulujących reprogramowanie komórek RSM, w tym **wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych, mitochondrialnych torów metabolicznych i procesów bioenergetycznych**, zachodzących w komórce nowotworowej [16,17]. Prezentowane w niniejszym autoreferacie wyniki badań włączają się w nurt nowoczesnych prac **nad poszukiwaniem „punktów uchwytu”** (ang. „*targets*”) **dla efektywnych farmakologicznych terapii przeciwnowotworowych**, uwzględniających regulację procesów metabolicznych o krytycznym znaczeniu dla funkcjonowania komórki i **specyficznych dla komórek nowotworowych** [18,19].

Metformina (1,1-dimetylobiguanid) jest pochodną biguanidu, lekiem generycznym używanym powszechnie w leczeniu cukrzycy II typu u ludzi. Wyniki ostatnio przeprowadzonych badań klinicznych dotyczących przeciwstarzeniowego oddziaływania metforminy u ludzi, były przedmiotem wielu dyskusji [20]. W szeregu badań wykazano, że

ten wysoko-azotowy, małowcząsteczkowy związek chemiczny (ang. „*small molecule*”) wykazuje wielokierunkowy wpływ na organizm człowieka [21]. Metformina wzbudziła ogromne zainteresowanie wśród badaczy, kiedy wykazano, że w grupie diabetyków leczonych biguanidem; **zapadalność na nowotwory** jest niższa niż wśród pacjentów przyjmującej inne leki. Przeciwnowotworowe działanie metforminy u ludzi, zasugerowane na podstawie wyników obserwacji epidemiologicznych, potwierdziły również badania kliniczne [22,23,24]. Obecnie trwają intensywne prace nad poznaniem mechanizmów wpływu tego leku na komórki nowotworowe; wiele efektów oddziaływania metforminy czeka na wyjaśnienie [25]. Wykazano, że metformina hamuje proliferację wielu linii neoplastycznych, w tym raka piersi, prostaty, jelita grubego i nowotworów górnego odcinka przewodu pokarmowego [26]. Ponadto, lek ten wykazuje *in vitro* efekt antyproliferacyjny na endometrialne komórki nowotworowe, poprzez regulację ich cyklu i jednoczesną aktywację procesów autofagii i apoptozy [27]. Podejmowano również próby zastosowania metforminy do wspierania działania leków przeciwnowotworowych. Wykazano, że zastosowanie biguanidu jednocześnie z tamoksyfenem obniża efektywną dawkę cytostatyku, hamującego wzrost komórek nowotworu piersi [28]. Do tej pory opisano kilka molekularnych mechanizmów, które mogą warunkować przeciwnowotworową aktywność metforminy. Dowiedziono, że lek hamuje pierwszy z czterech kompleksów łańcucha transportu elektronów w mitochondriach, co skutkuje obniżeniem tempa syntezy adenozy-5'-trifosforanu (ATP) i w konsekwencji powoduje zmiany w przebiegu wielu torów wewnątrzkomórkowej biosyntezy [29]. Tego rodzaju cele biologiczne oddziaływania metforminy zostały szeroko przedstawione przez Ikhlas'a i Ahmad'a [25] oraz przez Viollet'a i wsp. [21]. Obecnie, większość wyników badań wskazuje, że mechanizmem o kluczowym znaczeniu dla przeciwnowotworowej aktywności metforminy w komórce jest regulacja funkcji **kinazy aktywowanej przez 5'AMP** (ang. **5'AMP-activated protein kinase, AMPK**). AMPK jest białkiem o kluczowym znaczeniu dla utrzymania **homeostazy przemian energetycznych** w komórkach organizmu człowieka i adaptacji do zmieniających się warunków środowiskowych. Wysokie stężenie 5'AMP w komórce aktywuje AMPK, a krótkoterminowa regulacja aktywności białka AMPK następuje na drodze fosforylacji podjednostki α [30]. Stwierdzono nasiloną aktywność AMPK w warunkach stresu związanego z niedostatkami substratów energetycznych, chociaż czynnikami indukującymi może być także niedotlenienie (hypoksja) oraz dysfunkcja mitochondriów [31]. W wielu badaniach wykazano, że ścieżki sygnałowe regulowane przez AMPK mogą odgrywać istotną rolę w hamowaniu procesu nowotworzenia i progresji nowotworu [32]. Stwierdzono, że w komórkach raka, aktywacja AMPK skutkuje zatrzymaniem cyklu komórkowego, stabilizacją białek regulatorowych cyklu p21^{WAF1} i p27^{CIP1} oraz białka p53. U człowieka to ostatnie białko jest produktem genu supresorowego TP53 [26]. Dodatkowo, AMPK hamuje ścieżki syntezy o kluczowym znaczeniu dla wzrostu komórek nowotworowych, w tym syntezy białek, poprzez regulację aktywności **kompleksu 1 kinazy mTOR, (ang. mechanistic target of rapamycin complex-1, mTORC1)**. Precyzyjna, wzajemna regulacja pomiędzy funkcją **AMPK, mTORC1, kinazy białkowej B (ang. Protein kinase B, AKT)** i **czynnikiem transkrypcyjnym FOXO (ang. FOX (Forkhead box) protein, FOXO)**, warunkuje utrzymanie homeostazy w komórce w warunkach stresu metabolicznego. Co więcej, AMPK ogrywa główną rolę w regulacji sieci sygnałowej i warunkuje możliwości przetrwania i proliferacji komórki. Jednoczesne oddziaływanie na całą sieć aktywności

AMPK/mTOR/AKT, zamiast na pojedyncze ścieżki, jest bardziej skuteczne w pokonywaniu oporności na stres oksydacyjny w komórkach nowotworowych. Tego rodzaju podejście terapeutyczne jest obecnie testowane w próbach klinicznych [17,33,34,35]. W artykule **H5** podjęto szerszą tematykę roli AMPK i innych białek regulatorowych w nowotworach oraz możliwości wykorzystania wzajemnych zależności między funkcjami białek w przebiegu terapii przeciwnowotworowych (**H5, Fig 1**).

Wiele związków chemicznych pochodzenia roślinnego aktywnie modyfikuje działanie AMPK w komórkach nowotworowych, zarówno poprzez mechanizmy krótko-, jak i długoterminowe [36,37,38], a regulacja funkcji AMPK jest jednym z istotnych mechanizmów warunkujących chemioprewencyjne i przeciwnowotworowe właściwości wielu związków chemicznych pochodzenia roślinnego [31,39]. Ostatnie badania wykazały, że **kwas kawowy** (kwas 3,4-dihydroksycynamonowy) jest aktywatorem AMPK i że związek ten może oddziaływać w komórce nowotworowej poprzez ścieżki sygnałowe kontrolowane przez AMPK [40,41]. Kwas kawowy jest pochodną kwasu 4-hydroksycynamonowego, podobnie jak kwas ferulowy (kwas 3-metoksy-4-hydroksy-cynamonowy). Znaczącym źródłem kwasu kawowego w produktach roślinnych jest kwas chlorogenowy, którego cząsteczka jest estrem kwasu kawowego i kwasu (-)-chinowego [42]. Kwas kawowy może **hamować wzrost komórek nowotworowych**, co ujawniły eksperymenty w hodowlach komórek raka piersi [43], ludzkich transformowanych keratynocytów [44], złośliwych nowotworów wątroby pochodzenia nabłonkowego [45] oraz komórek gruczolakoraka jelita grubego [46,47]. Wykazano supresyjne oddziaływanie pochodnych kwasu kawowego na ludzkie komórki nowotworowe jelita grubego; w badaniach *in vitro* oraz *in vivo*. Mechanizm oddziaływania obejmował regulację ścieżek zależnych od AMPK, kinazy 3-fosfatydilinozytolu (ang. *phosphatidylinositide 3-kinase*, PI3-K) i kinazy AKT [40,48].

Wyniki przeprowadzonych ostatnio badań dowodzą, że nie tylko metformina [49,50,28], ale także kwas kawowy [51,52,53] może współdziałać z cytostatykami w indukcji śmierci komórkowej i w ten sposób wspierać terapie przeciwnowotworowe. Wiadomo, że **fitozwiązki** mogą uszkadzać komórki nowotworowe, jednak, z reguły, w stopniu niewystarczającym do zainicjowania śmierci komórki [38]. Natomiast zastosowanie terapii złożonej; z udziałem leków syntetycznych i fitozwiązków, może zwiększyć **wrażliwość** komórek na stosowaną chemioterapię i pozwolić na zastosowanie niższej, efektywnej dawki leku. Obecnie podejmowane są próby zastosowania takiej strategii **uwrażliwiania** (ang. "*chemosensitization*") komórek nowotworowych na działanie chemioterapeutyków, w celu przeciwdziałania rozwojowi oporności na terapię, zmniejszenia toksycznego działania leku oraz uszkadzania komórek prawidłowych podczas leczenia [15]. Kwas kawowy [52] i jego pochodne [54] zostały zastosowane jako terapia adjuwantowa przed leczeniem cisplatyną; w celu zwiększenia cytotoksycznego efektu leku na komórki nowotworowe, a także dla wzmocnienia oddziaływania tamoksyfenu [55]. Ahn i wsp. wykazali, że kwas kawowy może poprawiać efekt terapeutyczny doksorubicyny w odpornej linii komórek ludzkiego raka piersi MCF-7/Dox. Kwas fenolowy zwiększał selektywność działania, co wykazano na liniach komórek nowotworowych opornych na cytostatyki w porównaniu z hodowlą kontrolną komórek [53]. Kombinowana strategia zwalczania nowotworów, z zastosowaniem **syntetycznych związków małowcząsteczkowych lub substancji**

pochodzenia naturalnego wydaje się być szczególnie uzasadnioną, ponieważ związki te mogą **wspierać działanie leków cytostatycznych jako adjuwanty** o szerokim spektrum aktywności wewnątrzkomórkowej, na którą składają się indukcja apoptozy, wpływ na przebieg cyklu komórkowego, hamowanie ścieżek przekazywania sygnału, pobudzanie procesu różnicowania, hamowanie ekspresji onkogenów, pobudzanie ekspresji genów supresorowych, inhibicja procesu angiogenezy oraz potencjału inwazyjnego komórek nowotworowych [20,25,56]. Obecnie, ogromne zainteresowanie budzi perspektywa zastosowania **małocząsteczkowych związków syntetycznych, także substancji pochodzenia roślinnego**, w terapiach celowanych, regulujących wewnątrzkomórkowe procesy biosyntezy oraz prowadzące do generowania energii [14,57,58].

2.2 Model badawczy

Efekty niepożądane stosowania metforminy i kwasu kawowego u ludzi.

Rozważając zasadność wyboru do niniejszych badań metforminy i kwasu kawowego oraz mając na względzie możliwość przyszłego zastosowania tych związków do wspierania terapii przeciwnowotworowych u ludzi, należy podkreślić, że generalnie związki te są dość dobrze tolerowane. Efekty stosowania metforminy w długim okresie czasu zostały niezwykle starannie przebadane w populacji ludzkiej. Kwas kawowy jest uznanym składnikiem diety człowieka. Jednym z działań niepożądanych biguanidów (metforminy, fenforminy) jest wzmożona synteza mleczanu w komórkach. Wykazano, że stosowanie **fenforminy** (1-(diaminometylideno)-2-(2-feniloetylo)guanidyny) może wiązać się **z ryzykiem wystąpienia kwasicy mleczanowej** u pacjentów. Ryzyko wystąpienia tych powikłań jest znacznie większe w przypadku fenforminy, niż metforminy. Obecnie nie zaleca się stosowania fenforminy jako leku. Biorąc pod uwagę ryzyko wystąpienia kwasicy mleczanowej, przeciwwskazaniem do stosowania metforminy u pacjentów są stwierdzone choroby nerek. Obecnie ocenia się, że jeśli u pacjenta zdiagnozowano jedynie niewielkie dysfunkcje, można podawać metforminę, przy właściwym monitorowaniu funkcji nerek [59,60]. Natomiast coraz więcej wyników badań potwierdza, że zarówno metformina, jak i kwas kawowy, charakteryzują się korzystnym wpływem na organizm ssaków. Ostatnio wykazano kardioprotekcyjne działanie metforminy u ludzi [59] oraz aktywność tego leku w procesach powodujących wydłużanie życia u ssaków, co spotkało się z szerokim zainteresowaniem [61]. Biorąc pod uwagę **powszechne zainteresowanie zastosowaniem w leczeniu metforminy oraz związków pochodzenia roślinnego**, zachodzi potrzeba **specjalistycznych badań nad oddziaływaniem tych związków, również na poziomie molekularnym**. Metformina i kwas kawowy są związkami dostępnymi, ich produkcja nie generuje wysokich kosztów, co urealnia ich ewentualne wykorzystanie w dostępnych terapiach. Szczególnie ważne wydaje się zastosowanie tych preparatów jako adjuwantów w kategoriach terapeutycznych związanych ze zwalczaniem chorób o wysokich wskaźnikach śmiertelności, wśród których lokuje się ciągle RSM.

Eksperymentalny model komórkowy

Przedmiotem badań, których wyniki zostały opublikowane w artykułach stanowiących podstawę habilitacji, było poznanie wpływu badanych związków na procesy metaboliczne

w komórkach raka szyjki macicy. W badaniach zastosowano model *in vitro* z użyciem linii komórkowych, dedykowany powszechnie w badaniu molekularnych mechanizmów działania leków. Należy jednak pamiętać, że w warunkach *in vivo* każdy **nowotwór charakteryzuje się indywidualnymi cechami**, w zależności od pochodzenia tkankowego i stopnia zaawansowania. Komórki współtworzące guz cechuje często znaczna **heterogenność** morfologiczna, funkcjonalna, a także metaboliczna [14,18]. Coraz więcej dowodów wskazuje na konieczność racjonalnego planowania terapii i poszukiwania molekularnych celów poprawiających skuteczność, szczególnie z uwzględnieniem cech indywidualnych komórki nowotworowej. Stosownie do tych założeń, w badaniach będących podstawą habilitacji wykorzystano model *in vitro* z uwzględnieniem fenotypu ludzkich komórek cerwikalnych i jednocześnie brano pod uwagę stadium rozwoju nowotworu, zdiagnozowane u dawcy komórek. W badaniach wykorzystano komórki pochodzące z guza *in situ* (linia epitelialnych komórek **C4-I**, numer identyfikacyjny American Type Culture Collection, ATCC: CRL1594) [62] oraz komórki o fenotypie migracyjnym z cechami złośliwości (linia komórek SiHa, numer identyfikacyjny ATCC: **HTB-35**). Zarówno w komórkach C4-I, jak i HTB-35/SiHa wykryto sekwencje DNA dla onkogenów HPV. Linia HTB-35 zawiera zintegrowany genom HPV typu 16, w komórkach C4-I stwierdzono obecność sekwencji DNA wirusa HPV typu 18 [63]. Dokładne badania ekspresji profilu genetycznego, przeprowadzone przez Carlsona i wsp. [64] ujawniły, że wśród linii komórkowych ATCC poddanych testom, linia C4-I wykazywała najwyższy stopień korelacji z komórkami nowotworów pochodzących z biopsji od pacjentek. Z kolei, regulacja ścieżek apoptotycznych w linii HTB-35/SiHa była bliższa procesom przebiegającym w komórkach nowotworowych nabłonka szyjki macicy [64]. Obie linie, **C4-I** i **HTB-35**, wykazują cechy charakterystyczne dla **raka płaskonabłonkowego** (ang. *squamous cell cancer*) i zostały wytypowane do eksperymentów, ze względu na fakt, że **ten rodzaj nowotworu stanowi ponad 80% przypadków RSM u pacjentek** [2,38].

Dodatkowo, dla celów porównawczych, w badaniach użyto komórek **HTB-34** (numer identyfikacyjny ATCC: MS751), izolowanych z guza wtórnego po metastazie. Komórki te zostały pozyskane z węzła chłonnego [63]. Zastosowanie dodatkowej linii raka płaskonabłonkowego, wywodzącego się z nowotworu szyjki macicy było uzasadnione, bowiem linia HTB-34 wykazuje fenotyp epitelialny. Wykazano, że w komórkach tych doszło do implementacji programu EMT, a po przerzucie do węzła chłonnego doszło do przejścia mezenchymalno - epitelialnego (ang. *Mesenchymal-to-Epithelial Transition, MET*) i zasiedlenia w tkance. W eksperymentach wykorzystano komórki ludzkie pochodzące z kolekcji ATCC, po uprzednim sprawdzeniu ich cech indywidualnych [64] oraz autentyczności (według listy *Cross-Contaminated or Misidentified Cell Lines*, opublikowanej przez *International Cell Line Authentication Committee, ICLAC*) [63]. W eksperymentach, opisanych w artykule **H2**, zastosowano też linię ludzkich prawidłowych **fibroblastów** (linia komórek BJ, numer identyfikacyjny ATCC: CRL-2522) oraz zmodyfikowaną linię komórek HTB-35 (w artykule **H2** oznaczonej jako linia SiHa *GFP⁺*). Opis szczegółowych warunków tych eksperymentów przedstawiono w dalszej części autoreferatu. Charakterystyka fenotypu linii komórkowych i ich zdolności do migracji w procesie przejścia epitelialno-mezenchymalnego była przedmiotem analiz, których wyniki zaprezentowano w artykule **H4**, natomiast badania w warunkach **hipoksji**, opisano w artykule **H1 i H4**.

Wybór dawek metforminy i kwasu kawowego zastosowanych w eksperymentach.

Badania wpływu metforminy oraz kwasu kawowego na metabolizm komórek nowotworowych poprzedzono wykonaniem testów aktywności antyproliferacyjnej tych związków. Do analiz zastosowano **test MTT** (z użyciem bromku 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazoliowego), a oznaczenie wykonano po 24 godzinnej inkubacji każdej linii komórkowej z szeregiem rozcieńczeń badanego związku chemicznego. Wyniki badań dla komórek C-4I zaprezentowano w artykule **H1 (Fig A1 A,B)**, dla linii HTB-35 w artykule **H2 (Fig 1G,H)**, a dla linii HTB-34 w artykule **H3 (Fig 1 A,B)**. W kolejnych eksperymentach badano efekty oddziaływania metforminy na komórki RSM w stężeniu 10 mM/L, a kwasu kawowego w stężeniu 100 μ M/L. Stężenia badanych związków wybrano na podstawie ich aktywności antyproliferacyjnej, ustalonej dla wszystkich badanych linii komórkowych; dla celów porównawczych stosowano takie same dawki we wszystkich eksperymentach. Należy podkreślić, że podobne stężenia związków były stosowane w badaniach z zastosowaniem modeli komórkowych, również przez innych autorów [na przykład 44,65,66]. Ponieważ celem eksperymentów było również zbadanie, jaki wpływ na komórki nowotworowe wywiera łączne zastosowanie obu badanych związków, w każdym eksperymencie stosowano mieszaninę 10 mM/L metforminy i 100 μ M/L kwasu kawowego.

Należy podkreślić, że celem eksperymentów było badanie wpływu związków na **mechanizmy regulujące metabolizm w różniących się od siebie fenotypem komórkach RSM**, a nie zależności efektu biologicznego od dawki. Jak wykazano w badaniach zaprezentowanych w artykule **H2 (Fig 1 A-F)**, zarówno metformina, jak i kwas kawowy wykazywały **selektywną toksyczność** względem komórek nowotworowych, dla stężeń obu związków, zastosowanych w eksperymentach. Nie stwierdzono efektu hamującego w hodowli komórek prawidłowych.

Biodostępność metforminy i kwasu kawowego oraz perspektywy ich wykorzystania u ludzi.

Głównym problemem w zastosowaniu związków pochodzenia roślinnego u ludzi jest z reguły ich **niska biodostępność**, co ogranicza możliwość ich klinicznego wykorzystania [38,67,68,69]. Głównie z tego powodu, większość przeprowadzonych dotąd badań wykazała niską aktywność w zakresie hamowania wzrostu guzów, przez monoterapie z zastosowaniem związków roślinnych *in vivo* u ludzi [70]. Podejmując badania, brano pod uwagę fakt ograniczonej biodostępności kwasu kawowego u ludzi. Należy zaznaczyć, że w surowicy krwi ludzkiej, osiągnięcie stężenia związku na poziomie 100 μ M/L jest niemożliwe, nawet przy dodatkowej, intensywnej suplementacji tym kwasem fenolowym [67,69,71]. Jednakże specyficzna lokalizacja raka szyjki macicy, pozwala na domiejscowe zastosowanie związku bioaktywnego w stosunkowo wysokich stężeniach. Zagadnienie to przedyskutowano w artykułach **H1 i H3**). Jak donosi S. Tyring [72]; Amerykańska Agencja ds. Leków i Żywności (ang. *US Food and Drug Administration, FDA*) dopuściła do użytku preparat zawierający katechiny do stosowania miejscowego o działaniu przeciwwirusowym, skierowanym przeciwko wirusowi HPV-16. Dodatkowo, jak wykazały badania Murad'a i wsp. [46], kwas kawowy jest transportowany do komórek nowotworowych. W prezentowanych badaniach, metformina została użyta w stężeniach milimolowych,

podczas, gdy średnie stężenie tego leku u pacjentów z cukrzycą typu II po zażyciu jednorazowej, doustnej dawki terapeutycznej, jest znacznie niższe [73]. Jednak zaobserwowano, że stężenie metforminy w macierzy mitochondrialnej w komórce może być nawet 1000 razy wyższe niż przeciętny poziom leku w surowicy ludzkiej krwi [74]. W oparciu o dostępne dane literaturowe można zatem przyjąć, że biodostępność nie będzie czynnikiem ograniczającym możliwość zastosowania obu związków w terapiach RSM.

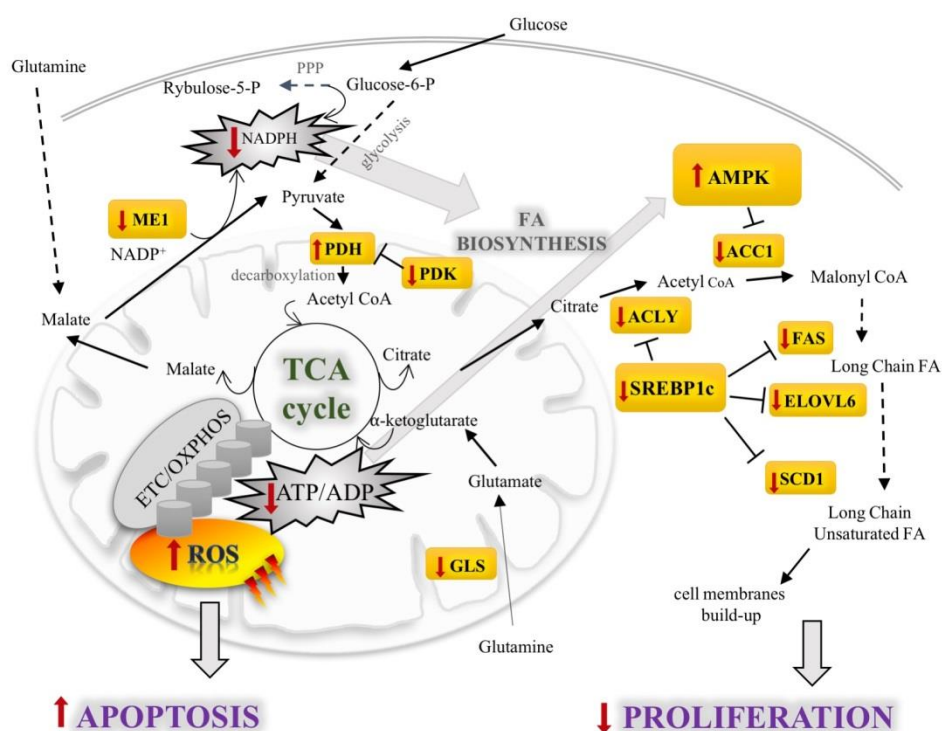
3. Szczegółowe omówienie osiągniętych wyników oraz ich znaczenia z uwzględnieniem aspektów nowości naukowej

Na osiągnięcie habilitacyjne składa się monotematyczny cykl publikacji **H1-H5**. Wyniki badań opisane w publikacjach nawiązują do sformułowanego w p. III.1 głównego celu oraz wymienionych następujących celów szczegółowych (pkt. 1-7):

- **ocena wpływu metforminy oraz kwasu kawowego na metabolizm mitochondrialny, w tym na regulację cyklu kwasów trikarboksylowych (ang. *tricarboxylic acids cycle*, *TCA cycle*) i przemian substratów energetycznych w komórkach nowotworowych oraz na bioenergetykę komórek RSM, ze szczególnym uwzględnieniem efektów regulowanych przez AMPK (publikacje **H1, H2, H3, H5**)**

Zmieniony metabolizm nadaje komórkom nowotworowym nowe cechy warunkujące ich przewagę nad komórkami prawidłowymi, przede wszystkim dostarczając energii niezbędnej do intensywnej proliferacji [75]. Komórki nowotworowe niezwykle sprawnie przystosowują swoje funkcje do szybkiego wzrostu, migracji i zasiedlania nowych tkanek. Jednym z procesów, które warunkują taką adaptacyjną przewagę komórek nowotworowych nad prawidłowymi, zróżnicowanymi komórkami tkanek, z których pochodzi nowotwór, jest „efekt Warburga” (ang. “*Warburg effect*”) [76]. Zjawisko to polega na aktywacji toru glikolizy do mleczanu, przy jednoczesnej dostępności w środowisku tlenu [77]. Wolno-proliferujące, zróżnicowane komórki zdrowych tkanek (tzw. „komórki spoczynkowe”, ang. „*quiescent cells*”) pozyskują energię i intermediaty do syntez, głównie z mitochondrialnych, oksydacyjnych przemian. Metabolizm nowotworów z reguły charakteryzuje intensywna glikoliza, charakterystyczna dla komórek bardzo aktywnie proliferujących. Preferowanie przez komórki nowotworowe tlenowej glikolizy, do niedawna wyjaśniano upośledzeniem funkcji mitochondriów i oksydacyjnej fosforylacji (OXPHOS), jednak wyniki najnowszych badań sugerują, że większość komórek nowotworowych charakteryzuje się funkcjonalnymi mitochondriami, co więcej, aktywne są tu mitochondrialne reakcje anaplerotyczne, dostarczające intermediatów niezbędnych do nasilonych syntez. W szybko proliferujących komórkach nowotworowych **cykl kwasów trikarboksylowych** (cykl Krebsa, ang. „*tricarboxylic acids cycle*”, *TCA cycle*) umożliwia generowanie siły redukcyjnej (synteza zredukowanego fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego, NADPH) oraz kofaktorów reakcji biochemicznych, np. zredukowanego dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADH). Na metaboliczny fenotyp komórek nowotworowych, składa się także aktywacja torów anabolicznych, co umożliwia sprawną syntezę nowych składników komórkowych i intensywne podziały. Co więcej, proces oksydacyjnej fosforylacji w mitochondriach, może w znaczącym stopniu zabezpieczać zapotrzebowanie komórek nowotworowych na energię [78]. Wyniki ostatnich badań wskazują, że w niektórych

komórkach nowotworowych; mitochondrialne reakcje OXPHOS są preferencyjnie wykorzystywane do syntezy cząsteczek ATP, odgrywając zasadniczą rolę w przetrwaniu komórek. Eksperymenty Rodríguez-Enríquez i wsp. [79] oraz Moreno-Sanchez i wsp. [80] wykazały, że również w komórkach RSM proces oksydacyjnej fosforylacji jest aktywny. Wyniki badań przedstawionych w pracach **H1-H3** również wskazują na mitochondrialne tory metaboliczne jako funkcjonalne w badanych liniach komórkowych C4-I, HTB-35 oraz HTB-34. Ich przebieg może być regulowany działaniem metforminy i kwasu kawowego. Dlatego, realizując pierwszy cel szczegółowy, poszukiwano odpowiedzi na pytanie, czy w przebiegu mitochondrialnych ścieżek metabolicznych w komórkach RSM, można zidentyfikować punkty uchwytu dla hamowania proliferacji RSM za pomocą metforminy i kwasu kawowego.



Rycina 1. Wpływ metforminy i kwasu kawowego na zasilanie cyklu kwasów trikarboksylowych (TCA) oraz syntezę *de novo* kwasów tłuszczowych w komórkach RSM. Schemat przedstawia efekty oddziaływania związków na główne procesy regulujące tlenowy metabolizm mitochondrialny: dekarboksylację pirogronianu do acetylo-CoA (poprzez aktywację kompleksu PDH), włączanie glutaminy do przemian cyklu TCA (poprzez regulację ekspresji GLS), odtwarzanie puli pirogronianu oraz zredukowanych cząsteczek NADPH do syntezy kwasów tłuszczowych, regulowane przez enzym ME1, syntezę mitochondrialnych RFT i aktywację zależnej od metabolizmu śmierci komórkowej na drodze apoptozy, zahamowanie biosyntezy kwasów tłuszczowych poprzez inhibicję ekspresji czynnika transkrypcyjnego SREBP1c i jego białek efektorowych (ACLY, FAS, ELOVL6 i SCD1). Najważniejsze skutki oddziaływania związków na białka regulatorowe i procesy komórkowe zaznaczono strzałkami, gdzie ↑ oznacza aktywację, ↓ hamowanie (Ryc.5 z artykułu **H5**, objaśnienia skrótów w tekście).

Coraz więcej danych wskazuje, że pobudzenie torów mitochondrialnych oddychania komórkowego, może czynić komórki nowotworowe bardziej wrażliwymi na określone czynniki. Regulacja zasilania cyklu kwasów trikarboksylowych substratami energetycznymi, takimi jak glukoza i glutamina, odgrywa ogromną rolę w utrzymaniu aktywnych procesów biosyntezy i generowania energii [81]. **Kompleks Dehydrogenazy Pirogronianowej (PDH)** jest enzymem odgrywającym istotną rolę w kontroli przemian glukozy w komórce. PDH, katalizując reakcję oksydacyjnej dekarboksylacji produktu glikolizy - pirogronianu do acetylo-CoA, zasila cykl TCA w substrat (**Rycina 1**). Aktywność kompleksu PDH jest precyzyjnie regulowana poprzez modyfikację kowalencyjną z udziałem **Kinazy Dehydrogenazy Pirogronianowej (PDK)**. Wyniki opublikowanych badań wskazują, że zwiększenie tempa mitochondrialnego metabolizmu poprzez aktywację kompleksu PDH, może być potencjalnym celem terapeutycznym interwencji przeciwnowotworowych. Ostatnio wiele uwagi poświęcono badaniu przeciwnowotworowej aktywności farmakologicznych inhibitorów PDK, takich jak **dichlorooctan (ang. Dichloroacetate, DCA)** [82,83,84,85]. Zastosowanie **DCA** w modelu ludzkich komórek raka szyjki macicy HeLa, wywołało uczynienie kompleksu PDH i zahamowanie glikolizy; co skutkowało masową śmiercią tych komórek [86]. Podobnie, DCA hamował wzrost komórek glioblastomy, co wykazano w modelu *ex vivo* [87,88]. Ze względu na wysoką aktywność, wykazaną w badaniach *in vitro*, oraz w modelach zwierzęcych z ksenograftami ludzkich komórek nowotworowych; DCA skierowano do badań klinicznych w leczeniu chorób nowotworowych piersi oraz płuc o potencjale metastatycznym. DCA stosunkowo łatwo przekracza barierę krew-mózg, dlatego badania kliniczne prowadzono na grupie chorych ze złośliwym guzem mózgu [13]. Niestety, wyniki badań klinicznych ujawniły również wysoką toksyczność dichlorooctanu u ludzi; z tego powodu część eksperymentów zakończono już na etapie II fazy [18]. Wyniki otrzymane z wykorzystaniem epitelialnych komórek raka szyjki macicy C-4I, zaprezentowane w pracy **H1 (Fig 2 A,B)**, pokazują, że kwas kawowy może być efektywnym inhibitorem PDK. Poprzez zahamowanie aktywności PDK, związek ten spowodował wzrost aktywności kompleksu PDH i udrożnienie przepływu pirogronianu do cyklu TCA (**H5, Fig. 5**). Podobne oddziaływanie kwasu kawowego zaobserwowano w epitelialnych komórkach HTB-34 (**H3, Fig 2 B**). Z kolei, jak wykazano w pracy **H2 (Fig 2 A,B)**; metformina reguluje aktywność PDK w metastatycznych komórkach HTB-35. Badania nad molekularnym mechanizmem oddziaływania związku, zaprezentowane w pracy **H1**, ujawniły, że dodatkowo lek ten wpływa hamująco na ekspresję izoenzymu **PDK1** - specyficznego dla komórek nowotworowych i kontrolowanego przez **czynnik transkrypcyjny indukowany niedotlenieniem HIF1 α** (ang. *Hypoxia-inducible factor-1 α*) [89]. Co ciekawe, w warunkach niedotlenienia, które często występują we wnętrzu guza, efekt hamowania ekspresji genu **PDK1** przez metforminę był jeszcze silniejszy (**H1, Fig 6B**). Taka aktywność metforminy może mieć istotne znaczenie praktyczne, ponieważ w poszukiwaniu inhibitorów PDK, szczególny nacisk kładzie się na znalezienie związku specyficznego hamującego dany izoenzym, by uniknąć efektów ubocznych terapii *in vivo*. Utrzymanie się aktywności związku w określonych warunkach, takich jak hipoksja, stanowi niezwykle korzystny efekt [13,90]. Wykazano, że wyciszenie genu kodującego **PDK3** w komórkach raka szyjki macicy HeLa, z użyciem specyficznie zaprojektowanych krótkich, interferencyjnych fragmentów RNA (ang. *short interference RNA*, siRNA), może modulować przebieg ścieżek metabolicznych, szczególnie w warunkach

niedotlenienia, oraz ograniczać oporność na działanie cisplatyny [91]. Wyniki zaprezentowane w artykułach **H1**, **H2** i **H3** wykazały, że zarówno metforminę, jak i kwas kawowy charakteryzuje potencjał do regulowania aktywności PDK. Mechanizm tego oddziaływania jest zależny od fenotypu komórek nowotworowych oraz wpływu warunków mikrośrodowiska.

W warunkach zahamowanego napływu pirogronianu z cytoplazmatycznego toru glikolizy do mitochondriów, cykl TCA w komórkach nowotworowych może być zasilany w dodatkowe substraty energetyczne, takie jak glutamina. Obok zwiększonego katabolizmu glukozy, także podwyższone zużycie **glutaminy** stanowi ważną cechę adaptacyjną, warunkującą utrzymanie odpowiedniego poziomu biosyntezy oraz generowanie związków wysokoenergetycznych w komórce nowotworowej [81]. W warunkach wzmożonej proliferacji, nadekspresja enzymu - **Glutaminazy** (ang. *Glutaminase*, **GLS**) pozwala komórce nowotworowej na podtrzymanie aktywności cyklu TCA na odpowiednim poziomie [92]. Hamowanie aktywności enzymu ogranicza wzrost komórek nowotworowych [93]. W badaniach przedstawionych w artykule **H2 (Fig 2A)** wykazano, że ekspozycja komórek raka szyjki macicy HTB-35 na działanie metforminy, spowodowała zahamowanie ekspresji GLS, co z kolei skutkowało ograniczeniem zasilania anabolicznych torów mitochondrialnych, niezbędnych dla syntezy makromolekuł (szczególnie lipidów i białek). Wyniki eksperymentów wykonanych na linii komórek prawidłowych fibroblastów ujawniły, że efekt ten był specyficzny dla komórek nowotworowych, ponieważ inkubacja z metforminą nie wpłynęła na poziom ekspresji genu dla GLS w hodowli fibroblastów, co wykazano z zastosowaniem immunoblotingu (**H2, Fig 2A**). Do tej pory niewiele wiadomo, poprzez jakie mechanizmy, biguanidy mogą wpływać na cykl TCA w nowotworach. Badania Janzer'a i wsp. [94] wykazały, że metformina hamuje syntezę intermediatów cyklu TCA w komórkach macierzystych, pochodzących z nowotworu piersi. Inkubacja z metforminą nie wpłynęła jednak na ekspresję GLS [94]. Badania przedstawione w artykule **H1** wykazały, że kwas kawowy posiada zdolność hamowania ekspresji GLS w linii C-4I, co stanowi pierwsze doniesienie o regulacyjnym wpływie tego związku na ekspresję GLS w komórkach RSM (**H1, Fig 1A**). Ograniczenie ekspresji GLS może mieć zatem istotne znaczenie dla skuteczności niektórych terapii, ponieważ wiele komórek nowotworowych wykazuje uzależnienie wzrostu od obecności glutaminy w środowisku. Ograniczenie możliwości zasilania cyklu TCA glutaminą, może mieć istotne znaczenie i wpływać na wynik leczenia [95]. Wyniki eksperymentów z zastosowaniem inkubacji z metforminą i kwasem kawowym, wykonanych na linii HTB-34 nie wykazały znamiennej statystycznie wpływu tych związków na ekspresję GLS (**H3, Fig 2B**). Można przypuszczać, że w tej linii dostępność substratu dla cyklu TCA regulowana jest jedynie poprzez aktywność kompleksu PDH.

Wyniki badań zaprezentowanych w artykułach **H1**, **H2** i **H3** pokazują, że regulacja aktywności oraz poziomu ekspresji, enzymów związanych z cyklem TCA, wpływa na zahamowanie przemian intermediatów niezbędnych dla reakcji biosyntezy związków budulcowych, co w efekcie prowadzi do zablokowania proliferacji komórek nowotworowych.

Katabolizm glukozy do mleczanu, dostarcza komórkom nowotworowym mniej energii pochodzącej z wysokoenergetycznych wiązań w cząsteczce ATP, w porównaniu do energii

generowanej w procesie mitochondrialnej oksydacyjnej fosforylacji. Komórki „uzależnione” od glikolizy muszą pobierać duże ilości monocukru ze środowiska, by sprostać tak ogromnemu zapotrzebowaniu. W komórkach nowotworowych proces ten kontrolują **receptory GLUT** (receptory *solute carrier family 2 member*, receptory SLC2A), białka błonowe, transportujące glukozę do komórki, których aktywność warunkuje wydajność tlenowej glikolizy. W komórkach nowotworowych często dochodzi do nadekspresji specyficznych przenośników dla glukozy, z rodziny GLUT, w szczególności GLUT1 (ang. *solute carrier family 2 member 1*, SLC2A1) i GLUT3 (ang. *solute carrier family 2 member 3*, SLC2A3), a zwiększony transport glukozy do komórki zasila tory katabolizmu tego cukru. Ze względu na fakt, że stała K_m dla receptorów GLUT1 i GLUT3 (charakterystycznych dla komórek nowotworowych), jest niska i odpowiada stężeniu ok 1mM/L, komórki nowotworowe mogą pobierać glukozę z krwi, nawet przy obniżonym stężeniu cukru w krwioobieg [14,18]. W pracy **H3** wykazano, że inkubacja komórek HTB-34 z kwasem kawowym, skutkowała zahamowaniem ekspresji receptora GLUT1 (**H3, Fig 2B**) i zmniejszeniem pobierania glukozy przez komórki hodowli (**H3, Fig 2C**). Co ciekawe, wyniki badań wskazują, że kwas kawowy może obniżać wydzielanie mleczanu z komórek HTB-34, którego poziom jest podwyższony przez metforminę (**H3, Fig 2C**). Podobny efekt zaobserwowano w hodowli komórek HTB-35 (**H2, Fig 2C**). Jak już wspomniano, kwasica ketonowa jest głównym efektem ubocznym terapii metforminą. Statystycznie istotne obniżenie wydzielania mleczanu po zastosowaniu kwasu kawowego wykazano zarówno w hodowli komórek prawidłowych, jak i nowotworowych (**H2, Fig 2C**).

Zahamowanie przez kwas kawowy nadmiernej syntezy mleczanu w komórkach eksponowanych na działanie metforminy, jest szczególnie ciekawym aspektem działania kwasu, stwarzającym perspektywę jego terapeutycznego zastosowania. Badania nad tym efektem będą kontynuowane w modelach *in vivo*. Testowane związki, zarówno kwas kawowy, jak i metformina, obniżały w sposób statystycznie istotny, ekspresję receptora GLUT3 w linii HTB-35 (**H1, Fig 6B**), zarówno w warunkach normoksji, jak i niedotlenienia (hipoksji).

Procesy metaboliczne w komórkach podlegają ścisłej regulacji warunkującej dostosowanie się komórki do aktualnych wymogów środowiska, przede wszystkim dostępności składników odżywczych. Prawidłowe funkcjonowanie mechanizmów regulatorowych ma krytyczne znaczenie dla przetrwania komórek w warunkach stresu metabolicznego. Ostatnio, wiele uwagi poświęcono badaniom roli **kinazy aktywowanej przez 5'-monofosforan adenozyne (AMPK)** w przemianach biosyntetycznych i energetycznych w komórkach [96]. Badania nad funkcją AMPK ujawniły, że enzym ten, aktywowany wzrastającym stężeniem AMP w komórce, odgrywa kluczową rolę w adaptacji metabolizmu do zmian środowiskowych, w konsekwencji przetrwania komórki w warunkach stresu energetycznego. Pobudzenie aktywności AMPK przez serynowo-treoninową kinazę 11 (ang. *Liver Kinase B1*, LKB1), prowadzi do hamowania ścieżek anabolicznych oraz do aktywacji alternatywnych przemian metabolicznych, zapewniających utrzymanie w komórce stężenia ATP na odpowiednim poziomie. AMPK aktywowana jest na drodze fosforylacji, w odpowiedzi nie tylko na niedostatek substratów energetycznych, ale także na czynniki takie jak niedotlenienie i zaburzenie funkcji mitochondriów [26]. Ze względu

na centralną rolę, jaką AMPK odgrywa w regulacji przebiegu ścieżek sygnałowych i metabolicznych w komórkach, zwrócono szczególną uwagę na oddziaływanie tego białka w komórkach nowotworowych [26,31]. Obecnie intensywnie badany jest przebieg ścieżek sygnałowych kontrolowanych przez ten enzym. Podejmowane są próby zastosowania regulacji AMPK, zarówno w **chemioprewencji**, jak i w **nowych terapiach przeciwnowotworowych**. W wielu przeprowadzonych ostatnio eksperymentach wykazano, że AMPK, poprzez regulację ekspresji białek efektorowych i wpływ na liczne ścieżki sygnałowe, może odgrywać istotną rolę w hamowaniu progresji niektórych nowotworów [97]. Wykazano, że AMPK odgrywa kluczową rolę w procesie różnicowania komórek linii mieloidalnej, a poprzez aktywację osi LKB1/AMPK można zahamować postęp progresji złośliwych nowotworów szpiku [98]. Z kolei badania Chen'a i wsp. [99] ujawniły, że wyciszenie aktywności AMPK w ludzkich komórkach raka trzustki, skutkuje zwiększeniem inwazyjności i potencjału metastatycznego tych komórek. Stwierdzono, że w transformujących się komórkach, aktywacja AMPK skutkuje zatrzymaniem syntezy lipidów, rRNA i białek. Hamowanie torów syntezy białek zachodzi głównie poprzez supresję białka **mTORC1**. Aktywacja AMPK może także skutkować inhibicją procesów wewnątrzkomórkowych regulowanych przez serynowo-treoninową kinazę **AKT**, która w komórkach nowotworowych często ulega nadekspresji [35]. Metaboliczne skutki interakcji pomiędzy AMPK, mTORC1 i kinazą AKT, oraz możliwość wykorzystania wzajemnej regulacji tych białek w warunkach różnej dostępności substratów energetycznych; ich znaczenie w terapiach przeciwnowotworowych, omówiono w pracy **H5 (H5 Fig 3)**.

Z drugiej jednak strony, aktywacja procesów regulowanych przez AMPK może działać **pro-przeżyciowo** w przypadku niektórych nowotworów; jak wykazały niezależne badania Popovics'a i wsp. [100] oraz Park'a i wsp. [101], przeprowadzone na hodowlach komórek raka prostaty. Także w innych komórkach neoplastycznych, wykazano, że o ile w początkowej fazie nowotworzenia, aktywacja AMPK może działać supresyjnie na rozwój guza, to w zaawansowanym stadium wzrostu nowotworu, molekularny mechanizm oddziaływania AMPK na komórkę, staje się bardziej złożony. Wyniki badań sugerują, że wewnątrzkomórkowe przemiany, spowodowane aktywacją AMPK, mogą być charakterystyczne, nie tylko dla stadium rozwoju nowotworu, ale również tkankowo - specyficzne [102]. Dlatego, jak podkreślono w konkluzjach artykułu **H5**, proste manipulacje aktywnością enzymu, często nie odnoszą pożądanego efektu terapeutycznego. Potrzebne jest raczej zrozumienie powiązań; tła metabolicznego ze specyficznym profilem genetycznym i tkankowym, oraz pochodzeniem określonych komórek nowotworowych. W niestabilnych genetycznie komórkach nowotworowych może dochodzić do mutacji w genach kodujących białka aktywatorów lub efektorów AMPK. Wykazano, że w RSM mogą często występować mutacje somatyczne w genie kodującym kinazę LKB1, co prowadzi do dysfunkcji tego białka, np. w komórkach C4-I. Może też dojść do całkowitego braku ekspresji kinazy LKB1, kontrolującej funkcję AMPK - co wykazano techniką Western blot na linii HTB-35 [103]. W takim przypadku, niemożliwa jest eliminacja komórek nowotworowych na drodze klasycznej aktywacji osi LKB1/AMPK. Badania Xiao i wsp. [65] wykazały, że ekspozycja komórek RSM z prawidłową ekspresją LKB1, na metforminę - skutkuje efektywną indukcją śmierci komórkowej. Pojawia się zatem istotne pytanie, czy istnieje inny mechanizm,

poprzez który metformina i inne związki małowcząsteczkowe, mogą hamować przeżywalność komórek nowotworu szyjki macicy z defektem ekspresji białka LKB1. Zgodnie z najnowszymi doniesieniami [104], komórki z defektem *LKB1* mogą być bardziej podatne na stan stresu energetycznego. Fakt ten stwarza możliwość wykorzystania małowcząsteczkowych związków w celowanych terapiach, w których śmierć komórek nowotworowych, następowałaby w wyniku zaburzenia homeostazy energetycznej. Badania przedstawione w artykule **H1**, potwierdzają, że metformina i kwas kawowy mogą wykazywać takie właściwości, ponieważ w komórkach C4-I; kwas kawowy powodował nagły spadek stężenia ATP i to właśnie ten mechanizm, a nie klasyczna aktywacja osi LKB1/AMPK, skutkowałą spadkiem proliferacji i śmiercią komórek. Co więcej, wykazano, że jednoczesne zastosowanie kwasu kawowego i metforminy - obniżało stężenie ATP w hodowli komórek C4-I, efektywniej niż każdy związek zastosowany osobno (**Fig.4B**). Wyniki kolejnych eksperymentów potwierdziły gwałtowny spadek stężenia ATP w komórkach HTB-35 po 24 godzinnej inkubacji z metforminą, co jest zgodne z wynikami Parkera i wsp. [105], przeprowadzonymi w hodowlach niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP) z defektem LKB1. Na tej linii wykazano, że komórki są wrażliwe na stres metaboliczny, wywołany działaniem fenforminy. Kwas kawowy hamował również proliferację komórek HTB-34 (**H3, Fig 1C**), w których, podobnie do pozostałych linii użytych w eksperymentach, stwierdzono defekt genu *LKB1* [65].

Wnioski z tej części badań

1. **Metformina i kwas kawowy** oddziałują na białka kontrolujące **zasilanie cyklu TCA w substraty - glukozę i glutaminę**. Efekt wpływu badanych związków na enzymy regulatorowe cyklu Krebsa jest **specyficzny względem fenotypu komórek nowotworowych**, ponieważ **metformina** powoduje supresję enzymów **PDK i GLS** w linii komórek raka szyjki macicy **HTB-35 o agresywnym fenotypie**, a **kwas kawowy** powoduje inhibicję tych celów molekularnych w linii **epitelialnych komórek RSM C4-I**.
2. Inkubacja komórek **C4-I z kwasem kawowym** hamuje **zasilanie cyklu TCA na dwa niezależne sposoby**; poprzez blokowanie aktywności **kompleksu PDH** oraz ekspresji genu dla **GLS**.
3. W **epitelialnej linii C4-I kwas kawowy** ogranicza **pobieranie glukozy** do komórek, przez zahamowanie ekspresji receptora **GLUT1**.
4. **Metformina** wykazuje opisywany w literaturze efekt **pobudzenia wydzielania mleczanu** przez komórki, a **kwas kawowy hamuje** ten proces w komórkach **C4-I** -eksponowanych na **oba związki**.
5. Badane związki hamują ekspresję transportera **GLUT3** w linii komórek **HTB-35**, ograniczając w ten sposób **zasilanie komórek w glukozę**. Efekt ten obserwowany jest zarówno w warunkach **hipoksji**, jak i **normoksji**.
6. Linie komórkowe RSM, w których prowadzono badania, charakteryzowały się **defektem ekspresji LKB-1**. Inkubacja z badanymi związkami powodowała **stres energetyczny** i to właśnie ten **mechanizm**, a nie klasyczna aktywacja osi LKB1/AMPK, prowadził do **śmierci komórek** eksponowanych na **metforminę i kwas kawowy**.

7. **Metformina** efektywnie hamowała **syntezę ATP** w komórkach **HTB-35**, a **kwaskawowy** - w linii **C4-I**.
8. Zastosowanie **łącznie; metforminy i kwasu kawowego**, zwiększało **stres energetyczny** w komórkach RSM w porównaniu do każdego związku zastosowanego **pojedynczo**.

Aspekty nowości i znaczenie badań

Obecnie trwają intensywne prace nad zastosowaniem syntetycznych i naturalnych **modulatorów metabolizmu mitochondrialnego w przeciwnowotworowych strategiach terapeutycznych**. W prezentowanych artykułach, po raz pierwszy wykazano, że **kwaskawowy** może być efektywnym **inhibitorem PDK i GLS** w komórkach RSM o **epitelialnym fenotypie**, natomiast **metformina** hamuje ekspresję tych enzymów w linii nowotworowej o **fenotypie agresywnym**. Zaobserwowano, że **kwaskawowy hamuje kwasotę mleczanową** wywołaną działaniem **metforminy**. Badania wykazały, że **oba badane związki** małowcząsteczkowe, wywoływały w komórkach nowotworowych **stan stresu energetycznego**. To właśnie ten **mechanizm**, a nie pobudzenie klasycznej ścieżki sygnałowej zależnej od AMPK, wywiera **efekt hamujący na przeżycie komórek nowotworowych w RSM**.

- **określenie potencjału metforminy oraz kwasu kawowego do generowania stresu oksydacyjnego w mitochondriach i wywoływania śmierci apoptotycznej komórek, zależnej od metabolizmu (publikacje H1, H2, H3, H5)**

Funkcjonowanie i przetrwanie przetrzujących komórek nowotworowych, pozostaje pod wpływem czynników zewnątrz- oraz wewnątrz- komórkowych. Podczas, gdy do pierwszej grupy należy przede wszystkim dostępność składników pokarmowych oraz tlenu, wśród czynników wewnętrznych, istotną rolę odgrywają produkty ekspresji zmutowanych onkogenów i stopień zróżnicowania komórek. W inwazyjnych, przetrzujących komórkach nowotworowych, w szczególności precyzyjna regulacja torów biosyntezy makromolekuł związanych z cyklem TCA oraz generowanie energii z wysokoenergetycznych wiązań ATP, odgrywają zasadniczą rolę. Znaczenie tych przemian metabolicznych przedyskutowano szerzej w artykule **H5**. Wymienione przemiany biochemiczne są istotne dla zachowania homeostazy i przetrwania komórek, spełniając rolę metabolicznych punktów kontrolnych [106]. Należy podkreślić, że wewnątrz guzów mamy często do czynienia ze słabym ukrwieniem. Jednak w tych warunkach stopień natlenowania pozwala komórkom nowotworowym na aktywację przemian mitochondrialnych i łańcucha transportu elektronów dla pozyskania energii do syntezy ATP [88]. Ostatnie doniesienia wskazują, że zasilanie glikolizy lub przemian mitochondrialnych, w zależności od aktualnych potrzeb, pozwala tym komórkom na unikanie stresu oksydacyjnego. „Metaboliczna plastyczność”, polegająca na balansowaniu pomiędzy torami biochemicznymi, skutkuje unikaniem eliminacji komórek na drodze apoptozy lub anoikis [79,107,108]. W pewnym zakresie, komórki nowotworowe mogą precyzyjnie regulować natężenie przemian oksydacyjno-redukcyjnych. Jednak zaburzenie regulacji przemian metabolicznych, może prowadzić do nadprodukcji mitochondrialnych reaktywnych form tlenu (RFT), których stężenie może wzrosnąć na tyle, by stać się toksyczne dla komórki nowotworowej. Zostają wtedy uruchomione liczne mechanizmy, prowadzące do aktywacji apoptozy i, w konsekwencji - do śmierci komórkowej

(H5, Ryc. 4). Wiele dowodów wskazuje, że w komórkach nowotworowych, które mają funkcjonalne mitochondria, generowanie wolnych rodników w **przemianach mitochondrialnych i wywoływanie stresu oksydacyjnego**, można wykorzystać w **celowanych terapiach** [17].

Dlatego też, celem prezentowanych prac było zbadanie, czy regulacja przebiegu mitochondrialnych procesów metabolicznych, działaniem metforminy oraz kwasu kawowego, może skutkować nadmiernym uwalnianiem RFT w mitochondriach.

Niezależnie przeprowadzone badania, z zastosowaniem wielu linii komórkowych, wskazują na silne właściwości **proapoptotyczne**; zarówno metforminy, jak i kwasu kawowego. Wykazano, że kwas kawowy indukuje programowaną śmierć linii komórek ludzkiego gruczolaka piersi [109]. Ostatnie badania w grupie pacjentek cierpiących na przerost endometrium i zespół policystycznych jajników (ang. *Polycystic Ovary Syndrome*, PCOS) ujawniły, że metformina może normalizować komórkowy metabolizm glukozy, a nawet pobudzać mitochondrialną ścieżkę apoptozy [110]. Niedawno opublikowane wyniki eksperymentów, ujawniły także wzrost stężenia RFT w komórkach ludzkiego gruczolaka żołądka [111] oraz złośliwego nowotworu szyjki macicy HeLa [112] - wywołane działaniem metforminy, prowadziły do aktywacji ścieżek apoptotycznych i do śmierci komórek.

Dlatego, biorąc pod uwagę wcześniej uzyskane wyniki badań własnych, z których wynika, że metformina i kwas kawowy regulują aktywność mitochondrialnych punktów kontrolnych w komórkach HTB-35 i C-4I - następny etap badań, miał na celu ustalenie, czy nadprodukcja wolnych rodników w mitochondriach może wywoływać programowaną śmierć tych komórek.

Dotychczas opracowano szereg technik do ilościowego badania procesu apoptozy, jednak najbardziej precyzyjną jest **cytometria przepływowa**, którą w prezentowanych badaniach zastosowano do oceny potencjału metforminy i kwasu kawowego do wywoływania apoptozy. Zastosowana analiza, wykorzystująca sorter komórkowy z pomiarem fluorescencji (ang. *Fluorescence-Activated Cell Sorter*, FACS) pozwala na weryfikację efektu w każdej komórce poddanej działaniu badanych związków i ustalenie, jaki procent populacji komórek wykazuje cechy charakterystyczne dla **apoptozy** oraz **nekrozy** [113]. Barwniki fluorescencyjne zastosowane w badaniach - aneksyna V i homodimer etydyny III (EthD-III), pozwoliły na precyzyjne, ilościowe określenie frakcji komórek apoptotycznych i nekrotycznych. Podobnie, technikę cytometrii przepływowej z barwnikiem fluorescencyjnym (MitoSox) zastosowano do oznaczania **wolnych rodników, generowanych w mitochondriach** komórek eksponowanych na działanie badanych związków.

Jak już wspomniano poprzednio, małowcząsteczkowy związek, jakim jest dichlorooctan (DCA), aktywuje apoptozę, w wyniku pobudzenia przemian mitochondrialnych, polegających na zahamowaniu funkcji PDK i aktywacji łańcucha oddechowego [84,85,114]. Choi i wsp. [86], donoszą, że ekspozycja komórek raka szyjki macicy HeLa na DCA skutkowało **nasiloną produkcją RFT** i, w konsekwencji, **apoptotyczną śmiercią** tych komórek. Zgodnie z danymi eksperymentalnymi, przedstawionymi przez innych autorów, badania przeprowadzone w linii komórek C-4I, eksponowanych na kwas kawowy, wykazały,

że aktywacja kompleksu PDH, skutkująca intensywnym zasilaniem cyklu TCA w pirogronian; również w tym przypadku doprowadziła do nadprodukcji mitochondrialnych RFT (**H1, Fig 3A**), a wywołany w ten sposób stres oksydacyjny powodował śmierć komórek (**H1, Fig 3B**). Podobny efekt działania kwasu kawowego, wykazano w testowanej, epitelialnej linii RSM, HTB-34. Wyniki eksperymentów zaprezentowano w artykule **H3 (Fig 1F; Fig 3 A,B)**. Co istotne, kwas kawowy wywoływał śmierć na drodze apoptozy, a nie nekrozy. Efekt ten stwierdzono, zarówno w hodowli komórek C4-I (**H1, Fig 3B**), jak i komórek HTB-34 (**H3, Fig 1F**), poddanych ekspozycji na kwas kawowy. Oddziaływanie kwasu kawowego na komórki nowotworowe, prowadzące do ich programowanej śmierci, może mieć istotne znaczenie, dla zastosowania tego związku w terapiach przeciwnowotworowych. W organizmie, apoptoza przebiega bez wywołania reakcji zapalnej, w przeciwieństwie do nekrozy. Ta ostatnia, poprzez aktywację kaskady czynników prozapalnych, może doprowadzić do znacznych uszkodzeń tkanek [106].

Wyniki eksperymentów zaprezentowane w artykule **H2** wykazały jednoznacznie, że inkubacja komórek prawidłowych, zarówno z kwasem kawowym, jak i z metforminą; nie podnosi stężenia wolnych rodników w mitochondriach (**Fig 3A,B**). Zatem efekt oddziaływania tych związków jest specyficzny dla komórek nowotworowych.

Utrzymywanie równowagi procesów wolnorodnikowych w komórce realizowane jest na dwa sposoby; po pierwsze - poprzez kontrolę generowania RFT, po drugie - poprzez regulację **systemów komórkowej ochrony, skierowanych przeciw wolnym rodnikom**. Znaczenie homeostazy wolnorodnikowej dla komórek nowotworowych, przedyskutowano szerzej w artykule **H5 (H5, Fig 4)**. Wykazano, że komórki nowotworowe mogą wykształcać bardzo efektywne sposoby ochrony przed stresem oksydacyjnym, utrzymując stężenie RFT w komórce poniżej progu wywołującego śmierć komórek. Wraz z głębszym zrozumieniem tych procesów; nowe strategie zwalczania komórek nowotworowych, zakładają jednoczesne celowanie, nie tylko w wywoływanie stresu oksydacyjnego, lecz także w osłabienie systemów ochrony wolnorodnikowej w komórce. Wrażliwość komórek nowotworowych na terapię, można skutecznie wzmocnić na drodze farmakologicznego zahamowania regeneracji cząsteczek glutationu [115]. Redukcja cząsteczek glutationu odbywa się przy udziale **NADPH**, a dostępność w komórce zredukowanej formy tego dinukleotydu odgrywa kluczową rolę w podtrzymywaniu ochrony przeciw RFT [116]. W warunkach stresu oksydacyjnego komórka nowotworowa szybko zużywa swoje zasoby NADPH, dlatego komórki neoplastyczne charakteryzują się szczególnie wydajnymi procesami odtwarzania zredukowanej formy dinukleotydu, by mogły uniknąć apoptozy. Celem eksperymentów, których wyniki przedstawiono w artykule **H1**, było wykazanie, czy skutkiem oddziaływania kwasu kawowego na metabolizm epitelialnych komórek C4-I, oprócz wywołania stresu oksydacyjnego w wyniku nadprodukcji mitochondrialnych RFT, może być również **zaburzenie regeneracji cząsteczek NADPH**. Przeprowadzone badania wykazały, że kwas kawowy osłabia potencjał przeciwoxidujący komórek, właśnie poprzez taki mechanizm (**H1, Fig. 1B**). Co więcej, nasilona anapleroza glutaminy w cyklu TCA, jaka ma miejsce w komórkach nowotworowych, może umożliwiać redukcję NADP^+ , ponieważ reakcji przekształcenia jabłczanu do pirogronianu, katalizowanej przez **Enzym Jabłczanowy 1**

(ang. *Malic Enzyme 1*, **ME1**), towarzyszy odtwarzanie cząsteczki zredukowanego dinukleotydu (NADPH) (**Rycina 1**).

Jak wspomniano, kwas kawowy, oprócz zahamowania zasilania cyklu TCA w glutaminę, spowodował również osłabienie transportu glukozy do komórek RSM. Można przypuszczać, że w warunkach ograniczonej podaży glukozy, regeneracja NADPH w szlaku pentozofosforanowym (ang. *Pentose Phosphate Pathway*, PPP), może być niewystarczająca do zapewnienia takiej ilości zredukowanej formy dinukleotydu, jaka jest niezbędna do ochrony przed nadmiarem RFT [117]. Wyniki analiz Western blot przedstawionych w artykule **H1** wskazują, że w komórkach C4-I, kwas kawowy hamował ekspresję, nie tylko GLS, ale również **ME1 (H1, Fig. 1 A)**. W ten sposób kwas kawowy eliminował komórki C4-I (**H1, Fig 3B**), oddziałując przez dwa mechanizmy; z jednej strony - powodując stres oksydacyjny (**H1, Fig 3A**), z drugiej - blokując możliwość unormowania poziomu RFT, poprzez zahamowanie regeneracji cząsteczek NADPH w komórce (**H1, Fig 1B**).

W komórkach HTB-35, metformina wykazała podobne działanie do kwasu kawowego - hamując ekspresję GLS oraz ME1 (**H2, Fig. 2A**). Jednak, podczas gdy kwas kawowy najefektywniej pobudzał generowanie RFT w linii C4-I (**H1, Fig 3A**), efekt wywołany przez metforminę w komórkach HTB-35, był zaledwie porównywalny do oddziaływania kwasu kawowego w tej linii (**H2, Fig 3B**). Jednocześnie, ekspozycja komórek na metforminę - wywołała masową apoptozę komórek, w odróżnieniu od efektu wywołanego przez kwas kawowy (**H2, Fig. 1D**). Zasadnym wydawało się zatem przypuszczenie, że metformina wywołuje apoptozę w linii HTB-35, poprzez nieznaną, dodatkowy mechanizm(y). Rzeczywiście - kolejne eksperymenty, zaprezentowane w artykule **H1**, pokazują, że ekspozycja komórek na metforminę, wywołała zmianę ekspresji **białek z rodziny Bcl-2** (ang. *B-cell lymphoma protein family members*), które odgrywają istotną rolę w regulacji mitochondrialnej ścieżki aktywacji apoptozy. Aktywacja białka BAX prowadzi do zakłócenia prawidłowego potencjału błony mitochondrialnej i uruchomienia kaskady śmierci komórkowej, podczas gdy białko Bcl-2 jest supresorem apoptozy. Wzajemne oddziaływanie białek BAX i Bcl-2, ma kluczowe znaczenie dla regulacji kaskady apoptotycznej w mitochondriach i uważane jest za istotny punkt regulatorowy metabolizmu mitochondrialnego [106]. Co więcej, poprzez ścieżkę zależną od BAX/Bcl-2, mogą być w komórce nowotworowej uruchamiane mechanizmy kompensacyjne, hamujące apoptozę, co odgrywa ogromną rolę w rozwoju oporności na niektóre terapie i przyczynia się do znacznego obniżenia ich skuteczności [88]. Analiza wyników qPCR wykazała, że inkubacja komórek HTB-35 z metforminą zwiększyła ilość transkryptu *BAX*, a poziom mRNA dla tego genu w komórkach poddanych hipoksji, był znacznie wyższy niż w warunkach normoksji (**H1 Fig. 7B**). Co więcej, w komórkach HTB-35, metformina jednocześnie; hamowała ekspresję genu kodującego *BCL-2* - w hipoksji i w normoksji. Badania Zhang'a i wsp. [34] wykazały, że w komórkach nowotworowych metformina powoduje znaczący spadek ekspresji **cykliny D1**. Nadekspresja tego białka w komórkach raka płaskonabłonkowego, jest pozytywnie skorelowana z występowaniem oporności na działanie chemioterapeutyków i osłabieniem mechanizmów proapoptotycznych [118]. Dane zaprezentowane w artykule **H1** wskazują na hamowanie ekspresji genu *CCND1* kodującego cyklinę D1 również w agresywnych komórkach HTB-35, eksponowanych na metforminę

(H1 Fig. 7B). Mechanizm tego oddziaływania obejmował także inhibicję ekspresji onkogenu *c-MYC*, który kontroluje transkrypcję cykliny D1 w komórkach nowotworowych. Można zatem przypuszczać, że metformina aktywnie wzbudzała kaskadę śmierci w linii HTB-35 (H1 Fig. 7A), ponieważ oddziaływała przez kilka niezależnych mechanizmów regulujących mitochondrialną apoptozę - takich jak indukcja RFT, regulacja ścieżki zależnej od białek Bcl-2 oraz cykliny D1.

Należy podkreślić, że efekt proapoptotyczny; oddziaływania metforminy jak i kwasu kawowego, zaobserwowano jedynie w komórkach nowotworowych, a ekspozycja fibroblastów na działanie badanych związków, nie spowodowała żadnych zmian - co wykazano za pomocą analiz Western blot (H2 Fig 2A).

Wyniki badań dowodzą, że w określonych okolicznościach aktywacja AMPK może przyczynić się do zwalczania stresu oksydacyjnego w komórkach nowotworowych [119,120]. Problem ten, w odniesieniu do zastosowanego modelu eksperymentalnego, zostanie przedyskutowany w następnym rozdziale.

Wnioski z tej części badań

1. Ostatnie doniesienia sugerują, że **jednoczesne kontrolowanie dwóch lub więcej mechanizmów proapoptotycznych zwiększa efektywność terapii przeciwnowotworowych**. Uzyskane wyniki badań, w szczególności nad oddziaływaniem **kwasu kawowego** w linii **komórek epitelialnych** potwierdzają, że takie podejście może skutkować uzyskaniem **lepszego efektu terapeutycznego**.

2. Ekspozycja komórek **C4-I** na **kwas kawowy** jednocześnie aktywuje **mitochondrialny metabolizm**, co wyzwała w komórkach **stres oksydacyjny** oraz powoduje **zaburzenie regeneracji NADPH** w reakcji katalizowanej przez **ME1**.

3. **Metformina**, w hodowli komórek **HTB-35**, wykazuje efekt regulacyjny na **mitochondrialny metabolizm**, co prowadzi do generowania **RFT**, jednak **apoptoza** jest tu dodatkowo pobudzana przez aktywację ekspresji pro-apoptotycznego białka **BAX** przy jednoczesnym zahamowaniu ekspresji onkogenu *c-MYC* oraz genu *CCND1* (kodującego cyklinę D1).

4. **Metformina** aktywuje **apoptozę**, nie tylko w warunkach **normoksji**, ale również podczas **obniżonej dostępności tlenu (hipoksji)**.

5. **Pro-apoptotyczne działanie metforminy i kwasu kawowego** było **specyficzne** jedynie dla **komórek nowotworowych**, żaden z tych związków nie wywołał stresu oksydacyjnego ani nie wzbudził apoptozy w komórkach **prawidłowych fibroblastów**.

6. **Nekrotycznej śmierci komórkowej** może towarzyszyć szereg efektów ubocznych, takich jak nadmierna reakcja zapalna, natomiast **apoptoza** nie powoduje takich efektów. **Metformina i kwas kawowy** wywoływały śmierć komórek nowotworowych przez **apoptozę**, co jest szczególnie istotne rozważając możliwość **zastosowania badanych związków w terapiach przeciwnowotworowych**,

Aspekt nowości i znaczenie badań

Apoptoza indukowana wolnymi rodnikami jest celowanym mechanizmem wielu strategii terapeutycznych w leczeniu chorób nowotworowych. Jednak komórki raka

wykazują **podwyższoną tolerancję na stres oksydacyjny**, wynikającą z aktywnych **systemów ochrony**. Dlatego też ostatnie doniesienia podkreślają, że aby zminimalizować ryzyko aktywacji **mechanizmów kompensacyjnych**, efektywna strategia przeciwnowotworowa powinna uwzględniać oba te czynniki.

Prezentowane wyniki po raz pierwszy ujawniły, że **kwaskawowy hamuje regenerację cząsteczek NADPH**, przez inhibicję enzymu **ME1**. Poprzez ten mechanizm dodatkowo zostają zaburzone komórkowe systemy ochrony przed wolnymi rodnikami w **epitelialnych komórkach RSM**. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów wskazały, że **ME1 może być kolejnym (nowym), molekularnym celem wykorzystywanym do indukcji i/lub wspierania eliminacji komórek nowotworowych - na drodze apoptozy**. **Metformina aktywuje apoptozę** oddziałując nie na jeden, lecz **kilka molekularnych celów**.

- **poznanie wpływu metforminy oraz kwasu kawowego na regulację syntezy *de novo* kwasów tłuszczowych w komórkach RSM** (publikacje **H1, H2, H3**)

Komórki złośliwych nowotworów ulegają częstym podziałom, a natężone procesy biosyntezy zapewniają dostępność składników dla nowo powstających komórek potomnych. Metabolizm tych komórek charakteryzuje się, przede wszystkim, jednoczesną aktywacją reakcji **syntezy *de novo* kwasów tłuszczowych** (ang. *fatty acids*, FA) oraz toru **glikolizy** [121]. Biosynteza kwasów tłuszczowych dostarcza komponentów do budowy błon komórkowych oraz cząsteczek sygnałowych, które pozwalają komórce nowotworowej na formowanie w błonach lipidowych tzw. raftów lipidowych, domen błony komórkowej, poprzez które mogą ulec wzmocnieniu sygnały transdukcyjne, pobudzające wzrost komórek [122,123]. Przemiany mitochondrialne, a w szczególności cykl TCA, generujący główny, lipogenny substrat w komórce (cytrynian), walenie przyczyniają się do dostarczania prekursorów dla syntezy FA [117]. Ponieważ kwas kawowy pobudza zasilanie cyklu TCA szkieletami węglowymi w komórkach C4-I, a metformina wykazuje analogiczne oddziaływanie w linii HTB-35; zasadne było sprawdzenie, czy związki te mogą również wpływać na proces syntezy lipidów. W artykułach **H1, H2 i H3** opisano wyniki badań, w których wykorzystano technikę immunoblotingu, do wykazania; czy metformina i kwas kawowy regulują ekspresję enzymów kontrolujących tor biosyntezy FA. Dodatkowo, za pomocą technik spektrofotometrycznych, zbadano zmiany zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych (ang. *unsaturated FA*, unsat FA) w komórkach inkubowanych z każdym ze związków i oboma związkami łącznie.

Eksperymenty wykazały, że ani ekspozycja komórek C4-I (**H1, Fig 5B**) i HTB-34 (**H3, Fig 4B**) na kwas kawowy, ani linii HTB-35 na metforminę (**H2, Fig 4B**); nie spowodowała wzrostu **zawartości unsat FA** w tych komórkach. Przeciwnie, kwas kawowy spowodował istotny statystycznie spadek stężenia unsat FA w linii C4-I, a metformina w linii HTB-35. Łączne zastosowanie obu badanych związków, powodowało największy spadek stężenia lipidów, we wszystkich testowanych liniach. Aby wyjaśnić te szczególne zmiany w metabolomie komórek, w kolejnym etapie zbadano; czy metformina i kwas kawowy mogą wpływać na ekspresję **czynnika transkrypcyjnego SREBP-1c** (ang. *Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c*, **SREBP-1c**). SREBP-1c jest białkiem, kontrolującym ekspresję kolejnych enzymów syntezy *de novo* FA; Liaz ATP-cytrynianowej

(ang. *ATP Citrate Lyase*, ACLY), Syntazy Kwasów Tłuszczowych (ang. *Fatty Acid Synthase*, FAS) oraz Elongazy Kwasów Tłuszczowych 6 (ang. *Fatty Acid Elongase 6*, ELOVL6). Wykazano, że nadekspresja SREBP-1c i enzymów kontrolowanych przez to białko (na przykład FAS), jest pozytywnie skorelowana ze stopniem inwazyjności nowotworów [121]. Co ciekawe, w badaniach wykonanych na linii komórek HTB-35; **tylko łączne zastosowanie metforminy i kwasu kawowego**, hamowało ekspresję SREBP-1c. Zastosowanie każdego ze związków osobno, nie wywoływało efektu (**H2, Fig 4A**). Badania nad mechanizmem oddziaływania metforminy i kwasu kawowego ujawniły, że dopiero zastosowane ich kombinacji, blokuje ekspresję enzymów biosyntezy FA, kontrolowaną przez SREBP-1c (**H1, Fig 5A; H2, Fig 4A; H3, Fig 4B**). Metformina i kwas kawowy nie wpływały na ekspresję białek, ani zawartość nienasyconych FA w komórkach prawidłowych; co przedstawiono w artykule **H2** (odpowiednio, **Fig 4A i 4B**). Co więcej, czynnik transkrypcyjny SREBP-1c kontroluje także ekspresję Desaturazy Stearoilo-CoA (ang. *Stearoyl-CoA Desaturase*, SCD1). Komórki nowotworowe poprzez ekspresję desaturaz, mogą regulować ilość syntetyzowanych unsat FA, przez to oddziaływać na płynność błon komórkowych, co z kolei wpływa na potencjał metastatyczny tych komórek [121]. Dlatego desaturacja kwasów tłuszczowych została wskazana jako potencjalny cel dla nowych strategii terapii przeciwnowotworowych [37,124]. Eksperymenty wykonane przez Fritz'a i wsp. [125] ujawniły, że zahamowanie aktywności SCD1 za pomocą czynników farmakologicznych, hamuje syntezę unsat FA, co z kolei hamuje proliferację komórek raka prostaty, zarówno wrażliwych, jak i opornych na androgeny. Ograniczenie ekspresji desaturazy hamuje także wzrost guza *in vivo* [125]. W prezentowanych badaniach; łączne zastosowanie obu badanych związków - metforminy i kwasu kawowego, zablokowało syntezę SCD1 w komórkach HTB-35. Inkubacja komórek linii epitelialnych C4-I i HTB-34 z badanymi związkami, także spowodowała znaczący spadek ekspresji białka - desaturazy (odpowiednio, **H1, Fig 5A i H3, Fig 4A**). Coraz więcej publikowanych danych sugeruje, że zwiększona aktywność enzymów regulatorowych syntezy *de novo* lipidów może korelować pozytywnie z implementacją programu EMT (ang. *Epithelial-to-Mesenchymal Transition*) i w konsekwencji ułatwiać migrację i inwazję komórek nowotworowych [123,125]. Sánchez-Martínez i wsp. [124] opisali aktywację sieci przekazywania sygnału, zależną od ACSL/SCD, która może uruchomić w komórkach nowotworowych jelita, fenotyp charakterystyczny dla implementacji programu EMT, natomiast aktywacja AMPK hamuje ten proces. Wpływ metforminy i kwasu kawowego na program EMT w komórkach RSM zostanie obszerniej przedyskutowany w jednym z kolejnych rozdziałów.

W komórkach nowotworowych, ścieżki metaboliczne i sygnałowe zależne od AMPK, mogą zasadniczo wpływać na przebieg biosyntezy kwasów tłuszczowych. Aktywowana AMPK fosforyluje i inaktywuje enzym regulatorowy syntezy kwasów tłuszczowych - Karboksylazę Acetylo-CoA1 (ang. *Acetyl-CoA Carboxylase 1*, ACC1). Jednakże, jak już wspomniano, AMPK może oddziaływać cytoprotekcyjnie na komórki nowotworu złośliwego. Mechanizm takiego wpływu obejmuje wyciszenie torów syntezy, które zużywają NADPH. Oszczędzone w ten sposób cząsteczki zredukowanego dinukleotydu mogą wspomagać ochronę komórki przeciw wolnym rodnikom – co w niezależnych badaniach wykazali Jeon i wsp. [120] oraz Park i wsp. [101]. Z drugiej jednak strony, zahamowanie

lipogenezy spowodowane aktywacją AMPK, może ograniczać tempo proliferacji komórek nowotworowych, co zasugerowali Weinberg i Chandel [70]. Biorąc pod uwagę oba zaprezentowane punkty widzenia, możliwe jest, że supresja biosyntezy kwasów tłuszczowych rzeczywiście ograniczy zużycie NADPH, ale w dalszej perspektywie, negatywnie wpłynie na zdolności komórki do podziałów. Dane przedstawione w artykułach **H1**, **H2** i **H3** dotyczące trzech linii komórkowych C4-I, HTB-35 i HTB-34, pokazują, że w modelu komórek RSM, eksponowanych na kwas kawowy, metforminę oraz oba związki łącznie; zatrzymanie procesu regeneracji NADPH (hamowanie ekspresji ME1) i zaburzenie procesów energetycznych komórki skutkują efektem anty-, a nie pro- przeżyciowym. Możemy zatem przypuszczać, że w takich warunkach metabolicznych, aktywacja AMPK nie ułatwi przetrwania komórek nowotworowych. Rzeczywiście, w hodowlach każdej badanej linii komórkowej HTB-34 (**H3, Fig 1C,E**), C4-I (**H1, Fig A1C**) oraz w komórkach HTB-35 o agresywnym fenotypie (**H2, Fig 1B**) - zaobserwowano zahamowanie proliferacji pod wpływem ekspozycji na badane związki. Jednocześnie warto podkreślić, że oba związki ograniczały proliferację komórek i syntezę lipidów, jedynie w komórkach nowotworowych, a nie w prawidłowych (**H2, Fig 4A,B**). Badania nad mechanizmem oddziaływania kwasu kawowego i metforminy na metabolizm lipidów w komórkach RSM będą kontynuowane.

Wnioski z tej części badań

1. **Kombinacja kwasu kawowego i metforminy** zahamowała ekspresję czynnika transkrypcyjnego **SREBP-1c** i kontrolowanych przez niego **enzymów regulujących syntezę *de novo* kwasów tłuszczowych**.
2. Łączne zastosowanie **kwasu kawowego i metforminy** w hodowli komórek RSM spowodowało **ograniczenie ekspresji enzymu SCD1**, a ekspozycja komórek na badane związki, spowodowała **spadek ilości unsat FA w tych komórkach**.
3. **Upośledzenie syntezy kwasów tłuszczowych** spowodowane działaniem badanych związków było **specyficzne jedynie dla komórek nowotworowych**, a żaden ze związków nie wpłynął na enzymy regulatorowe biosyntezy FA w **fibroblastach**.
4. **Zahamowanie syntezy *de novo* kwasów tłuszczowych** przyczyniło się do **osłabienia potencjału proliferacyjnego** wszystkich badanych linii komórkowych.
5. **Aktywacja AMPK** w specyficznych warunkach metabolicznych, wywołanych działaniem **kwasu kawowego i metforminy** w RSM, także **nie wspomagała przetrwania komórek nowotworowych**.

Aspekt nowości i znaczenie badań

W prezentowanych badaniach wykazano po raz pierwszy, że **łączne zastosowanie kwasu kawowego i metforminy w hodowli komórek RSM skutkuje zahamowaniem syntezy nienasyconych kwasów tłuszczowych**, które w komórkach nowotworowych spełniają istotną rolę, jako cząsteczki sygnałowe oraz składniki budulcowe błon komórkowych. **Molekularny mechanizm** tego oddziaływania, polega na **hamowaniu ekspresji białka SREBP-1c** i kontrolowanych przez niego **enzymów regulujących syntezę *de novo* kwasów tłuszczowych**. Co więcej, zahamowanie syntezy enzymu **SCD1** w komórkach, spowodowane inkubacją z **kwasem kawowym i metforminą**, stwarza

perspektywę przyszłego zastosowania tych związków (łącznie i osobno) w specyficznych terapiach RSM.

- **zbadanie wpływu metforminy oraz kwasu kawowego na białka regulatorowe glikolizy oraz określenie wpływu badanych związków na poziom ekspresji wybranych onkogenów, kontrolujących aktywność białek i enzymów regulujących fenotyp metaboliczny komórek RSM, w warunkach zmiennej dostępności tlenu w mikrośrodku (normoksji i hipoksji) (publikacje **H1, H5**)**

Niezależnie od tkankowego pochodzenia, wspólną cechą agresywnych nowotworów jest ich uzależnienie od glukozy. Tak przeprogramowany metabolizm pozwala migrującym komórkom nowotworowym na uodpornienie i pewną niezależność od warunków środowiskowych, co w efekcie ułatwia proces metastazy. Rozregulowanie metabolizmu glukozy jest w dużej mierze spowodowane zmianami funkcjonowania kilku **onkogenów**, wśród których należy wymienić cMyc, p53, PI3K i mTOR. Dodatkowo, aktywacja takich czynników transkrypcyjnych jak HIF-1 α , czyni komórki raka bardziej odpornymi na niedotlenienie (hipoksję), które jest jednym z głównych czynników regulujących parametry środowiska rosnącego guza nowotworowego [17,81,126]. Aktywacja czynnika indukowanego przez hipoksję **HIF-1 α** w komórkach nowotworowych o agresywnych cechach, promuje pozyskiwanie cząsteczek ATP w procesie **glikolizy** i jednocześnie wyciszenie ścieżek mitochondrialnych. Jak już wspomniano, takie zmiany metaboliczne umożliwiają migrującym komórkom nowotworowym unikanie stresu oksydacyjnego, który mógłby aktywować śmierć komórkową. W ten sposób komórki nowotworowe mogą uniknąć programowanej śmierci na drodze anoikis (gr. „bezdomny”), wywoływanej przez brak kontaktu z białkami macierzy pozakomórkowej (ang. *Extracellular Matrix*, ECM) [108]. Na skutek oderwania od guza nowotworowego, przenikania do osocza i limfy, komórki nowotworowe mogą natomiast rozsiewać się, tworząc guzy przerzutowe.

Ekspozycja agresywnych komórek HTB-35 na metforminę może wpłynąć na ich **fenotyp glikolityczny**. W eksperymentach zaprezentowanych w artykule **H1** badano, jaki jest mechanizm oddziaływania metforminy na procesy regulujące aktywność białek kontrolujących metabolizm glukozy. Aktywacja fenotypu glikolitycznego komórek nowotworowych zależy głównie od funkcji HIF-1 α . W pierwszej kolejności badano, czy metformina może wpływać na aktywację czynnika transkrypcyjnego oraz ekspresję kontrolowanych przez niego genów. Analiza wyników uzyskanych techniką immunoblotingu wykazała, że metformina hamuje aktywność czynnika transkrypcyjnego (**Fig 6A**), a także kolejnych białek pozostających pod kontrolą HIF-1 α (**Fig 6B**), w komórkach HTB-35 inkubowanych ze związkiem badanym, zarówno w warunkach normalnego, jak i obniżonego stężenia tlenu w atmosferze.

Metformina hamowała ekspresję transporterów glukozy GLUT1 i GLUT3, ekspresję enzymu regulatorowego glikolizy - Heksokinazy 2 (ang. *Hexokinase 2*, HK2), kolejnych enzymów regulujących przebieg toru, takich jak bifunkcyjny enzym - Fosfofruktokinaza II (PFK-2)/fruktozo-2,6-bisfosfataza (FBPaza-2) (ang. *6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Biphosphatase 4*, PFKFB4), Kinaza Pirogronianowa (ang. *Pyruvate Kinase*, PKM) i Dehydrogenaza Mleczanowa (ang. *Lactate Dehydrogenase*, LDH) (**Fig 6B, Fig S1**). Kwas

kawowy ograniczał syntezę białek dla transporterów GLUT oraz enzymów HK2, PFKFB4 i LDH, jednocześnie stwierdzono niewielki wpływ na inne białka regulatorowe glikolizy (**Fig 6B; S1**) i brak efektu na aktywność HIF-1 α (**Fig 6A**). W warunkach hipoksji, oddziaływanie kwasu kawowego było minimalne, co sugeruje, że mechanizm nie był zależny od HIF-1 α . Wyniki prezentowane w artykule H1 wskazują, że w komórkach C4-I, kwas kawowy indukował stres oksydacyjny (**Fig 3A**) oraz hamował syntezę ATP (**Fig 4B**) i tempo wzrostu (**Fig A1,D**).

W warunkach hipoksji, panujących we wnętrzu litych guzów, **aktywacja czynnika HIF-1 α** ogranicza tempo przemian w cyklu TCA w mitochondriach, co jednocześnie hamuje reakcje ETC i minimalizuje ryzyko stresu oksydacyjnego, który mógłby uszkodzić komórkę. Co więcej, aktywacja procesów regulowanych przez HIF-1 α może skutkować również uruchomieniem dodatkowych mechanizmów kompensacyjnych, które umożliwiają komórkom nowotworowym przetrwanie i uniknięcie apoptozy. Na poziomie metabolicznym taka funkcja HIF-1 α realizowana jest przez ograniczenie aktywności kompleksu PDH [130,127]. Wyniki eksperymentów, opublikowane w artykule **H1** pokazują, że w hodowli komórek HTB-35, metformina przeciwdziałała aktywacji glikolizy kosztem przemian mitochondrialnych, poprzez wpływ na główne białko regulatorowe, kontrolowane przez HIF-1 α , PDK1 (**Fig 6B**). Jak już wspomniano, w wyniku aktywacji kompleksu PDH, następuje większe zasilanie substratem cyklu TCA oraz osłabienie syntezy mleczanu. Charakterystyczną cechą metabolizmu komórek raka płaskonabłonkowego, które tracą kontakt z białkami ECM i zaczynają migrować, jest właśnie ograniczenie funkcji kompleksu PDH i hamowanie łańcucha oddechowego w mitochondriach. Z drugiej strony wykazano, że stymulacja PDH wzmacnia wrażliwość komórek na anoikis, hamując w ten sposób metastatyczny potencjał komórek nowotworowych. [128]. Ostatnio opublikowane wyniki badań pokazały, że w nowotworowych komórkach macierzystych, pochodzących z raka piersi, metformina ograniczyła jednocześnie katabolizm glukozy w torze glikolizy i przemiany w cyklu TCA, co ostatecznie zahamowało wzrost tych komórek [94]. Eksperymenty przedstawione w artykule **H1** pokazują nieco inny mechanizm oddziaływania metforminy, niż opisany dla nowotworowych komórek macierzystych. Metformina oddziaływała jednocześnie na oba procesy przemian glukozy - cytozolowy i mitochondrialny. Poprzez regulację tych torów metabolicznych doszło do pobudzenia apoptozy i zahamowania przeżywalności komórek, zarówno w warunkach normoksji, jak i hipoksji (**Fig 7A**).

Wyniki ostatnio opublikowanych badań wskazują, że nadekspresja onkogenu **c-Myc** może być jednym z czynników aktywujących w RSM [77]. Zwiększenie ekspresji tego białka, odgrywa szczególną rolę w nabywaniu przez komórkę nowotworową „elastycznego” fenotypu. Wykazano, że produkowane w nadmiernych ilościach białko c-Myc, wraz z czynnikiem HIF-1 α , wzmagają zaopatrywanie komórek nowotworowych w glukozę i glutaminę oraz osłabiają mitochondrialną fosforylację oksydacyjną. Skutkuje to zwiększeniem syntezy mleczanu w **komórkach** [118,130]. **Nadekspresja c-Myc w szczególności pobudza katabolizm glutaminy w komórkach nowotworowych**, ponieważ synteza **GLS** pozostaje pod kontrolą onkogenu. Jak wykazały wyniki qPCR, metformina obniżyła ekspresję genu *c-MYC* w komórkach HTB-35 (**H1, Fig 7**), a także zahamowała ekspresję białka enzymu GLS, co wykazały analizy Western blot (**H1, Fig 1A**).

Ponadto inkubacja tych komórek z metforminą spowodowała spadek ilości mRNA dla następnego białka kontrolowanego przez onkogen *c-Myc*, a mianowicie *CCND1* (cykliny D1) (**H1, Fig 7B**). Jak wspomniano poprzednio, opisane mechanizmy, wraz z aktywacją BAX/hamowaniem Bcl-2, przyczyniły się do uruchomienia programu śmierci komórkowej w linii RSM o agresywnym fenotypie (HTB-35).

Kwas kawowy wykazał podobne działanie do metforminy w komórkach **C4-I**, ponieważ zahamował ekspresję *c-MYC* i *CCND1* (**H1, Fig S2**) oraz białka GLS - co zahamowało zasilanie cyklu TCA w glutaminę (**H1, Fig 1A**).

Wnioski z tej części badań

1. Ekspozycja na **metforminę**, linii komórek **HTB-35** o agresywnym fenotypie skutkowałą **zahamowaniem** funkcji regulatora transkrypcji **HIF-1 α** oraz kontrolowanych przez niego, **glikolitycznych genów**.

2. **Metformina** regulowała **zasilanie mitochondrialnego metabolizmu** w substraty w linii HTB-35 poprzez **efekt długoterminowy**, który obejmował wpływ na **ekspresję genu** kodującego **PDK1** oraz **krótkoterminowy**, poprzez zahamowanie **aktywności** enzymu **PDK**. Dzięki temu **metformina wzmacniała zasilanie cyklu TCA w pirogronian**, zarówno w warunkach **normoksji**, jak i **hipoksji**.

3. **Metformina hamowała fenotyp glikolityczny** komórek HTB-35, poprzez obniżenie ekspresji **onkogeny *c-MYC*** i ograniczenie syntezy białka **GLS** oraz pobudzenie **apoptozy**, towarzyszące supresji onkogeny **cykliny D1**. Regulacja tych procesów przyczyniła się do obniżenia **metabolicznej plastyczności** komórek HTB-35.

4. **Kwas kawowy** hamował ekspresję **białek regulatorowych glikolizy** w komórkach C4-I w warunkach **normoksji**.

Aspekt nowości i znaczenie badań

Uzyskane wyniki dowodzą, że **metformina** hamuje fenotyp glikolityczny agresywnych komórek RSM; poprzez **jednoczesną regulację toru glikolizy i mitochondrialnego metabolizmu**, co przyczynia się do aktywacji **apoptozy**. **Metformina** oddziałuje na zasilanie mitochondrialnych przemian poprzez **różne mechanizmy**. Należy podkreślić, że zarówno w warunkach **normoksji**, jak i **hipoksji**, ekspozycja komórek na metforminę skutkuje **zwiększonym napływem pirogronianu do cyklu TCA**. Ten aspekt aktywności metforminy, może zostać wykorzystany w tych **terapiach przeciwnowotworowych**, które będą w szczególności sposobem nakierowane na niszczenie komórek nowotworowych wewnątrz **litych guzów**.

W warunkach **normoksji**, **kwas kawowy** hamuje tor **glikolizy** w komórkach C4-I, dlatego też można stwierdzić, że **oba związki wykazują pożądaną zdolność do regulacji metabolizmu**. Efekt oddziaływania jest **specyficzny**, w zależności od określonych cech fenotypowych komórek RSM.

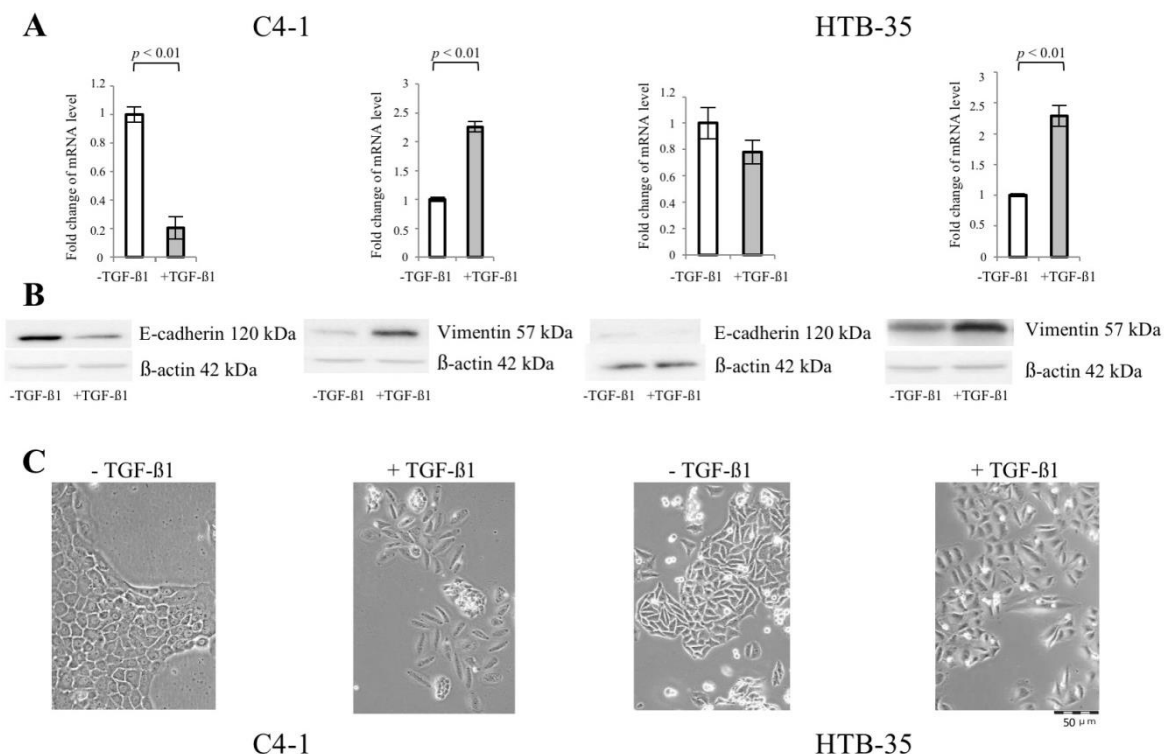
- **Wpływ metforminy oraz kwasu kawowego na zmianę fenotypu komórek i ich zdolność do migracji w procesie indukowanego przejścia epithelialno-**

mezenchymalnego (ang. *Epithelial-to-Mesenchymal Transition*, EMT) w komórkach RSM (publikacja H4)

Wyniki wielu badań potwierdzają, że aktywacja w komórkach nabłonkowych **procesu przejścia epitelialno-mezenchymalnego** (ang. *Epithelial-to-Mesenchymal Transition*, EMT) odgrywa istotną rolę w nabywaniu przez komórkę cech inwazyjnych, progresji nowotworu oraz przerzutowania. Podczas uruchomienia programu EMT komórki epitelialne nabywają cech morfologicznych charakterystycznych dla komórek mezenchymalnych; takich np. jak wydłużony, wrzecionowaty kształt, co odgrywa rolę w nabywaniu zdolności do ruchu przez te komórki [131,132]. Implementacja programu EMT w złośliwych nowotworach szyjki macicy jest jednym z molekularnych mechanizmów, poprzez który komórki wykształcają oporność na działanie chemioterapeutyków, w szczególności cisplatyny [7]. Komórki o cechach metastatycznych mogą aktywować ścieżki metaboliczne generujące ATP, bez wywołania stresu oksydacyjnego. Możliwości ich przetrwania w czasie inwazji zależą ściśle od precyzji dostosowania metabolizmu do nowych warunków [81]. Biorąc pod uwagę, że fenotyp metaboliczny komórek nowotworowych może promować ich zdolności do metastazy i unikania mechanizmu apoptozy typu anoikis, należało sprawdzić, czy w komórkach RSM, metformina i kwas kawowy mogą wpływać na proces implementacji EMT. Dodatkowym uzasadnieniem do podjęcia badań były doniesienia, w których wykazano, że zarówno kwas kawowy [44,133], jak i metformina [134,135,136] mogą hamować EMT w liniach nowotworowych o różnym pochodzeniu.

W pierwszym etapie eksperymentów badano zdolność do ruchu komórek linii C4-I oraz HTB-35, za pomocą systemu HoloMonitor Imaging (dane nie publikowane, dzięki uprzejmości Prof. Marcina Majki i współpracy z mgr. Pawłem Koniecznym z Zakładu Transplantologii Wydziału Lekarskiego UJ CM w Krakowie). Na podstawie obserwacji ustalono, że obie linie wykazują odmienną **zdolność do ruchu**. Komórki HTB-35 były szczególnie ruchliwe, nawet bez uprzedniej stymulacji, podczas gdy przemieszczanie się komórek C4-I było znikome. W obu badanych liniach komórkowych indukowano proces EMT poprzez 48 godziną inkubację z 10 ng/mL cytokiny **Transformującego Czynnika Wzrostu $\beta 1$** (ang. *Transforming Growth Factor $\beta 1$* , **TGF- $\beta 1$**), co szczegółowo opisano w artykule **H4**. Ekspresję białek charakterystycznych dla EMT, badano z zastosowaniem techniki Western blot oraz analizy qPCR (**H4, Fig 1A,B**). W komórkach, które przeszły przez proces EMT, spada ekspresja białek specyficznych dla spolaryzowanego **fenotypu epitelialnego** (np. **E-kadheryny 1, CDH1**), natomiast jednocześnie rośnie ekspresja białek reorganizacji cytoszkieletu, takich jak **wimentyna (VIM)** [137]. Zgodnie z danymi, zebranymi za pomocą HoloMonitora, komórki C4-I, przed stymulacją wykazywały silną ekspresję genu *CDH1* i słabą genu *VIM*. Stymulacja komórek za pomocą TGF- $\beta 1$ spowodowała spadek ekspresji E-kadheryny z jednoczesnym wzrostem ekspresji wimentyny i oddysocjowywaniem komórek od monowarstwy, jak przedstawiono na mikrofotografiach (**H4, Fig 1C**), co oznaczało implementację EMT w komórkach. Natomiast komórki HTB-35, nawet przed stymulacją, wykazywały cechy charakterystyczne dla komórek mezenchymalnych. Inkubacja z TGF- $\beta 1$ jedynie wzmocniła ekspresję wimentyny i pogłębiła zdolność komórek do ruchu (**H4, Fig 1C**). Wyniki te były zgodne z danymi opublikowanymi przez Lin'a i wsp., które wskazywały, że niska ekspresja LKB1 w komórkach

nowotworowych, może sprzyjać indukcji programu EMT [138]. Biorąc pod uwagę profil ekspresji białek w testowanych liniach komórkowych, badania wpływu metforminy i kwasu kawowego na molekularne mechanizmy regulujące EMT, wykonano z użyciem linii C-4I; stymulowanej za pomocą TGF- β 1 vs. niestymulowanej, zastosowanej jako układ odniesienia.



Rycina 2. Indukcja przejścia epithelialno-mesenchymalnego (EMT) w komórkach C4-I i HTB-35 działaniem TGF- β 1 (A–C). Obie linie ludzkiego płaskonabłonkowego raka szyjki macicy, (C4-I i HTB-35), inkubowano przez 48 godz. w pożywce z dodatkiem TGF- β 1 w stężeniu 10 ng/mL. Hodowle kontrolne utrzymywane były w takich samych warunkach, jednak bez dodatku cytokiny. W stymulowanych komórkach C4-I, wyniki analizy qPCR ujawniły istotny statystycznie spadek transkrypcji E-kadheryny w porównaniu do komórek kontrolnych ($p < 0.01$), podczas gdy w linii HTB-35, zmiana ekspresji tego białka nie była istotna statystycznie ($p < 0.05$). Należy zwrócić uwagę, że inkubacja z TGF- β 1 spowodowała statystycznie istotny wzrost ekspresji wimentyny w obu liniach komórkowych, co wykazano z użyciem techniki qPCR (A, $p < 0.01$ vs. kontrola dla linii C-4I i $p < 0.01$ vs. kontrola dla HTB-35) oraz analizy Western blot (B, 20 μ g lizatów komórkowych rozdzielano techniką SDS-PAGE, a po procesie immunoblottingu poddawano dotekacji chemiluminescencyjnej; β -aktyny użyto jako kontroli nakładania próbek na żel). Eksperymenty powtarzano trzykrotnie otrzymując zbliżone wyniki; dane otrzymane w analizie qPCR przedstawiono jako wartości średnie \pm SD (A). Reprezentatywne wyniki immunoblottingu przedstawiono na panelu B. 48 Godz. inkubacja z TGF- β 1 wywołała zmiany w morfologii komórek obydwu linii, co przedstawiono na przykładowych mikrofotografiach z kontrastem fazowym. (C). W hodowlach C-4I oraz HTB-35 zaobserwowano rozpraszanie komórek pod wpływem inkubacji z TGF- β 1 (Rycina 1 z artykułu **H4**).

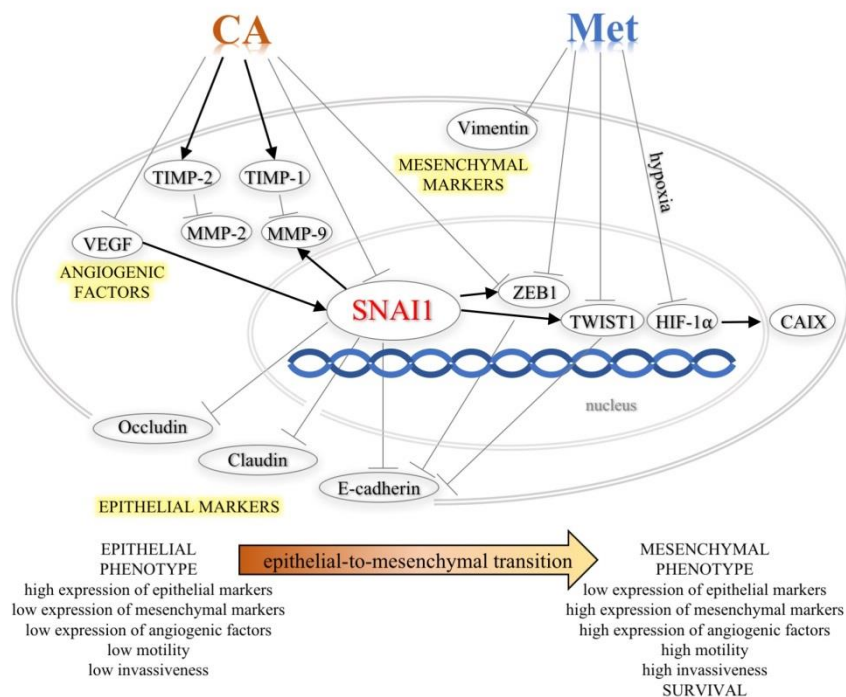
W badaniach za pomocą qPCR określono zmiany w profilu ekspresji genów charakterystycznych dla fenotypu epithelialnego oraz mezenchymalnego. Ilość białka zbadano techniką Western blot. Aktywacja jądrowych czynników transkrypcyjnych Snail-1, ZEB1, TWIST1 i TWIST2, odgrywa zasadniczą rolę w promowaniu cech ułatwiających komórce migrację i inwazję [139]. Wśród tych białek Snail-1 uważany jest za główny, molekularny “włącznik” procesu EMT. W wielu badaniach *in vitro* i *in vivo* wykazano, że hamowanie ekspresji E-kadheryny przez ten czynnik jest głównym procesem, który uruchamia program

EMT w nowotworach [140], także szyjki macicy [137]. Co więcej, wykazano, że u ludzi ekspresja E-kadheryny spada wraz ze stadium/stopniem zaawansowania guza szyjki macicy [132,141].

Wyniki zaprezentowane w pracy **H4** pokazały, że kwas kawowy zahamował progresję metastatycznego fenotypu komórek C4-I, indukowanego przez **TGF- β 1**. Kwas kawowy ograniczył transkrypcję genów kodujących **SNAI-1 (Fig. 5A)**, **TWIST-1** i **ZEB-1 (Fig. 5 B)**, co wzmocniło ekspresję E-kadheryny (**Fig. 4A**) i innych molekuł adhezyjnych, takich jak okludyna (**OCLN**) i kładyna 1 (**CLDN1**) (**Fig. 4B**). Przywróceniu wysokiej ekspresji E-kadheryny towarzyszył spadek mobilności komórek, co wykazano za pomocą funkcjonalnego testu rysy (**H4, Fig. 2 A,B**). Yang i wsp. [44] wykazali, że kwas kawowy zahamował zdolność do migracji i zwiększył adhezję złośliwych ludzkich keratynocytów. Czynniki Snail-1 uczestniczył w mechanizmie tego rodzaju oddziaływania. Dalsze badania wykazały, że kwas kawowy zwiększył ekspresję molekuł adhezyjnych, w tym E-kadheryny, oraz spowodował spadek ekspresji markerów mezenchymalnych [44].

Czynnik transkrypcyjny **Snail-1** aktywuje ekspresję **metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej MMP-2** (ang. *Matrix Metalloproteinase-2*) oraz **MMP-9** (ang. *Matrix Metalloproteinase-9*), enzymów degradujących białka strukturalne tkanek i promujące inwazję komórek nowotworowych [142,143]. Wykazano pozytywną korelację nadekspresji MMP-9 ze zdolnościami inwazyjnymi złośliwych nowotworów jajników i piersi, co więcej ustalono, że istnieje związek pomiędzy nadmierną ekspresją tego enzymu i krótkim okresem przeżycia u pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem [144]. Dotychczas opublikowano wyniki badań, w których kwas chlorogenowy wykazywał zdolność do hamowania funkcji MMP-9 w krótkim terminie [145]. Otrzymane wyniki ujawniły, że kwas kawowy powoduje inhibicję transkrypcji, zarówno **MMP-2**, jak i **MMP-9**. Co więcej, związek ten wpływał hamująco na metaloproteinazę MMP-9 poprzez dwa niezależne mechanizmy - inhibicję ekspresji **SNAIL** oraz przez pobudzenie ekspresji genu kodującego tkankowy inhibitor **TIMP-1**, kontrolujący negatywnie aktywność degradacyjną enzymu (**Rycina 3**). Należy podkreślić, że Snail-1 jest czynnikiem transkrypcyjnym, regulującym ekspresję wielu białek, oraz poprzez różne mechanizmy kontrolujące procesy, takie jak proliferacja, oporność na apoptozę oraz angiogeneza [137]. Dlatego obniżenie transkrypcji **SNAIL**, wywołane w komórkach C4-I, przez kwas kawowy; prawdopodobnie dodatkowo przyczynia się do efektu anty-proliferacyjnego. W nowotworach endometrium wykazano również, że nadekspresja **Czynnika Wzrostu Śródbłonna Naczyń A** (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor A, VEGFA*) promuje angiogenezę [146]. VEGFA jest czynnikiem aktywnie pobudzającym rozwój naczyń krwionośnych, które następnie zaopatrują komórki nowotworowe w tlen i składniki pokarmowe; w ten sposób, proces nasilonej angiogenezy w guzie, promuje wzrost guza oraz zapewnia komórkom nowotworowym drogę do zasiedlania nowych tkanek [147]. W komórkach raka piersi, VEGFA powoduje wzrost ekspresji **SNAIL**, co skutkuje hamowaniem syntezy E-kadheryny [148]. Wyniki zaprezentowane w artykule **H4** pokazują, że w komórkach RSM, ograniczenie ekspresji VEGFA, działaniem kwasu kawowego, może się także przyczynić do blokowania ekspresji **SNAIL** (**H4, Fig. 6**). Dalsze, bardziej precyzyjne badania, pozwolą na dokładniejsze scharakteryzowanie potencjalnego,

molekularnego mechanizmu anty-angiogennego oddziaływania kwasu kawowego w nowotworach szyjki macicy.



Rycina 3. Metformina i kwas kawowy hamują białka regulatorowe procesu EMT indukowanego cytokiną TGF- β 1 w komórkach raka szyjki macicy (\uparrow aktywacja, \downarrow hamowanie) (Fig. 9 z publikacji **H4**).

Ostatnie doniesienia wskazują, że metformina hamuje proces EMT w komórkach nowotworu piersi, płuc oraz szyjki macicy, w szczególności poprzez wpływ na ekspresję E-kadheryny. Ekspozycja tych linii nowotworowych na metforminę ograniczała, w znacznym stopniu, ich potencjał metastatyczny [134,135,136]. Wyniki zaprezentowane w artykule **H4** wykazały, że w linii komórek HTB-35 o agresywnym fenotypie i zdolności do ruchu, metformina hamowała ekspresję białka - wimentyny, markera charakterystycznego dla komórek mezenchymalnych. Inkubacja tych komórek z lekiem, obniżała ich ruchliwość, co wykazano za pomocą testu rysy (**Fig. 3 A,B**). Laskov i wsp. [141] opisali, w jednym z najnowszych artykułów, że metformina hamuje ekspresję wimentyny w komórkach raka endometrium, zarówno *in vitro* oraz *in vivo*, u pacjentów z cukrzycą II typu [141].

Przeprowadzone eksperymenty (**H4**), miały również na celu sprawdzenie efektów oddziaływania metforminy w komórkach RSM w warunkach niedotlenienia. Jak wykazano, w nowotworach szyjki macicy, hipoksja i towarzysząca jej nadmierna synteza mleczanów, prowadząca do zakwaszenia środowiska, może stwarzać warunki dogodne do szybkiego rozprzestrzeniania się komórek raka w tkance [149,150]. W tych warunkach, następuje aktywacja HIF-1 α oraz Anhidrazy Węglanowej IX (ang. *Carbonic anhydrase IX*, **CAIX**) - enzymu, którego transkrypcja kontrolowana jest przez czynnik HIF-1 α . Dzięki aktywności

CAIX, regulującej pH wewnątrz komórek złośliwych nowotworów, komórki te chronione są przed skutkami nadmiernego zakwaszenia w środowisku i zyskują przewagę adaptacyjną nad prawidłowymi komórkami tkanek, które nie posiadają takiej ochrony [151].

Biorąc pod uwagę istotną rolę, jaką odgrywa CAIX w inwazji komórek nowotworowych, regulacja tego enzymu może być w przyszłości wykorzystana w celach terapeutycznych, również w leczeniu RSM [152]. Wyniki zaprezentowane w artykule **H4** pokazują, że ekspozycja komórek HTB-35 na metforminę w warunkach hipoksji, zahamowała ekspresję *HIF-1 α* i obniżyła ilość transkryptu dla CAIX (**Fig. 8 B,C; Fig 9**), osłabiając zdolności tej linii komórek nowotworowych do inwazji.

Wnioski z tej części badań

1. W wyniku **aktywacji EMT**, transformujące komórki nabłonkowe nabywają zdolności do aktywnej **migracji i przerzutowania**. Ustalono, że komórki **C4-I** mają **epitelialny fenotyp** i prawidłowo rozwijają **proces EMT** pod wpływem **stymulacji cytokiną TGF- β 1**.
2. **Niestymulowane** komórki **HTB-35** wykazują **cechy** typowe dla komórek **mezenchymalnych**.
3. Zarówno **metformina**, jak i **kwaskawowy**, poprzez regulację specyficznych, molekularnych mechanizmów i białek kontrolujących implementację programu EMT, ograniczały **zdolności** komórek RSM **do ruchu**, co wykazano za pomocą **funkcjonalnego testu rysy**.
4. **Kwaskawowy** w komórkach **C4-I** hamował ekspresję genu *SNAI1*, kodującego czynnik transkrypcyjny, kontrolujący ekspresję **markerów epitelialnych** - takich jak **E-kadheryna, okludyna i kładyna**.
5. W komórkach **C4-I** stwierdzono spadek ekspresji **metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9**, po zastosowaniu **kwaskawowego**. Zidentyfikowano **dwa niezależne mechanizmy supresji MMP-9**; a) poprzez inhibicję transkrypcji *SNAI1*, b) zwiększonej ekspresji *TIMP-1* - specyficznego inhibitora MMP-9.
6. W komórkach **HTB-35**, zarówno **stymulowanych**, jak i **nie stymulowanych** cytokiną TGF- β 1, **metformina** spowodowała obniżenie ekspresji głównego **markera mezenchymalnego - wimentyny**.
7. W warunkach **hipoksji**, metformina hamowała proces transkrypcji *CAIX* -enzymu wykazującego działanie **pro-przeżyciowe**, na komórki metastatyczne o **agresywnym fenotypie**.

Aspekt nowości i znaczenie badań

Metformina i **kwaskawowy** powodują **zahamowanie implementacji programu EMT** w ludzkich komórkach RSM, działając przez **niezależne procesy i cele molekularne**. W artykule **H4** po raz pierwszy doniesiono, że kwaskawowy (również działając łącznie z metforminą), **hamuje progresję mezenchymalnego fenotypu komórek RSM** oraz ich **zdolność do ruchu**, stymulowanego cytokiną TGF- β 1.

Po raz pierwszy zaprezentowano wyniki eksperymentów, dowodzące, że w warunkach hipoksji, **metformina hamuje ekspresję CAIX** - enzymu umożliwiającego **adaptację i przetrwanie** złośliwych komórek nowotworowych.

Ze względu na rolę, jaką odgrywa CAIX w promocji zdolności migracyjnych komórek nowotworowych, enzym ten wskazano jako **potencjalny cel dla terapii przeciwnowotworowych**, również w **raku szyjki macicy**. W tym kontekście, aktywność **metforminy, hamującej inwazyjne właściwości komórek RSM**, powinna być uwzględniona w planowaniu nowych strategii terapeutycznych w RSM.

- **określenie potencjału metforminy oraz kwasu kawowego do wzmacniania działania przeciwnowotworowego cisplatyny, poprzez regulację cyklu komórkowego w komórkach RSM (publikacje H2, H3)**

Przebieg cyklu komórkowego podlega precyzyjnej kontroli przez liczne mechanizmy i białka regulatorowe, takie jak produkty genów supresorowych i onkogenów, cykliny i kinazy zależne od cyklin (ang. *cyclin-dependent kinases*, CDKs). **Mechanizmy kontrolne** mogą zatrzymać cykl w określonych punktach przebiegu (ang. *checkpoints*) i zahamować podziały komórkowe. W szczególności, punkt kontrolny fazy G1/S zapobiega replikacji DNA, jeśli wystąpiły uszkodzenia w strukturze kwasu nukleinowego. Natomiast punkt kontrolny fazy G2/M nie pozwala na segregację uszkodzonych chromosomów do komórek potomnych, podczas podziału mitotycznego komórki [153]. Zaburzenia funkcji mechanizmów kontrolujących cykl komórkowy w nowotworach może skutkować omijaniem punktów kontrolnych i przetrwaniem komórek nawet w niesprzyjających warunkach środowiskowych [154]. Farmakologiczna aktywacja punktów kontrolnych umożliwia zatrzymanie cyklu i eliminację komórki na drodze apoptozy [155]. Wykazano, że poprzez modulację aktywności białek regulujących przebieg cyklu komórkowego można wpływać na tempo proliferacji komórek nowotworowych, a niektóre z tych białek wskazano jako cele terapeutyczne o istotnym znaczeniu dla terapii przeciwnowotworowych [122,155,156].

Jedno z takich podejść terapeutycznych, zakłada zastosowanie związków małowcząsteczkowych, do specyficznego blokowania przebiegu cyklu komórek nowotworowych w **punkcie G2/M**, co skutkuje zatrzymaniem **podziałów komórkowych** komórek nowotworowych. Jak przedstawiono w artykule **H3**; kwas kawowy i metformina, stosowane pojedynczo i łącznie, zahamowały cykl komórkowy linii HTB-34 w punkcie G2/M; **Fig 1G** prezentuje uzyskane wyniki - największą populację komórek, w których stwierdzono zatrzymanie cyklu, w hodowli inkubowanej z kwasem kawowym oraz kwasem kawowym i metforminą (**H3**). Wcześniejsze doniesienia wskazały, że kwas kawowy może indukować blokadę cyklu komórkowego w linii komórek nowotworowych raka piersi w fazie G1 [109]. Murad i wsp. [46] wykazali, że kwas kawowy, poprzez wpływ na regulację cyklu ludzkich komórek gruczołakoraka, zahamował żywotność tych komórek i indukował w nich apoptozę [46]. Badania Kuo i wsp. [48] pokazały, że ester fenetylowy kwasu kawowego (ang. *Caffeic Acid Phenethyl Ester*, CAPE), związek pochodny tego kwasu fenolowego, ograniczał proliferację komórek raka płaskonabłonkowego, poprzez zahamowanie cyklu w fazie G1 i G2/M, co skutkowało aktywacją apoptozy [48]. Wyniki uzyskane w toku realizacji badań

opisanych w artykule **H3**, wykazały potencjał kwasu kawowego do regulacji cyklu komórek RSM linii HTB-34 o cechach epitelialnych.

Badania nad cyklem komórkowym nowotworów ujawniły, że w określonych przypadkach, przebieg tego cyklu może przyjmować szczególny charakter. Komórki nowotworowe mogą zaprzestać podziałów i z fazy G1 przejść **do fazy stacjonarnej (faza spoczynku, faza G0; ang. *quiescent state*)**, co z kolei wpływa na wynik terapii z zastosowaniem leków anty-mitotycznych - na przykład chemioterapii z cisplatyną. Populacja komórek w fazie stacjonarnej, w guzach litych, może łatwiej przetrwać leczenie niż komórki nowotworowe ulegające aktywnym podziałom. Po zakończeniu terapii, może być ona źródłem wznowy nowotworowej.

Do zwalczania komórek w fazie spoczynkowej powinny być zatem zaangażowane specyficzne mechanizmy, w szczególności kontrolujące przejście pomiędzy fazami G0 i G1. Poznanie funkcjonowania punktów kontrolnych umożliwia wykorzystanie mechanizmów regulacji cyklu komórkowego, jako celu dla nowatorskich strategii terapeutycznych w leczeniu chorób nowotworowych. Takie podejście terapeutyczne może być uwzględnione np. przy połączeniu radioterapii bądź chemioterapii z małowzrostowymi modulatorami punktów kontrolnych, zdolnych do „uczulania” komórek nowotworowych na działanie czynników terapeutycznych - poprzez kierowanie komórek z fazy G0 na powrót do cyklu komórkowego (G1) [153,172]. Wykazano, że właściwie zaplanowana terapia kombinowana, z uwzględnieniem tych procesów, może bardziej efektywnie eliminować komórki nowotworowe, niż zastosowanie jednego leku lub kombinacji leków przeciwnowotworowych [154,155,157]. Należy podkreślić, że strategia terapeutyczna, której celem jest regulacja kontroli cyklu komórkowego, powinna charakteryzować się selektywnością działania względem komórek nowotworowych [158].

Interesującego przeglądu ostatnio zaproponowanych przeciwnowotworowych reżimów terapeutycznych, uwzględniających specyfikę regulacji cyklu komórek nowotworowych, dokonali O'Leary i wsp. [153]. W zwalczaniu nowotworów złośliwych RSM; lek zatrzymujący podziały komórkowe - paklitaksel, zastosowano wraz z cisplatyną dla wzmacniania efektu cytotoksycznego cisplatyny [7]. Wyniki kilku badań wykazały, że metformina również może modyfikować postęp cyklu komórkowego w punkcie kontrolnym G0/G1. W wyniku tej regulacji, komórki nowotworowe kierowane są na drogę śmierci apoptotycznej [159,160,161]. Dalsze badania ujawniły, że efekt uszkodzenia komórek; poprzez wpływ na przebieg ich cyklu życiowego, działaniem metforminy, jest specyficzny dla komórek nowotworowych. Lek nie uszkadza populacji komórek prawidłowych [162], co potwierdziło również w badaniach *in vivo* z wykorzystaniem modeli heterogenicznych przeszczepów guzów u zwierząt (ang. *xenograft models*) [34].

Podejmowano również próby zastosowania kwasu kawowego dla **wzmocnienia efektu cytostatyku** w zwalczaniu nowotworów. Przykładem są niedawno opublikowane wyniki badań Koraneekit'a i wsp. [51] oraz Sirota'y [52], w których wykazano, że kwas kawowy może w znaczący sposób wzmocnić działanie **cisplatyny**, jako istotny składnik terapii kombinowanych. W badaniach Xia i wsp. [163] wykazano, że jednoczesne zastosowanie

metforminy z nelfinawirem, spowodowało zatrzymanie cyklu w punkcie kontrolnym G2/M i aktywację apoptozy komórek HTB-35, przeszczepionych u myszy.

Biorąc pod uwagę, że zarówno metformina, jak i kwas kawowy mogą regulować przebieg cyklu komórkowego nowotworów, zbadano potencjał obu związków dla zwiększania efektywności oddziaływania cisplatyny w linii komórek HTB-35 w RSM o agresywnym fenotypie. Wyniki zaprezentowane w artykule **H2** pokazują, że łączne zastosowanie metforminy i kwasu kawowego wpłynęło na zmianę przebiegu cyklu komórkowego, co skutkowało zwiększeniem efektu toksycznego cisplatyny na komórki HTB-35. W badaniach wpływu badanych związków na rozkład poszczególnych faz cyklu, w populacji eksponowanych komórek, zastosowano różnicowanie komórek przeciwciałem Ki-67, sprzężonym z fluorochromem oraz barwnik fluorescencyjny DAPI (4',6-diamidyno-2-fenylindol). Procedurę opisano w sekcji *Materiały i Metody* artykułu **H2**. Do analizy rozkładu poszczególnych faz cyklu, wykorzystano technikę cytometrii przepływowej [113]. Eksperymenty wykazały, że łączne zastosowanie cisplatyny, metforminy i kwasu kawowego, wywołały największe zmiany w regulacji przebiegu cyklu komórkowego, w porównaniu do efektu wywołanego zarówno przez każdy ze związków zastosowany pojedynczo, jak i przez łączne zastosowanie tylko dwóch związków (cisplatyna – metformina, cisplatyna - kwas kawowy, **H2 Fig 7**). Inkubacja z trzema związkami, spowodowała wejście komórek z fazy stacjonarnej (G0) na powrót do cyklu, oraz zatrzymanie w fazie G1 (G0 5,4% vs. G1 60,7%). Odsetek komórek w fazie G0 w pozostałych grupach nie uległ tak znaczącemu spadkowi.

W hodowlach eksponowanych na związki wykonano analizę wpływu zastosowanego leczenia na przetrwanie komórek, która wykazała, że łączne zastosowanie cisplatyny, metforminy i kwasu kawowego, najbardziej znacząco obniżyło proliferację komórkową - wśród wszystkich badanych grup. Zatem metformina i kwas kawowy wykazują zdolność do uczulania komórek HTB-35 na działanie cisplatyny (**H2 Fig 5 A,B**). Terapia z zastosowaniem trzech związków, selektywnie eliminowała komórki nowotworowe z kokultury z komórkami prawidłowymi (**H2 Fig 6 A,B,C**). Na podstawie przedstawionych danych można wnioskować, że inkubacja komórek RSM z metforminą i kwasem kawowym, powoduje, że komórki te stają się bardziej wrażliwe na działanie cisplatyny.

Wnioski z tej części badań

1. Wyniki eksperymentów prezentowanych w artykule **H2** wykazały, że **regulacja progresji cyklu komórkowego poprzez łączne zastosowanie metforminy i kwasu kawowego**, hamuje **przeżywanie i wzrost** komórek.
2. W komórkach RSM o cechach **epitelialnych** oba związki mogą specyficznie **regulować przebieg cyklu poprzez punkt kontrolny G2/M**.
3. W **agresywnej linii HTB-35**, zastosowanie **metforminy i kwasu kawowego** wraz z **cisplatyną**, wzmocniło **cytotoksyczny efekt cisplatyny** w stosunku do **komórek stacjonarnych**. Mechanizm tego działania polegał na przejściu z fazy **G0** do **G1** w cyklu komórkowym.

4. **Kombinacja metforminy i kwasu kawowego z cisplatyną** spowodowała w komórkach RSM, nie tylko dramatyczny **spadek populacji komórek w fazie G0**, ale także znacząco **zmniejszyła przeżycie komórek nowotworowych**.

Aspekt nowości i znaczenie badań

Wiadomo, że terapia raka szyjki macicy z zastosowaniem **cisplatyny**, nie zawsze prowadzi do całkowitej eliminacji komórek nowotworowych, ponieważ populacja komórek w **fazie stacjonarnej** może wykazywać **brak wrażliwości** na leczenie. Rozwiązaniem problemu może być **zastosowanie precyzyjnie zaplanowanej strategii**, w której efekt leczenia **cytostatykiem** zostanie **wzmocniony działaniem specyficznych modulatorów cyklu komórkowego**.

Wyniki zaprezentowane w pracy **H2**, po raz pierwszy wykazały, że **metformina i kwas kawowy, poprzez regulację cyklu komórkowego**, mogą **uwrażliwiać** populację komórek HTB-35 o agresywnym fenotypie, na **cytotoksyczne działanie leku** i tym samym **wspierać efekt działania cisplatyny**.

- **Charakterystyka efektu antyproliferacyjnego metforminy, kwasu kawowego i cisplatyny. Specyficzność oddziaływania tych związków względem komórek nowotworowych w kokulturze z ludzkimi komórkami prawidłowymi - fibroblastami** (publikacja **H2**)

Guzy nowotworowe w tkankach, otoczone są przez prawidłowe komórki, które syntetyzują i wydzielają do środowiska, składniki macierzy pozakomórkowej oraz cytokiny. Coraz więcej dowodów wskazuje, że **mikrośrodowisko** może w znaczący sposób wpływać na funkcje komórek nowotworowych oraz skuteczność terapii przeciwnowotworowych [164]. Także rozwój nowotworu może w znaczącym stopniu zależeć od dwukierunkowej komunikacji z komórkami sąsiadującymi. Wykazano, że w procesie inicjacji i formowania raka z komórek epitelialnych, istotną rolę odgrywają **fibroblasty** zrębu komórkowego [165]. Fibroblasty stanowią też najliczniejszą grupę komórek w tkankach otaczających guz. Wyniki badań wskazują, że komórki fibroblastów towarzyszących nowotworom, mogą zmienić swoje funkcjonowanie i wspierać proliferację, procesy angiogenezy oraz inwazji komórek nowotworowych [166]. Fibroblasty zrębu komórkowego mogą bezpośrednio wspomagać metaboliczną adaptację komórek nowotworowych, do warunków stresu wynikającego z ograniczonej podaży składników odżywczych lub stężenia tlenu w środowisku [166,167]. Komórki fibroblastów mogą nawet dostarczać substratów do wzrostu i produkcji związków wysokoenergetycznych dla nowotworów. Zjawisko metabolicznego wspierania nowotworu, nazwano „odwrotnym efektem Warburga” (ang. „*reverse Warburg effect*”) [167,168]. Orecchioni i wsp. [169] zastosowali ostatnio metforminę i fenforminę do hamowania progresji komórek raka piersi, w terapii nakierowanej nie tylko na eliminację komórek nowotworowych, lecz również uwzględniającą specyficzną rolę komórek prawidłowych, towarzyszących nowotworom. Z drugiej strony; w eksperymentach z zastosowaniem różnych komórek mikrośrodowiska nowotworowego wykazano, że komórki prawidłowych fibroblastów, poprzez liczne mechanizmy, mogą także hamować wzrost komórek neoplastycznych [170].

Biorąc pod uwagę wzajemne interakcje pomiędzy komórkami nowotworu a komórkami zrębu, efekt oddziaływania komórek towarzyszących nowotworowi, powinien być brany pod uwagę w planowaniu leczenia. Ostatnie doniesienia wskazują, że **efektywność terapii przeciwnowotworowych** może się znacząco zmienić pod wpływem specyficznego mikrośrodowiska [171]. Należy wykluczyć możliwość metabolicznego wspierania nowotworów przez komórki fibroblastów, ponieważ taki efekt może skutkować zmniejszeniem wrażliwości komórek neoplastycznych na leczenie [167,172]. Mając powyższe na względzie, zbadano wpływ mikrośrodowiska nowotworu na skuteczność leczenia. W kolejnym etapie, należało określić efekt terapeutyczny zastosowania cisplatyny, metforminy i kwasu kawowego, w kokulturze z prawidłowymi fibroblastami ludzkimi.

Celem eksperymentów zaprezentowanych w artykule **H2**, było zbadanie, czy komórki mikrośrodowiska mogą wpłynąć protekcyjnie na komórki nowotworowe i osłabić efekt terapeutyczny cisplatyny. Warunki wspólnej hodowli komórek prawidłowych i nowotworowych, opisano w rozdziale *Materiały i Metody* w artykule **H2**. W eksperymentach zastosowano linię ludzkich fibroblastów BJ oraz zmodyfikowane komórki HTB-35 (SiHa *GFP*⁺)*, do których wprowadzono gen dla białka fluorescencyjnego GFP (ang. *Green Fluorescent Protein*). Linię komórek SiHa *GFP*⁺ wykorzystano za zgodą Pana Profesora Marcina Majki, Kierownika Zakładu Transplantologii Wydziału Lekarskiego UJ CM w Krakowie, a badania przeprowadzono we współpracy z Panem Dr. Tomaszem Adamusem z tej jednostki. W eksperymentach badano zmianę procentowej ilości komórek SiHa *GFP*⁺ w kokulturach poddanych inkubacji indywidualnie z badanymi związkami: metforminą i kwasem kawowym oraz z cisplatyną. Przeprowadzono eksperymenty z dwoma związkami jednocześnie (w każdym wariancie), oraz łącznie z trzema związkami. Do pomiaru i analizy emisji fluorescencji GFP, zastosowano technikę cytometrii przepływowej. Największy spadek ilości komórek stwierdzono w kokulturze poddanej 72 godzinnej ekspozycji; łącznie na cisplatynę, metforminę i kwas kawowy (**Fig 6A**). Jednocześnie wykazano, że to komórki nowotworowe, a nie fibroblasty, są eliminowane z hodowli (**Fig 6B**). Wynik ten potwierdzono drugą, niezależną metodą - z zastosowaniem mikroskopii fluorescencyjnej (**Fig 6C**).

Można zatem stwierdzić, że nawet w warunkach kokultury z fibroblastami; metformina i kwas kawowy uwrażliwiały komórki nowotworowe na działanie cisplatyny. Wyniki eksperymentów, uwzględniających wpływ komórek mikrośrodowiska, na przebieg terapii cisplatyną (zaprezentowane w artykule **H2**), jednoznacznie dowodzą, że to komórki nowotworowe, w przeciwieństwie do prawidłowych, były specyficznym eliminowane z kokultury.

* W artykule **H2** wykorzystano nazwę "SiHa" w stosunku do linii HTB-35, należy zwrócić uwagę, że obie nazwy są poprawne i równorzędne, zgodnie z terminologią zalecaną przez ATCC.

Wnioski z tej części badań

1. **Mikrośrodowisko nowotworu** może w znaczący sposób wpłynąć na **przeżycie komórek nowotworowych**, a nawet **wspierać ich wzrost**.

2. Wykonane eksperymenty, z zastosowaniem **kokultury komórek prawidłowych i nowotworowych**, wykazały, że **metformina i kwas kawowy** zastosowane w tych warunkach, **uwrażliwiają komórki RSM na działanie cytostatyku** – również w warunkach specyficznego otoczenia wytworzonych przez **fibroblasty**.

3. **Metformina i kwas kawowy**, wykazują działanie **specyficzne** względem **komórek nowotworowych** i to właśnie komórki HTB-35, w przeciwieństwie do fibroblastów, są **eliminowane ze wspólnej hodowli**, pod wpływem badanych związków.

Aspekt nowości i znaczenie badań

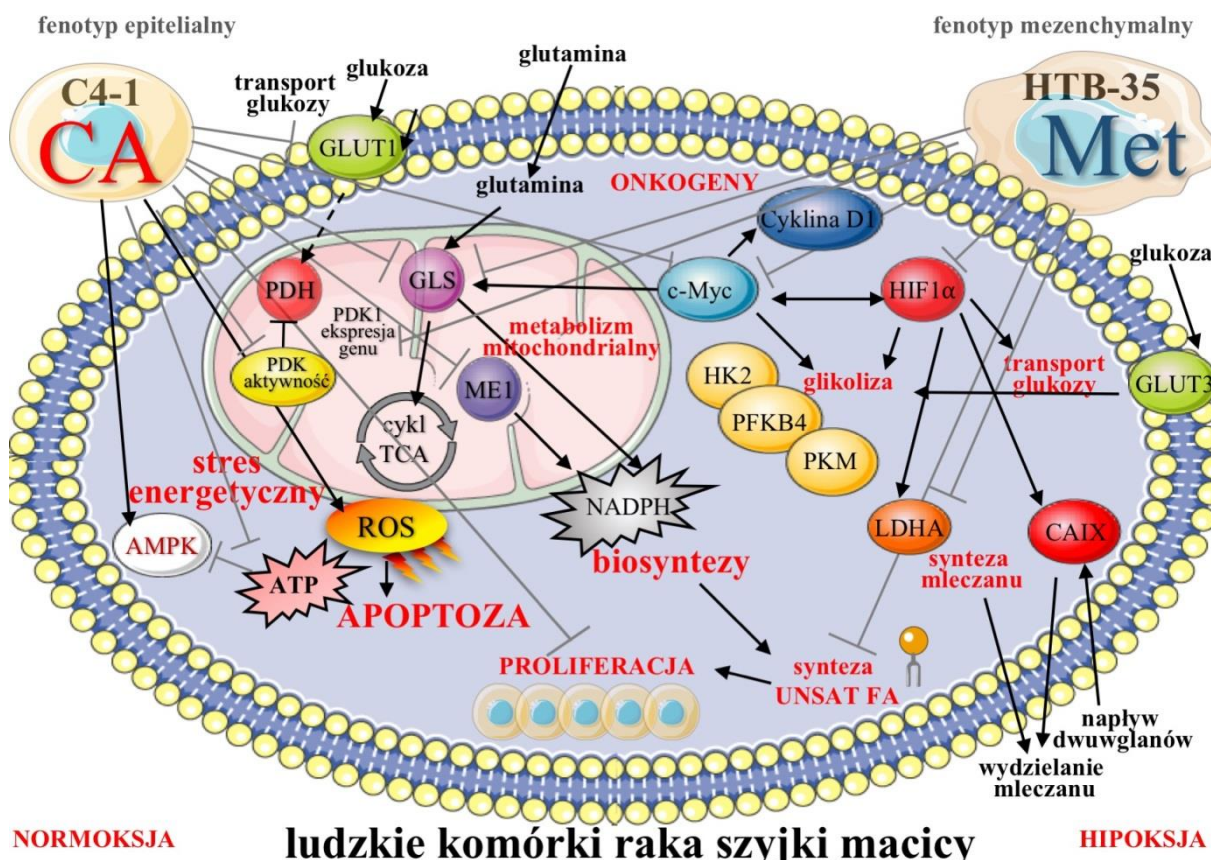
Coraz więcej wyników badań wskazuje na niezwykle istotną rolę, jaką odgrywa **mikrośrodowisko nowotworu w efektywności terapii przeciwnowotworowych**. Dlatego też, w procesie badania leków dla terapii przeciwnowotworowych, powinno się uwzględniać **wpływ specyficznego otoczenia komórek nowotworowych**. Zaprezentowane wyniki badań, po raz pierwszy wykazały, że **łączone zastosowanie cisplatyny, metforminy i kwasu kawowego, uwrażliwia komórki nowotworowe na działanie chemioterapeutyku**, a ekspozycja **kokultury** na działanie tych czynników, skutkuje **selektywnym usunięciem z hodowli jedynie komórek nowotworowych**.

4. Podsumowanie

Obecnie prowadzone są intensywnie badania nad **poszukiwaniem nowych, molekularnych celów dla terapii przeciwnowotworowych**. Znacząca część eksperymentów koncentruje się na badaniu molekularnych mechanizmów regulacji przemian energetycznych, biosyntezy oraz ścieżek transdukcji sygnału, leżących u podstaw reprogramowania metabolicznego nowotworów. Badania będące przedmiotem habilitacji wykazały, że metformina, poprzez wpływ na funkcję onkogenów i czynników transkrypcyjnych, hamuje aktywność białek regulujących glikolityczny fenotyp komórek RSM o agresywnych cechach, co w konsekwencji prowadzi do śmierci tych komórek. Regulacja zasilania cyklu kwasów trikarboksylowych, działaniem kwasu kawowego, skutkuje nadmierną produkcją wolnych rodników i aktywacją apoptozy w epitelialnych komórkach RSM. Łączne zastosowanie metforminy i kwasu kawowego hamuje proliferację komórek nowotworowych; jednym z mechanizmów leżących u podstaw tego procesu jest blokowanie syntezy *de novo* nienasyconych kwasów tłuszczowych.

Podjęcie terapeutyczne uwzględniające **kilka niezależnych mechanizmów molekularnych** jest **zgodne z najnowszymi tendencjami** w opracowywaniu strategii przeciwnowotworowych. **Terapie kombinowane** stosowane są już z powodzeniem w leczeniu chorób nowotworowych u ludzi. **Badania zaprezentowane w artykułach H1-H5, stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego, włączają się w ten trend badań nad możliwościami zwalczania nowotworów**. W badaniach zaprezentowanych w niniejszym autoreferacie wykazano, że zastosowanie metforminy w połączeniu z kwasem kawowym, może przyczynić się do **zwiększenia skuteczności przeciwnowotworowego działania cytostatyku - cisplatyny**. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że metformina i kwas kawowy mogą osłabiać zdolności inwazyjne RSM, poprzez regulację epitelialnych i mezenchymalnych markerów komórkowych. **Uwzględniając specyfikę tkankowego**

pochodzenia nowotworu, oraz stadium jego rozwoju, można, na poziomie molekularnym, bardziej precyzyjnie ukierunkować procesy o krytycznym znaczeniu dla przeżycia komórki. Uzyskane dane poszerzają wiedzę o komórkach RSM w kontekście **fenotypu komórek** i ich **zdolności do migracji**, także wpływu komórek **mikrośrodowiska** na efektywność leczenia.



Rycina 4. Schemat przedstawiający molekularne cele oddziaływania metforminy i kwasu kawowego oraz mechanizmy regulowane przez te związki w komórkach raka szyjki macicy (↑ aktywacja, ↓ hamowanie).

Zaprezentowane badania miały na celu poznanie **molekularnych mechanizmów oddziaływania badanych związków, metforminy i kwasu kawowego, w komórkach RSM** i próbę zidentyfikowania ich **potencjalnych celów molekularnych**, z zastosowaniem modelu komórkowego *in vitro*. Bezpośrednie przełożenie uzyskanych wyników na model ludzki, jest z oczywistych względów niemożliwe. Jednak wyniki te mogą pomóc w opracowywaniu **nowoczesnych, precyzyjnie zaplanowanych i efektywnych strategii terapii przeciwnowotworowych**, oraz w wyznaczeniu nowych kierunków w projektowaniu i modyfikacji istniejących cząsteczek, także poprawy **skuteczności** ich działania. Ze względu na oporność nowotworów na leczenie, obecnie kładzie się nacisk na **precyzyjne celowanie terapii na poziomie molekularnym**, w szczególności na zastosowanie łącznie kilku czynników, z których każdy wpływa na określony mechanizm działania przeciwnowotworowego, przy jednoczesnym zwiększeniu specyficzności i selektywności oddziaływania na komórki nowotworowe.

Wprowadzenie badań przesiewowych i szczepień przeciwko wirusowi brodawczaka ludzkiego (HPV), spowodowało skuteczniejsze rozpoznanie raka szyjki macicy u kobiet, jednakże śmiertelność z powodu choroby jest nadal bardzo wysoka - w Polsce i na świecie. Chemioterapia z użyciem cytostatyku – **cisplatyny**, jest powszechnie stosowana w leczeniu RSM, jednak charakteryzuje się ona **wysoką toksycznością i niską specyficnością działania**. Ponadto, u pacjentów często rozwija się **oporność na leczenie**. Niewielka ilość innowacyjnych terapii, testowanych obecnie w badaniach klinicznych, dodatkowo skłania do poszukiwania nowych rozwiązań i poprawy istniejących strategii terapeutycznych w RSM; szczególnie w kontekście **wysokich kosztów terapii przeciwnowotworowych**. Próby zastosowania **dostępnych cząsteczek o relatywnie niskiej toksyczności, dla wspierania i/lub łagodzenia skutków konwencjonalnych sposobów leczenia** - stają się szczególnie istotne. Biorąc pod uwagę ogromne zainteresowanie w społeczeństwie, stosowaniem fitozwiązków w terapiach u ludzi, niezbędne są wnikliwe i dokładne badania nad ich rzeczywistą aktywnością i potencjalnymi możliwościami zastosowania w lecznictwie. Należy podkreślić, że badania takie stwarzają **perspektywę ścisłej współpracy pomiędzy naukowcami różnych dziedzin, sektorami - farmaceutycznym, medycznym oraz produkcji roślinnej**, w celu pozyskiwania i wykorzystania aktywnych biologicznie cząsteczek.

Podsumowując, przeprowadzone badania pozwoliły na osiągnięcie założonego celu, tj. wykazanie, że badane związki małowcząsteczkowe - **metformina i kwas kawowy, wywierają efekt przeciwnowotworowy na komórki raka szyjki macicy (RSM), oddziałując przez specyficzne cele molekularne, związane z regulacją metabolizmu tych komórek (Rycina 4)**. Wyniki badań, które stanowią podstawę przedstawionego do oceny osiągnięcia naukowego, wykazały, że **każdy z badanych związków, hamuje wzrost komórek nowotworowych poprzez specyficzne mechanizmy. Łączne zastosowanie metforminy i kwasu kawowego uwrażliwia nowotwory na działanie cisplatyny**. Efekt ten jest **specyficzny jedynie dla komórek nowotworowych i nie ulega osłabieniu w środowisku, towarzyszącym nowotworowi komórek prawidłowych**. Przeprowadzone badania przyczyniają się do lepszego zrozumienia procesów regulacji mitochondrialnych ścieżek metabolicznych w komórkach nowotworowych, w kontekście specyfiki fenotypowej tych komórek. Tym samym umożliwią bardziej precyzyjne wykorzystanie regulacji tych procesów, jako **molekularnych celów dla nowych terapii przeciwnowotworowych**.

IV. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowych

1. Aktywność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

Tematyka mojej pracy licencjackiej dotyczyła badań nad drobnoustrojami osadu czynnego, a wyniki zostały opublikowane w trakcie studiów magisterskich (PP3, PP4). Moja praca magisterska była rozwinięciem zainteresowania procesami biochemicznymi u mikroorganizmów, a podczas realizacji zadań badawczych, za pomocą technik mutagenyzy oraz selekcji uzyskałam zmodyfikowane szczepy drobnoustrojów metylotroficznych, które następnie wprowadziłam do biocenozy osadu czynnego i wykorzystałam do usuwania określonych zanieczyszczeń chemicznych ze ścieków przemysłowych. Uzyskane wyniki

badan były podstawą publikacji w czasopismach polskich (D17, D18) oraz anglojęzycznym (A19).

W ramach realizacji pracy doktorskiej w Zakładzie Analityki Biochemicznej Wydziału Farmaceutycznego UJ rozwijałam swoje zainteresowanie biochemią w kierunku biochemii klinicznej. Zajmowałam się problematyką oddziaływania fitozwiązków na metabolizm komórek. Badania prowadzone były z wykorzystaniem komórek pozyskiwanych techniką zamkniętej perfuzji od szczurów. Zastosowanie tego modelu *in vitro*, umożliwiło mi szczegółowe badania nad krótko- i długo-terminowym wpływem związków chemicznych na aktywność białek regulatorowych metabolizmu węglowodanów i lipidów. Wyniki tych eksperymentów stały się podstawą mojej rozprawy doktorskiej oraz publikacji polskojęzycznej (D14) i były prezentowane na konferencjach o zasięgu międzynarodowym i krajowym.

W okresie do uzyskania stopnia doktora mój dorobek naukowy obejmował **9** artykułów oryginalnych i przeglądowych, z których **1** to praca anglojęzyczna w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym z IF oraz **8** artykułów w recenzowanych czasopismach polskojęzycznych. Byłam autorem **7** doniesień (komunikatów) zajazdowych, z czego **5** dotyczy konferencji międzynarodowych, a **2** konferencji krajowych. Suma IF za ten okres to **0,831**; punkty MNiSW =**18**.

2. Aktywność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych na Wydziale Farmaceutycznym UJCM w roku 2004 kontynuowałam badania nad molekularnymi aspektami oddziaływania związków polifenolowych na komórki. W roku 2005 uzyskałam finansowanie ze środków Komitetu Badań Naukowych na realizację własnego projektu zatytułowanego „*Badania molekularnego mechanizmu działania wybranych polifenoli na aktywność kinazy kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (PDH) w zależności dawka-efekt*”. W trakcie realizacji grantu wykazano, że wybrane fitozwiązki regulują aktywność torów metabolicznych poprzez wpływ na określone czynniki transkrypcyjne oraz izoenzymy kinazy PDH, a efekt oddziaływania jest specyficzny tkankowo (publikacje D11 i PP1).

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych, brałam udział jako wykonawca w innych pracach badawczych, m.in. w projekcie „*Opracowanie innowacyjnego leku stosowanego w terapii schorzeń ośrodkowego układu nerwowego (OUN) – schizofrenii, depresji, lęku*” realizowanym w ramach umowy o współpracy naukowo-przemysłowej między Uniwersytetem Jagiellońskim i firmą Adamed Sp. z o.o., współfinansowanym ze środków NCBiR. Od 2008 roku uczestniczyłam w badaniach skринingowych kandydatów na leki w modelu *in vitro* i byłam odpowiedzialna za przygotowanie komórek do badań aktywności związków.

W trakcie realizacji kolejnego projektu „*Kompleksy wanadu – innowacyjne metalofarmaceutyki w leczeniu cukrzycy*”, finansowanego przez Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego (POIG), koordynowałam analizy przeciwcukrzycowej aktywności związków wanadu w modelu komórkowym *in vitro*. Na okres realizacji tego projektu zostałam zatrudniona na Wydziale Chemii UJ, który koordynował prace badawcze. Doświadczenia

zdobyte w trakcie badań wykorzystałam następnie we współpracy z Uniwersytetem Jana Kochanowskiego w Kielcach, które zaowocowały wspólnymi publikacjami (publikacje A10, A11) oraz patentem dotyczącym sposobu wytwarzania nowego związku koordynacyjnego wanadu(IV) o specyficznej aktywności przeciwnowotworowej (patent „*Sposób wytwarzania krystalicznej formy związku koordynacyjnego solwat toluen [diizotiocyjano(bis(3,5-dimetylopirazol-1-ylo)metyloamina oksowanad(IV) i jego zastosowanie do hamowania wzrostu komórek nowotworowych*” przyznany przez Urząd patentowy Rzeczypospolitej Polskiej, zgłoszenie wynalazku nr P.410552, decyzja z dnia 25.02.2019 roku).

Współpraca z Wydziałem Chemii UJ zaowocowała również badaniami nad oddziaływaniem biomateriałów z komórkami, także moją opieką naukową nad stypendystką studium doktoranckiego (mgr. Marzeną Suder). Wyniki tych badań stały się podstawą pracy doktorskiej i były prezentowane na licznych konferencjach o zasięgu międzynarodowym i krajowym.

Kolejne badania realizowałam na stanowisku adiunkta w Zakładzie Radioligandów Katedry Farmakobiologii WF UJ CM, gdzie byłam zatrudniona po zakończeniu projektu POIG na Wydziale Chemii UJ. Uczestniczyłam w analizach funkcji receptorów kanabinoidowych, technikami biologii molekularnej i spektrometrii masowej, w ramach projektu własnego KBN „*Układ endokannabinoidowy mózgu jako obiekt badań nad mechanizmem uzależnienia od kokainy*” wspólnie z Zakładem Toksykologii WF UJ CM (publikacja A16).

Podjęłam współpracę z Katedrą Immunologii Klinicznej UJ CM, gdzie w ramach projektu „*Role of heme oxygenase 1 in emergency granulopoiesis*”, finansowanego przez Fundację Nauki Polskiej, uczestniczyłam w badaniach nad mechanizmem działania cytoprotekcyjnego białka Oksygenazy Hemowej 1 (HO-1) w procesie granulopoezy. W toku realizacji zadań, samodzielnie badałam ekspresję i funkcję receptora dla czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów (GCS-F) w komórkach progenitorowych. Wyniki stanowiły podstawę publikacji A8.

Nawiązałam współpracę naukową z prof. Marcinem Majką, Kierownikiem Zakładu Transplantologii WL UJ CM, która pozwoliła mi na poszerzenie kompetencji w zakresie badań nad mechanizmami kontrolującymi molekularne procesy ekspresji genów w komórkach prawidłowych i nowotworowych, oraz w komórkach macierzystych. Opanowałam szereg technik z zakresu biologii molekularnej. Następnie podjęłam współpracę z Zakładem Biologii Komórki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, w ramach realizacji projektu „*Stem Cell-derived Microvesicles as Carriers of Designer Nucleases for Genome Editing*”, finansowanego przez Fundację Nauki Polskiej, w którym byłam wykonawcą. Projekt ten miał na celu zbadanie potencjału pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (ang. *Extracellular Vesicles*; EVs), wydzielanych przez komórki macierzyste, jako nośników hybrydowych nukleaz do edycji genomu. W toku realizacji projektu, zaangażowana byłam w analizę molekularną tkanek zwierzęcych, pochodzących od zwierząt doświadczalnych, którym przeszczepiono zmodyfikowane pęcherzyki. Wyniki uzyskane w ramach projektu są obecnie opracowywane pod kątem patentu.

Moje zainteresowania regulacją metabolizmu komórek macierzystych na poziomie molekularnym znalazły wyraz we współpracy z Zakładem Biologii Komórki WBiB UJ w realizacji kolejnego projektu „*Wpływ hipoksji na charakterystykę molekularną oraz potencjał biologiczny, w tym zdolność do regeneracji serca, pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez ludzkie indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste*” finansowanym przez Narodowego Centrum Nauki. W ramach realizacji projektu biorę udział w pracach nad charakterystyką molekularną indukowanych pluripotencjalnych komórkach macierzystych (hiPSCs) hodowanych w warunkach hipoksji i normoksji, badaniem procesów proliferacji i apoptozy, a w szczególności w analizach dotyczących wpływu EVs pozyskanych z komórek iPS na metabolizm komórek pierwotnych serca.

Wiedzę z zakresu biochemii, biologii komórki i biologii molekularnej, wykorzystywałam również w badaniu aktywności biologicznej związków pochodzenia roślinnego, składników pokarmowych oraz pierwiastków w ramach wieloletniej współpracy z zespołem Zakładu Bromatologii Wydziału Farmaceutycznego, która znalazła wyraz w opublikowanych wspólnie pracach. W szczególności, tematyka badań dotyczyła aktywności biologicznej roślin kapustnych i kielków tych roślin, hodowanych w różnych warunkach, z dodatkiem mikroelementów (publikacje A1, A2, A3, A17, P1), aktywności biologicznej ekstraktów z szarłatu wyniosłego i kielków tej rośliny (publikacje A6, A7) oraz antyproliferacyjnego oddziaływania ekstraktów z innych roślin jadalnych, na komórki prawidłowe i nowotworowe (publikacje A5, A6, A12, D9, D10) oraz wpływu pierwiastków (w szczególności cynku) na funkcje komórek i tkanek (publikacja A13, D3, D6) i oddziaływania cynku na procesy molekularne w komórce (P1,P2). Badano również przemiany lipidów i węglowodanów w komórkach, w modelach *in vitro* i *in vivo* (A14, D1, D4, D5) Prace badawcze realizowano również z udziałem współpracy międzynarodowej - z prof. Shelą Gorinstein z Uniwersytetu w Jerozolimie oraz prof. Isabel Saraiva de Carvalho z Uniwersytetu w Algarve (Portugalia). Badania dotyczące oddziaływania fitozwiązków, izolowanych z roślin, na komórki prawidłowe i nowotworowe; na poziomie molekularnym, były podstawą wielu projektów statutowych i celowych, zrealizowanych przez grupę badawczą na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM.

W 2017 roku dołączyłam do zespołu Zakładu Bromatologii, gdzie pracuję do chwili obecnej.

W okresie po uzyskaniu stopnia doktora mój dorobek naukowy z wyłączeniem artykułów stanowiących osiągnięcie habilitacyjne obejmuje **37** artykułów oryginalnych i przeglądowych, z których **19** to prace anglojęzyczne w czasopismach o zasięgu międzynarodowym z IF, **18** recenzowanych prac w czasopismach bez IF. Byłam autorem **53** doniesień zajazdowych, z czego **29** dotyczy konferencji międzynarodowych, a **24** konferencji krajowych. Suma IF za ten okres to **40,705**, co odpowiada **520** punktom MNiSW.

Osiągnięcia dydaktyczne oraz w zakresie popularyzacji nauki, zostały przedstawione w załączniku numer 4.

V. Piśmiennictwo

1. Varai H. Trends in Cervical Cancer Research, Nova Biomedical Books, New York, 2007.
1. Barbera L., Thomas, G.R. Management of early and locally advanced cervical cancer. *Semin Oncol.* 2009, 36, 155-69.
2. Ellenson L.H., Wu T.C. Focus on endometrial and cervical cancer. *Cancer Cell.* 2004, 5, 533-8.
3. Steben M., Duarte-Franco E. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. *Gynecol Oncol.* 2007, 107, S2–5.
4. Saslow D., Castle P.E., Cox J.T., Davey D.D., Einstein M.H., Ferris D.G. American Cancer Society Guideline for human papillomavirus (HPV) vaccine use to prevent cervical cancer and its precursors. *CA Cancer J Clin.* 2007, 57, 7–28.
5. Small W Jr, Baco MA, Bajaj A, et al. Cervical cancer: a global health crisis. *Cancer* 2017, 123, 2404–2412.
6. Zhu H., Luo H1., Zhang W., Shen Z., Hu X., Zhu X.. Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer. *Drug Des Devel Ther.* 2016, 10, 1885-95.
7. Bojar I., Cvejić R., Głowacka M.D., Koprowicz A., Humeniuk E., Owoc A. Morbidity and mortality due to cervical cancer in Poland after introduction of the act - National programme for control of cancerous diseases. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2012, 19, 680–685.
8. Cannistra S.A., Bast R.C. Jr, Berek J.S., Bookman M.A., Crum C.P., DePriest P.D., Garber J.E., Koh W.J., Markman M., McGuire W.P. 3rd, Rose P.G., Rowinsky E.K., Rustin G.J., Skates S.J., Vasey P.A., King L. Progress in the management of gynecologic cancer: consensus summary statement. *J Clin Oncol.* 2003, 21, 129s-132s.
9. Dasari S., Tchounwou P.B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014, 740, 364-78. 9.
10. Kumar L., Harish P., Malik P.S., Khurana S. Chemotherapy and targeted therapy in the management of cervical cancer. *Curr Probl Cancer.* 2018, 42, 120-128
11. Long H.J. 3rd. Management of metastatic cervical cancer: review of the literature. *J Clin Oncol.* 2007, 25, 2966–74.
12. Tennant DA1, Durán RV, Gottlieb E. Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2010, 10, 267-77.
13. Luengo A., Gui D.Y., Vander Heiden M.G. Targeting Metabolism for Cancer Therapy. *Cell Chem Biol.* 2017, 24, 1161-1180.
14. Shabbits J.A., Hu Y., Mayer L.D. Tumor chemosensitization strategies based on apoptosis manipulations. *Mol Cancer Ther.* 2003, 2, 805-13.
15. Lodi A., Saha A., Lu X., Wang B., Sentandreu E., Collins M., Kolonin M.G., DiGiovanni J., Tiziani S. Combinatorial treatment with natural compounds in prostate cancer inhibits prostate tumor growth and leads to key modulations of cancer cell metabolism. *NPJ Precis Oncol.* 2017, 1. pii: 18.
16. Zhao Y., Butler EB, Tan M. Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. *Cell Death Dis.* 2013,4, e532.

17. Martínez-Outschoorn U.E., Peiris-Pagés M., Pestell R.G., Sotgia F., Lisanti M.P. Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017, 14, 113-24.
18. Dang. C. Links between metabolism and cancer. *Genes Dev.* 2012, 26, 877-90.
19. Foretz M., Viollet B. Therapy: Metformin takes a new route to clinical efficacy. *Nat Rev Endocrinol.* 2015, 11, 390-2.
20. Viollet B., Guigas B., Sanz Garcia N., Leclerc J., Foretz M., Andreelli F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci (Lond).* 2012, 122, 253-70.
21. Pulito C., Sanli T., Rana P., Muti P., Blandino G., Strano S. Metformin: On Ongoing Journey across Diabetes, Cancer Therapy and Prevention. *Metabolites.* 2013, 3, 1051-1075.
22. Evans J.M., Donnelly L.A., Emslie-Smith A.M., Alessi D.R., Morris A.D. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ.* 2005, 330, 1304-5.
23. Kim H.J., Lee S., Chun K.H., Jeon J.Y., Han S.J., Kim D.J., Kim Y.S., Woo J.T., Nam M.S, Baik S.H., Ahn K.J., Lee K.W. Metformin reduces the risk of cancer in patients with type 2 diabetes: An analysis based on the Korean National Diabetes Program Cohort. *Medicine (Baltimore).* 2018, 97, e0036.
24. Ikhlas S., Ahmad M. Metformin: Insights into its anticancer potential with special reference to AMPK dependent and independent pathways. *Life Sci.* 2017, 185, 53-62.
25. Luo Z, Zang M, Guo W. AMPK as a metabolic tumor suppressor: control of metabolism and cell growth. *Future Oncol.* 2010, 3, 457-70.
26. Takahashi A., Kimura F., Yamanaka A., Takebayashi A., Kita N., Takahashi K., Murakami T. Metformin impairs growth of endometrial cancer cells via cell cycle arrest and concomitant autophagy and apoptosis. *Cancer Cell Int.* 2014, 14, 53.
27. Ma J., Guo Y., Chen S., Zhong C., Xue Y., Zhang Y., Lai X., Wei Y., Yu S., Zhang, J. Metformin enhances tamoxifen-mediated tumor growth inhibition in ER-positive breast carcinoma. *BMC Cancer.* 2014, 14, 172.
28. El-Mir M.Y., Nogueira V., Fontaine E., Averet N., Rigoulet M., Leverve X. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem,* 2000, 275, 223-228.
29. Hardie D.G. Keeping the home fires burning: AMP-activated protein kinase. *J R Soc Interface.* 2018, 15, 138.
30. Hardie D.G., Ross F.A., Hawley S.A. *Chem Biol.* AMP-activated protein kinase: a target for drugs both ancient and modern. 2012, 19, 1222-36.
31. Hwang J.T., Kwon D.Y., Yoon S.H. AMP-activated protein kinase: a potential target for the diseases prevention by natural occurring polyphenols. *N Biotechnol.* 2009, 26, 17-22.
32. Lu C.C., Chiang J.H., Tsai F.J., Hsu Y.M., Juan Y.N., Yang J.S.5, Chiu H.Y. *Int J Oncol.* Metformin triggers the intrinsic apoptotic response in human AGS gastric adenocarcinoma cells by activating AMPK and suppressing mTOR/AKT signaling. 2019, doi: 10.3892/ijo.2019.4704.
33. Zhang J.W., Zhao F., Sun Q.. Metformin synergizes with rapamycin to inhibit the growth of pancreatic cancer in vitro and in vivo. *Oncol Lett.* 2018, 15, 1811-1816.
34. Nitulescu G.M., Van De Venter M., Nitulescu G., Ungurianu A., Juzenas P.3, Peng Q., Oлару O.T., Grădinaru D., Tsatsakis A., Tsoukalas D., Spandidos D.A., Margina D. The Akt pathway in oncology therapy and beyond (Review). *Int J Oncol.* 2018, 53, 2319-2331.

35. Joven J., Rull, Rodriguez-Gallego, Camps, Riera-Borrull, Hernández-Aguilera, Martín-Paredero V., Segura-Carretero A., Micol V., Alonso-Villaverde C., Menéndez J.A. Multifunctional targets of dietary polyphenols in disease: a case for the chemokine network and energy metabolism. *Food Chem Toxicol.* 2013, 51, 267-79 .
36. Forbes-Hernández T.Y., Giampieri F., Gasparri M., Mazzoni L., Quiles J.L., Alvarez-Suarez J.M., Battino M. The effects of bioactive compounds from plant foods on mitochondrial function: a focus on apoptotic mechanisms. *Food Chem Toxicol.* 2014, 68, 154-82.
37. Lee K.W., Bode A.M., Dong Z. Molecular targets of phytochemicals for cancer prevention. *Nat Rev Cancer.* 2011, 11, 211-8.
38. Marín-Aguilar F., Pavillard L.E., Giampieri F., Bullón P., Cordero M.D. Adenosine Monophosphate (AMP)-Activated Protein Kinase: A New Target for Nutraceutical Compounds. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 288.
39. Chiang E.P., Tsai S.Y., Kuo Y.H., Pai M.H., Chiu H.L., Rodriguez R.L., Tang F.Y., Caffeic acid derivatives inhibit the growth of colon cancer: Involvement of the PI3-K/Akt and AMPK signaling pathways. *PLoS ONE*, 2014, 9, e99631.
40. Tsuda S., Egawa T., Ma X., Oshima R., Kurogi E., Hayashi T. Coffee polyphenol caffeic acid but not chlorogenic acid increases 5'AMP-activated protein kinase and insulin-independent glucose transport in rat skeletal muscle. *J Nutr Biochem.* 2012, 23, 1403-9.
41. Naveed M., Hejazi V., Abbas M., Kamboh A.A., Khan G.J., Shumzaid M., Ahmad F., Babazadeh D. FangFang X. Modarresi-Ghazani F. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomed. Pharmacother.* 2018, 97, 67–74.
42. Kabała-Dzik A., Rzepecka-Stojko A., Kubina R., Jastrzębska-Stojko Ż., Stojko R., Wojtyczka R., Stojko J. Migration Rate Inhibition of Breast Cancer Cells Treated by Caffeic Acid and Caffeic Acid Phenethyl Ester: An In Vitro Comparison Study. *Nutrients.* 2017, 9, 1144.
43. Yang Y., Li Y., Wang K., Wang Y., Yin W., Li L. P38/NF-κB/snail pathway is involved in caffeic acid-induced inhibition of cancer stem cells-like properties and migratory capacity in malignant human keratinocyte. *PLoS One.* 2013, 8, e58915.
44. Zhang Z., Wang D., Qiao S., Wu X., Cao S., Wang L., Su X., Li L. Metabolic and microbial signatures in rat hepatocellular carcinoma treated with caffeic acid and chlorogenic acid. *Sci Rep.* 2017, 7, 4508.
45. Murad L., Soares Nda C., Brand C., Monteiro M.C., Teodoro A.J. Effects of caffeic and 5-caffeoylquinic acids on cell viability and cellular uptake in human colon adenocarcinoma cells. *Nutr Cancer.* 2015, 67, 532-42.
46. Kang N.J., Lee K.W., Kim B.H., Bode A.M., Lee H.J., Heo Y.S., Boardman L., Limburg P., Lee H.J., Dong Z. Coffee phenolic phytochemicals suppress colon cancer metastasis by targeting MEK and TOPK. *Carcinogenesis.* 2011, 32,921-8.
47. Kuo Y., Lin H.P., Huo C., Su L.C., Yang J., Hsiao P.H., Chiang H.C., Chung C.J., Wang H.D., Chang J.Y. Caffeic acid phenethyl ester suppresses proliferation and survival of TW2.6 human oral cancer cells via inhibition of Akt signaling. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 8801–8817.

48. Fujita H., Hirose K., Sato M., Fujioka I., Fujita T., Aoki M., Takai Y. Metformin attenuates hypoxia-induced resistance to cisplatin in the HepG2 cell line. *Oncol Lett.* 2019, 17, 2431-2440.
49. Qi X., Xu W., Xie J., Wang Y., Han S., Wei Z., Ni Y., Dong Y., Han W. Metformin sensitizes the response of oral squamous cell carcinoma to cisplatin treatment through inhibition of NF- κ B/HIF-1 α signal axis. *Sci Rep.* 2016, 6, 35788.
50. Koraneekit A., Limpaboon T., Sangka A., Boonsiri P., Daduang S., Daduang J. Synergistic effects of cisplatin-caffeic acid induces apoptosis in human cervical cancer cells via the mitochondrial pathways. *Oncol Lett.* 2018, 15, 7397-7402.
51. Sirota R., Gibson D., Kohen R. The timing of caffeic acid treatment with cisplatin determines sensitization or resistance of ovarian carcinoma cell lines. *Redox Biol.* 2017, 11, 170–175.
52. Ahn C.H., Choi W.C., Kong J.Y., Chemosensitizing activity of caffeic acid in multidrug-resistant MCF-7/Dox human breast carcinoma cells. *Anticancer Res.* 1997, 17, 1913–1917.
53. Matsunaga T., Tsuchimura S., Azuma N., Endo S., Ichihara K., Ikari A. Caffeic acid phenethyl ester potentiates gastric cancer cell sensitivity to doxorubicin and cisplatin by decreasing proteasome function. *Anticancer Drugs.* 2019, 30, 251-259.
54. Motawi T.K., Abdelazim S.A., Darwish H.A., Elbaz E.M., Shouman S.A. Could Caffeic Acid Phenethyl Ester Expand the Antitumor Effect of Tamoxifen in Breast Carcinoma? *Nutr Cancer.* 2016, 68, 435-45.
55. Suganuma M., Saha A., Fujiki H. New cancer treatment strategy using combination of green tea catechins and anticancer drugs. *Cancer Sci.* 2011, 102, 317-323.
56. Vander Heiden M.G., Cantley L.C., Thompson C.B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009, 324, 1029-33.
57. Bost F., Decoux-Poullot A., Tanti J., Clavel S. Energy disruptors: Rising stars in anticancer therapy? *Oncogenesis.* 2016, 5, 1–8.
58. Lipska K.J., Flory J.H., Hennessy S., Inzucchi S.E. Citizen Petition to the US Food and Drug Administration to Change Prescribing Guidelines: The Metformin Experience. *Circulation.* 2016, 134, 1405-1408.
59. Imam T.H. Changes in metformin use in chronic kidney disease. *Clin Kidney J.* 2017, 10, 301-304.
60. Martin-Montalvo A., Mercken E.M., Mitchell S.J., Palacios H.H., Mote P.L., Scheibye-Knudsen M., Gomes A.P., Ward T.M., Minor R.K., Blouin M.J., Schwab M., Pollak M. Zhang Y., Yu Y., Becker K.G., Bohr V.A., Ingram D.K., Sinclair D.A., Wolf N.S., Spindler S.R., Bernier M., de Cabo R. Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat Commun.* 2013, 4, 2192.
61. Auersperg N. Histogenetic behavior of tumors. I. Morphologic variation in vitro and in vivo of two related human carcinoma cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 1969, 43, 151–173.
62. <https://www.lgcstandards-atcc.org>
63. Carlson M.W., Iyer V.R., Marcotte E.M. Quantitative gene expression assessment identifies appropriate cell line models for individual cervical cancer pathways. *BMC Genom.* 2007, 10, 2–13.

64. Xiao X., He Q., Lu C., Werle K.D., Zhao R.X., Chen J., Davis B.C., Cui R., Liang J., Xu Z.X. *Gynecol Oncol.* Metformin impairs the growth of liver kinase B1-intact cervical cancer cells. 2012, 127, 249-55.
65. Cai X., Hu X., Tan X., Cheng W., Wang Q., Chen X., Guan Y., Chen C, Jing X. Metformin Induced AMPK Activation, G0/G1 Phase Cell Cycle Arrest and the Inhibition of Growth of Esophageal Squamous Cell Carcinomas In Vitro and In Vivo. *PLoS One.* 2015, 10, e0133349.
66. Kroon P.A., Clifford M.N., Crozier A., Day A.J., Donovan J.L., Manach C., Williamson G. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am J Clin Nutr.* 2004, 80, 15-21.
67. Surh Y.J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer.* 2003, 3, 768-80.
68. Tapiero H., Tew K.D., Ba G.N., Mathé G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed Pharmacother.* 2002, 56, 200-7.
69. Weinberg S.E., Chandel N.S. Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. *Nat. Chem. Biol.* 2015, 1, 9–15.
70. Nardini M., Cirillo E., Natella F., Scaccini C. Absorption of Phenolic Acids in Humans after Coffee Consumption. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, 5735–5741.
71. Tyring S. Effect of Sinecatechins on HPV-Activated Cell Growth and Induction of Apoptosis. *J Clin Aesthet Dermatol.*, 2012, 5, 34-41.
72. Valae S., Yaghoobi M.M., Shamsara M. Metformin inhibits gastric cancer cells metastatic traits through suppression of epithelial-mesenchymal transition in a glucose-independent manner. *PLoS ONE*, 2017, 12, e0174486.
73. Morgillo F., Sasso F.C., Della Corte C.M., Festino L., Manzo A., Martinelli E., Troiani T., Capuano A., Ciardiello F. Metformin in lung cancer: Rationale for a combination therapy. *Expert Opin. Investig. Drugs* 2013, 22, 1401–1409.
74. Cairns R.A., Harris I.S., Mak T. W. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer.* 2011, 11, 85-95.
75. Ward P.S., Thompson C.B. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell.* 2012, 21, 297-308.
76. DeBerardinis R.J., Lum J.J, Hatzivassiliou G., Thompson C.B. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* 2008, 7, 11-20.
77. Vander Heiden M.G., Cantley L.C., Thompson C.B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009, 324,1029-33.
78. Rodríguez-Enríquez S., Carreño-Fuentes L., Gallardo-Pérez J.C., Saavedra E., Quezada H., Vega A., Marín-Hernández A., Olín-Sandoval V., Torres-Márquez M.E., Moreno-Sánchez R. Oxidative phosphorylation is impaired by prolonged hypoxia in breast and possibly in cervix carcinoma. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010, 42, 1744-51.
79. Moreno-Sánchez R., Marín-Hernández A., Saavedra E., Pardo J.P., Ralph S.J., Rodríguez-Enríquez S. Who controls the ATP supply in cancer cells? Biochemistry lessons to understand cancer energy metabolism. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014, 50, 10-23.
80. Pavlova N.N., Thompson C.B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab.* 2016, 23, 27-47.

81. Stacpoole P.W. Therapeutic Targeting of the Pyruvate Dehydrogenase Complex/Pyruvate Dehydrogenase Kinase (PDC/PDK) Axis in Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2017, 109.
82. Cai Q. The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. *Cancer Lett.* 2015, 356, 2 Pt A, 156-64.
83. Bonnet S., Archer S.L., Allalunis-Turner J., Haromy A., Beaulieu C., Thompson R., Lee C.T., Lopaschuk G.D., Puttagunta L., Bonnet S., Harry G., Hashimoto K., Porter C.J., Andrade M.A., Thebaud B., Michelakis E.D. A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell.* 2007, 11, 37-51.
84. Misra S.K., Ye M., Ostadhossein F. Pan D., Pro-haloacetate Nanoparticles for Efficient Cancer Therapy via Pyruvate Dehydrogenase Kinase Modulation. *Sci Rep.* 2016, 6, 28196.
85. Choi Y.W., Lim I.K. Sensitization of metformin-cytotoxicity by dichloroacetate via reprogramming glucose metabolism in cancer cells. *Cancer Lett.* 2014, 346, 300–308.
86. Maguire T.L., Gammner J.R., Mackey D., Fulton B., Abdulkarim M.S., McMurtry K.C., Petruk. Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate, *Sci. Transl. Med.* 2010, 2, 31ra34.
87. Indran I.R., Tufo G., Pervaiz S., Brenner C. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochim Biophys. Acta.* 2011, 1807, 735–745A.
88. Jeoung N.H. Pyruvate Dehydrogenase Kinases: Therapeutic Targets for Diabetes and Cancers. *Diabetes Metab J.* 2015, 39, 188-97.
89. Jeoung N.H., Rahimi Y., Wu P., Lee W.N., Harris R.A. Fasting induces ketoacidosis and hypothermia in PDHK2/PDHK4-double-knockout mice. *Biochem J.* 2012;443,829-39.
90. Lu C.W., Lin S.C., Chen K.F., Lai Y.Y., Tsai S.J. Induction of pyruvate dehydrogenase kinase-3 by hypoxia-inducible factor-1 promotes metabolic switch and drug resistance. *J Biol Chem.* 2008, 283:28106–28114.
91. Li Y., Erickson J.W., Stalneck C.A., Katt W.P., Huang Q., Cerione R.A., Ramachandran S. Mechanistic Basis Of Glutaminase Activation: A Key Enzyme That Promotes Glutamine Metabolism In Cancer Cells. *J Biol Chem.* 2016, 291, 20900-20910.
92. Wang J.B., Erickson J.W., Fuji R., Ramachandran S., Gao P., Dinavahi R., Wilson K.F., Ambrosio A.L., Dias S.M., Dang C.V., Cerione R.A. Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. *Cancer Cell.* 2010, 18, 207-19.
93. Janzer A., German N.J., Gonzalez-Herrera K., Asara J.M., Haigis M.C., Struhl K. Metformin and phenformin deplete tricarboxylic acid cycle and glycolytic intermediates during cell transformation and NTPs in cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014, 111, 10574-9.
94. Erickson J.W. Glutaminase: a hot spot for regulation of cancer cell metabolism? *Cerione A. Oncotarget.* 2010, 1, 734-40.
95. Li W. Targeting AMPK for cancer prevention and treatment. *Oncotarget.* 2015, 6, 7365–7378A.
96. Li N., Huang D., Lu N., Luo L. Role of the LKB1/AMPK pathway in tumor invasion and metastasis of cancer cells (Review). *Oncol Rep.* 2015, 34, 2821-6.

97. Jacquel A., Luciano F., Robert G., Auberge P. Implication and Regulation of AMPK during Physiological and Pathological Myeloid Differentiation. *Int J Mol Sci.* 2018, 19, pii:E2991
98. Chen K., Qian W, Li J, Jiang Z, Cheng L, Yan B, Cao J, Sun L, Zhou C, Lei M, Duan W, Ma J2, Ma Q1, Ma Z1. Loss of AMPK activation promotes the invasion and metastasis of pancreatic cancer through an HSF1-dependent pathway. *Mol Oncol.* 2017 Oct;11(10):1475-1492.A
99. Popovics P., Frigo D.E., Schally A.V., Rick F.G. Expert Opin Ther Targets. Targeting the 5'-AMP-activated protein kinase and related metabolic pathways for the treatment of prostate cancer. 2015,19, 617-32.
100. Park H.U., Suy S., Danner M., Dailey V., Zhang Y., Li H., Hyduke D.R., Collins B.T., Gagnon G., Kallakury B., Kumar D., Brown M.L., Fornace A., Dritschilo A., Collins S.P. AMP-activated protein kinase promotes human prostate cancer cell growth and survival. *Mol Cancer Ther.* 2009, 8, 733-41.
101. Bonini M.G., Gantner B.N. The multifaceted activities of AMPK in tumor progression--why the "one size fits all" definition does not fit at all? *IUBMB Life.* 2013, 65, 889-96.
102. Wingo S.N., Gallardo T.D., Akbay E.A., Liang M.C., Contreras C.M., Boren T., Shimamura T., Miller D.S., Sharpless N.E., Bardeesy N., Kwiatkowski D.J., Schorge J.O., Wong K.K., Castrillon D.H. Somatic LKB1 mutations promote cervical cancer progression. *PloS one.* 2009; 4:e5137.
103. Herzig, S., Shaw, R. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2018, 19, 121–135.
104. Parker S.J., Svensson R.U., Divakaruni A.S., Lefebvre A.E., Murphy A.N., Shaw R.J., Metallo C.M. LKB1 promotes metabolic flexibility in response to energy stress. *Metab Eng.* 2017, 43, Pt B, 208-217.
105. Green D.R., Galluzzi L., Kroemer G. Cell biology. Metabolic control of cell death. *Science.* 2014, Sep 345, 1250256.
106. Hsu P.P., Sabatini D.M. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell.* 2008, 134, 703-7.
107. Paoli P., Giannoni E., Chiarugi P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta.* 2013, 1833, 3481-3498.
108. Kabała-Dzik A., Rzepecka-Stojko A., Kubina R., Jastrzębska-Stojko Ź., Stojko R., Wojtyczka R.D., Stojko J. Comparison of Two Components of Propolis: Caffeic Acid (CA) and Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Induce Apoptosis and Cell Cycle Arrest of Breast Cancer Cells MDA-MB-231. *Molecules,* 2017, 22, pii:1554.
109. Wang T., Zhang J., Hu M., Zhang Y., Cui P., Li X., Li J., Vestin E., Brännström M., Shao LR., Billig H. Differential Expression Patterns of Glycolytic Enzymes and Mitochondria-Dependent Apoptosis in PCOS Patients with Endometrial Hyperplasia, an Early Hallmark of Endometrial Cancer, In Vivo and the Impact of Metformin In Vitro. *Int J Biol Sci.* 2019, 15, 714-725.
110. Lu C.C., Chiang J.H., Tsai F.J., Hsu Y.M., Juan Y.N., Yang J.S., Chiu H.Y. Metformin triggers the intrinsic apoptotic response in human AGS gastric adenocarcinoma

cells by activating AMPK and suppressing mTOR/AKT signaling. *Int J Oncol.* 2019, doi: 10.3892/ijo.2019.4704.

111. Tang Z.Y., Sheng M.J., Qi Y.X., Wang L.Y., He D.Y. Metformin enhances inhibitive effects of carboplatin on HeLa cell proliferation and increases sensitivity to carboplatin by activating mitochondrial associated apoptosis signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018, 22, 8104-8112.

112. Kim K.H., Sederstrom J.M. Assaying Cell Cycle Status Using Flow Cytometry. *Curr Protoc Mol Biol.* 2015, 111, 28.6.1-11.

113. Vander Heiden M.G., DeBerardinis R.J. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell.* 2017, 168, 657-669.

114. Solaini G., Sgarbi G., Baracca A. *Biochim Biophys Acta.* Oxidative phosphorylation in cancer cells. 2011, 1807, 534-42.

115. Pike L.S., Smift A.L., Croteau N.J., Ferrick D.A., Wu M. Inhibition of fatty acid oxidation by etomoxir impairs NADPH production and increases reactive oxygen species resulting in ATP depletion and cell death in human glioblastoma cells. *Biochim Biophys Acta.* 2011, 1807, 726-34.

116. DeBerardinis R.J., Mancuso A., Daikhin E., Nissim I., Yudkoff M., Wehrli S., Thompson C.B. Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007, 104, 19345–19350.

117. Miller D.M., Thomas S.D., Islam A., Muench D., Sedoris K. c-Myc and cancer metabolism. *Clin. Cancer Res.* 2012, 18, 5546–5553.

118. Nogueira V., Hay N. Molecular pathways: reactive oxygen species homeostasis in cancer cells and implications for cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2013, 19, 4309-14.

119. Jeon S.M., Chandel N.S., Hay N. AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature.* 2012, 485, 661–665.

120. Currie, A. Schulze, R. Zechner, T. Walther and R. Farese Jr.. Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell Metabolism*, 2013, 18, pp. 153-161.

121. Fritz V., Fajas L. Metabolism and proliferation share common regulatory pathways in cancer cells. *Oncogene*, 2010, 29, pp. 4369-77.

122. Biswas S., Lunec J., Bartlett K. Non-glucose metabolism in cancer cells--is it all in the fat? *Cancer Metastasis Rev.* 2012, 31, 689-98.

123. Sánchez-Martínez R., Cruz-Gil S., Gómez de Cedrón M., Álvarez-Fernández M., Vargas T., Molina S., García B, Herranz J., Moreno-Rubio J., Reglero G., Pérez-Moreno M., Feliu J., Malumbres M., Ramírez de Molina A. A link between lipid metabolism and epithelial-mesenchymal transition provides a target for colon cancer therapy. *Oncotarget* 2015, 6, 38719-36.

124. Fritz V., Benfodda Z., Rodier G., Henriquet C., Iborra F., Avancès C., Allory Y., de la Taille A., Culine S., Blancou H., Cristol J.P., Michel F., Sardet C., Fajas L. Abrogation of de novo lipogenesis by stearoyl-CoA desaturase 1 inhibition interferes with oncogenic signaling and blocks prostate cancer progression in mice. *Mol Cancer Ther.* 2010, 9, 1740-54.

125. Ganapathy-Kanniappan S., Geschwind J.F. Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: Progress and prospects. *Mol. Cancer.* 2013, 12, 152.

126. Wittig R., Coy J. The role of glucose metabolism and glucose-associated signalling in cancer. *Perspectives Medicinal Chemistry*. 2008; 1, 64-82.
127. Kamarajugadda L., Stemboroski Q., Cai N.E., Simpson S., Nayak M. Tan J. Lu Glucose oxidation modulates anoikis and tumor metastasis, *Mol. Cell Biol*. 2012, 321893–1907.
128. DeBerardinis R.J., Mancuso A., Daikhin E., Nissim I., Yudkoff M., Wehrli S., Thompson C.B. Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007, 104, 19345–19350.
129. Dang C.V. Ernst Schering Found Symp Proc. The interplay between MYC and HIF in the Warburg effect. 2007, 4, 35-53.
130. Lambert A.W., Pattabiraman D.R., Weinberg R.A. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*. 2017, 168,670-691.
131. Kantak R.H., Kramer. E-cadherin regulates anchorage-independent growth and survival in oral squamous cell carcinoma cells. *J. Biol. Chem*. 1998, 273 16953–16961.
132. Dziedzic A., Kubina R., Kabala-Dzik A., Wojtyczka R.D., Morawiec T., Bułdak R.J. Caffeic acid reduces the viability and migration rate of oral carcinoma cells (SCC-25) exposed to low concentrations of ethanol. *Int. J. Mol. Sci*. 2014, 15, 18725–18741.
133. Cheng K., Hao M. Metformin Inhibits TGF- β 1-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition via PKM2 Relative-mTOR/p70s6k Signaling Pathway in Cervical Carcinoma Cells. *Int. J. Mol. Sci*. 2016, 17, 2000. 66.
134. Wahdan-Alaswad R., Harrell J., Fan Z., Edgerton S., Liu B. Thor A. Metformin attenuates transforming growth factor beta (TGF- β) mediated oncogenesis in mesenchymal stem-like/claudin-low triple negative breast cancer. *Cell Cycle*. 2016, 8, 1046–1059.
135. Koeck S., Amann A., Huber J.M., Gamerith G., Hilbe W., Zwierzina H. The impact of metformin and salinomycin on transforming growth factor β -induced epithelial-to-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer cell lines. *Oncol Lett*. 2016, 11, 2946-2952.
136. Lee, M.Y.; Shen, M.R. Epithelial-mesenchymal transition in cervical carcinoma. *Am. J. Transl. Res*. 2012, 4, 1–13.
137. Lin H., Li N., He H., Ying Y., Sunkara S1, Luo L1, Lv N1, Huang D2, Luo Z2. AMPK Inhibits the Stimulatory Effects of TGF- β on Smad2/3 Activity, Cell Migration, and Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Mol Pharmacol*. 2015, 88, 1062-71.
138. Katsuno Y., Lamouille S., Derynck R. TGF- β signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. *Curr. Opin. Oncol*. 2013, 25, 76–84.
139. Zeisberg M., Neilson E.G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *Cell* 2009, 119, 1429–1437.
140. Laskov I., Abou-Nader P., Amin O., Philip C.A., Beauchamp M.C., Yasmeen A., Gotlieb W.H. Metformin Increases E-cadherin in Tumors of Diabetic Patients With Endometrial Cancer and Suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition in Endometrial Cancer Cell Lines. *Int J Gynecol Cancer*. 2016, 26, 1213-21.
141. Zavadil J., Böttinger E.P. TGF- β and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 2005, 24, 5764–5774.

142. Stanciu A., Zamfir-Chiru-Anton A., Stanciu M., Popescu C. Gheorghe D. Imbalance between Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases Promotes Invasion and Metastasis of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin. Lab.* 2017, 63, 1613–1620.
143. Roomi M., Kalinovsky T., Rath M., Niedzwiecki A. Modulation of u-PA, MMPs and their inhibitors by a novel nutrient mixture in human female cancer cell lines. *Oncol. Rep.* 2012, 28, 768–776.
144. Jin U., Lee J., Kang S., Kim J., Park W., Kim J., Moon S., Kim C. A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: Isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*. *Life Sci.* 2005, 77, 2760–2769.
145. Mahecha A., Wang H. The influence of vascular endothelial growth factor-A and matrix metalloproteinase-2 and -9 in angiogenesis, metastasis, and prognosis of endometrial cancer. *Onco Targets Ther.* 2017, 10, 4617–4624.
146. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011, 144, 646-74.
147. Wanami L.S., Chen H.Y., Peiró S., García de Herreros A., Bachelder R.E. Vascular endothelial growth factor-A stimulates Snail expression in breast tumor cells: Implications for tumor progression. *Exp. Cell Res.* 2008, 314, 2448–2453.
148. Sedlakova O., Svastova E., Takacova M., Kopacek J., Pastorek J., Pastorekova S., Carbonic anhydrase IX, a hypoxia-induced catalytic component of the pH regulating machinery in tumors. *Front. Physiol.* 2014, 4, e400.
149. Andreucci E, Peppicelli S., Carta F., Brisotto G., Biscontin E., Ruzzolini J., Bianchini F., Biagioni A, Supuran C., Calorini L. Carbonic anhydrase IX inhibition affects viability of cancer cells adapted to extracellular acidosis. *J. Mol. Med.* 2017, 95, 1341–1353.
150. Svastova E., Pastorekova S. Carbonic anhydrase IX: A hypoxia-controlled “catalyst” of cell migration. *Cell Adh. Migr.* 2013, 7, 226–231.
151. Pastorek J., Pastorekova S. Hypoxia-induced carbonic anhydrase IX as a target for cancer therapy: From biology to clinical use. *Semin. Cancer Biol.* 2015, 31, 52–64.
152. O’Leary B., Finn R.S., Turner N.C. Treating cancer with selective CDK4/6 inhibitors. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016, 13, 417-30.
153. Eastman A. Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system. *Cancer Cells.* 1990, 2, 275-80.
154. Vermeulen K., Van Bockstaele D.R., Berneman Z.N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 2003, 36, 131-49.
155. Horibe S., Matsuda A., Tanahashi T., Inoue J., Kawauchi S., Mizuno S., Ueno M., Takahashi K., Maeda Y., Maegouchi T., Murakami Y., Yumoto R., Nagai J., Takano M. Cisplatin resistance in human lung cancer cells is linked with dysregulation of cell cycle associated proteins. *Life Sci.* 2015, 124, 31-40.
156. Chen S.M., Lin T.K., Tseng Y.Y., Tu C.H., Lui T.N., Huang S.F., Hsieh L.L., Li Y.Y. Targeting inhibitors of apoptosis proteins suppresses medulloblastoma cell proliferation via G2/M phase arrest and attenuated neddylation of p21. *Cancer Med.* 2018, 7, 3988-4003.

157. Fetoni A.R., Paciello F., Mezzogori D., Rolesi R., Eramo S.L., Paludetti G., Troiani D. Molecular targets for anticancer redox chemotherapy and cisplatin-induced ototoxicity: the role of curcumin on pSTAT3 and Nrf-2 signalling. *Br J Cancer*. 2015, 113, 1434-44.
158. Guo Q., Liu Z., Jiang L., Liu M., Ma J., Yang C., Han L., Nan K., Liang X. Metformin inhibits growth of human non-small cell lung cancer cells via liver kinase B-1-independent activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *Mol Med Rep*. 2016, 3, 2590-6
159. Sacco F., Calderone A., Castagnoli L., Cesareni G. The cell-autonomous mechanisms underlying the activity of metformin as an anticancer drug. *Br J Cancer*. 2016, 115, 1451-1456.
160. Miyoshi H., Kato K., Iwama H., Maeda E., Sakamoto T., Fujita K., Toyota Y., Tani J., Nomura T., Mimura S., Kobayashi M., Morishita A., Kobara H., Mori H., Yoneyama H., Deguchi A., Himoto T., Kurokohchi K., Okano K., Suzuki Y., Murao K., Masaki T. Effect of the anti-diabetic drug metformin in hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Int J Oncol*. 2014, 45, 322-32.
161. Apontes P., Leontieva O.V., Demidenko Z.N., Li F., Blagosklonny M.V. Exploring long-term protection of normal human fibroblasts and epithelial cells from chemotherapy in cell culture. *Oncotarget*. 2011, 2, 222-33.
162. Xia C., Chen R., Chen J., Qi Q., Pan Y., Du L., Xiao G., Jiang S. Combining metformin and nelfinavir exhibits synergistic effects against the growth of human cervical cancer cells and xenograft in nude mice. *Sci Rep*. 2017, 7, 43373.
163. Lopes-Coelho F., Gouveia-Fernandes S., Serpa J. Metabolic cooperation between cancer and non-cancerous stromal cells is pivotal in cancer progression. *Tumour Biol*. 2018, 40, 1010428318756203.
164. Tao L., Huang G., Song H., Chen Y., Chen L. Cancer associated fibroblasts: An essential role in the tumor microenvironment. *Oncol Lett*. 2017, 14, 2611-2620.
165. Shiga K., Hara M., Nagasaki T., Sato T., Takahashi H., Takeyama H. Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. *Cancers (Basel)*. 2015, 7, 2443-58.
166. Romero I.L. Mukherjee A. Kenny H.A. Litchfield L.M. Lengyel, E. Molecular pathways: trafficking of metabolic resources in the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res*. 2015, 21, 680-6.
167. Wilde L., Roche M., Domingo-Vidal M., Tanson K., Philp N., Curry J., Martinez-Outschoorn U. Metabolic coupling and the Reverse Warburg Effect in cancer: Implications for novel biomarker and anticancer agent development. *Semin Oncol*. 2017, 44, 198-203.
168. Orecchioni S., Reggiani F., Talarico G., Mancuso P., Calleri A., Gregato G., Labanca V., Noonan D. M., Dallaglio K., Albin A., Bertolini F. 2015. The biguanides metformin and phenformin inhibit angiogenesis, local and metastatic growth of breast cancer by targeting both neoplastic and microenvironment cells. *Int J Cancer*. 136, E534-44.
169. Wadlow R.C., Wittner B.S., Finley S.A., Bergquist H., Upadhyay R., Finn S., Loda M., Mahmood U., Ramaswamy S. Systems-level modeling of cancer-fibroblast interaction. *PLoS One*. 2009, 4, e6888.
170. Pietras K., Ostman A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res*. 2010, 316, 1324-31.

171. Martinez-Outschoorn U., Sotgia F., Lisanti M.P. Tumor microenvironment and metabolic synergy in breast cancers: critical importance of mitochondrial fuels and function. *Semin Oncol.* 2014, 41, 195-216.

A handwritten signature in blue ink that reads "Małgorzata Tyszką - Czochara". The signature is written in a cursive style with a distinct flourish at the end of the last name.