

KATARZYNA PISZCZATOWSKA, GRAŻYNA MOSIENIAK

*Pracownia Molekularnych Podstaw Starzenia  
Instytut Biologii Doświadczalnej PAN  
Pasteura 3, 09-093 Warszawa  
E-mail: g.mosieniak@nencki.gov.pl*

## OKSYDAZY NADPH JAKO ATRAKCYJNY CEL TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

### WSTĘP

Oksydazy NADPH (NOX) to grupa enzymów produkujących reaktywne formy tlenu (RFT). Obecność NOX odnotowano zarówno w tkankach zdrowych, jak i zmienionych nowotworowo. Działanie RFT jest bardzo różnorodne. Z jednej strony biorą udział w przekazywaniu sygnałów komórkowych, przez co uczestniczą w wielu procesach, np. proliferacji, różnicowaniu, migracji, z drugiej, mogą przyczynić się do uszkodzenia struktur komórkowych. Zauważono także, że NOX posiadają związek z procesem starzenia. Starzenie komórkowe jest procesem niezwykle interesującym i ważnym w organizmie człowieka. Zjawisku temu ulega większość komórek prawidłowych. Wiąże się ono z trwałym zahamowaniem podziałów komórkowych, co w przypadku komórek budujących tkanki naszego organizmu prowadzi do zmniejszonej możliwości regeneracji tkanek oraz w konsekwencji do upośledzenia ich funkcjonowania, co obserwuje się w starzejącym organizmie. W związku z tym, próbuje się zapobiegać lub opóźnić proces starzenia w nadziei, że w ten sposób możliwe będzie spowolnienie niepożądanych zmian zachodzących wraz z wiekiem. Istnieje jednak grupa komórek, których proliferację chcielibyśmy zahamować. Są nimi komórki nowotworowe, pozostające „wiecznie młode” ze względu na to, że nie tracą zdolności do podziałów wraz z upływem czasu. Okazuje się, iż pod wpływem określonych czynników również one mogą ulec procesowi starzenia. Zaobserwowana zwiększona aktywność oksydaz

NADPH w tkankach nowotworowych oraz opisywany w literaturze ich udział w regulacji proliferacji i starzenia komórkowego sprawia, że enzymy te mogą stanowić atrakcyjny cel terapii przeciwnowotworowej prowadzącej to trwałego zahamowania proliferacji komórek nowotworowych.

### RODZINA OKSYDAZ NADPH

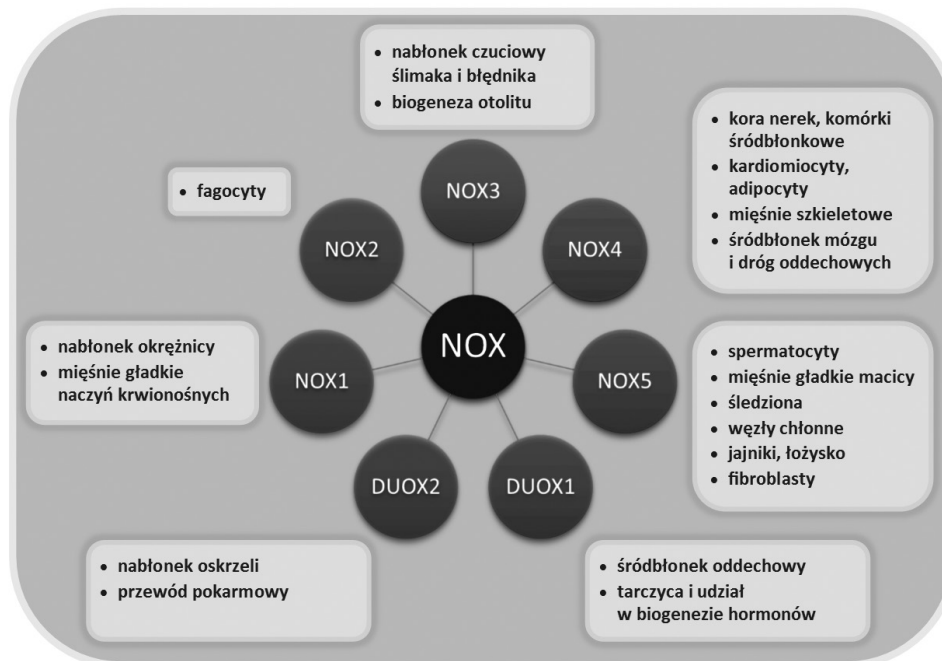
Rodzinę oksydaz NADPH (NOX) stanowią białka przenoszące elektrony poprzez błony biologiczne. NADPH oksydazy katalizują powstanie anionorodnika ponadtlenkowego (bądź nadtlenku wodoru w przypadku NOX4) na drodze jednoelektronowej redukcji tlenu. Donorem elektronu jest NADPH lub NADH. Biologiczna funkcja enzymów należących do tej rodziny to właśnie produkcja reaktywnych form tlenu (BEDARD i KRAUSE 2007). Jednak rola jaką pełnią reaktywne formy tlenu produkowane przez oksydazy NADPH jest zróżnicowana w zależności od typu komórki, miejsca ich powstawania i ich liczby. Reaktywne formy tlenu biorą udział w przekazywaniu sygnałów w komórce. Ich aktywność związana jest z regulacją wielu procesów. Niestety wiadomo, że mogą przyczynić się także do uszkodzenia różnych cząsteczek, np. DNA czy lipidów. Wszystkie enzymy należące do grupy oksydaz NADPH mają podobną strukturę. Zbudowane są z sześciu domen transbłonowych. Domeny III i V zawierają dwie histydyny w obrębie dwóch asymetrycznych reszt hemowych. Obecny w cytoplazmie, mający grupę -COOH koniec posiada dinukleotyd flawino-

adeninowy (FAD) i domenę wiążącą NADPH. Uważa się, że NOX transportują pojedynczy elektron od NADPH do FAD, następnie do pierwszego hemu, po czym do hemu drugiego, a stamtąd ostatecznie na tlen (BEDARD i KRAUSE 2007).

W komórkach ludzkich zidentyfikowano 7 oksydaz NADPH: NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 i DUOX2. Choć początkowo ich obecność wykazywano tylko w komórkach układu odpornościowego i wiązano z procesem tzw. wybuchu tlenowego, którego efektem jest zabicie patogenu, to obecnie wiadomo, że ekspresja tych enzymów jest powszechna w różnych typach komórek, a spektrum działania bardzo szerokie i czasami przeciwstawne (PRZYBYLSKA i MOSIENIAK 2014) (Ryc. 1). Z wyjątkiem NOX5, aktywacja wszystkich niezwiązanych z fagocytozą enzymów z rodziny oksydaz NADPH potrzebuje współpracujących z nimi białek (CROSS i SEGAL 2004). Na przykład w celu osiągnięcia pełnej aktywności NOX1 tworzy kompleks z występującym w błonie białkiem p22<sup>phox</sup> oraz rozpuszczalnymi podjednostkami analogów p47<sup>phox</sup> i p67<sup>phox</sup>, oraz małą GTPazą Rac1.

Ekspresja genu *NOX1* pojawia się w zdrowym i zmienionym nowotworowo nabłonku okrężnicy oraz w mniejszym stopniu w mięśniach gładkich naczyń krwionośnych i innych tkankach prawidłowych. NOX3 wykorzystuje do współpracy te same białka, jednak jego występowanie ograniczone jest do nabłonka czuciowego ślimaka i błędnika

obecnych w uchu wewnętrznym. Jego aktywność wiąże się także z biogenezą otolitu (kamyczka błędnikowego) odgrywającego rolę w percepcji grawitacji i równowagi (CHENG i współaut. 2004, UENO i współaut. 2005). NOX2 jest to pierwszy opisany członek rodziny oksydaz NADPH. Występuje w fagocytach i jej aktywność wiąże się z wybuchem tlenowym, który skutkuje zabicie patogenów (ROY i współaut. 2015). NOX4 występuje w korze nerek i komórkach śródbłonkowych. Ekspresja genu kodującego *NOX4* na niższym poziomie obserwowana jest również w kardiomiocytach, adipocytach i mięśniach szkieletowych (YAMAURA i współaut. 2009). Badania poziomu transkryptu genu *NOX5* pozwoliły na stwierdzenie jego obecności w spermatocytach, mięśniach gładkich macicy, bogatych w limfocyty obszarach śledziony i węzłach chłonnych bogatych w dojrzałe limfocyty B i T. Oprócz tego NOX5 pojawia się w jajnikach, łożysku, fibroblastach w sercu (JUHASZ i współaut. 2009). Obecność mRNA *DUOX1* wykazano w śródbłonku oddechowym, w którym odgrywa krytyczną rolę w obronie gospodarza, w tarczycy, gdzie produkcja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> przez ten enzym jest ważna dla syntezy hormonów tarczycowych (JUHASZ i współaut. 2009). DUOX2 początkowo opisywany był jako enzym produkujący H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w tarczycy i związany z biogenezą hormonów tarczycowych (CAILLOU i współaut. 2001). Późniejsze badania podkreślały jego obronną rolę w nabłonku oskrzeli i całym przewodzie pokarmowym.



Ryc. 1. Występowanie oksydaz NADPH (NOX) w tkankach organizmu.

## REAKTYWNE FORMY TLENU I OKSYDAZY NADPH (NOX) A NOWOTWORY

Udział reaktywnych form tlenu w procesie transformacji nowotworowej postulowany był już w latach 80. ubiegłego wieku, kiedy to OBERLEY i współaut. (1981) opublikowali wyniki badań, w których wykazali wzrost poziomu nadtlenu wodoru w komórkach stymulowanych do proliferacji insuliną. Jednocześnie sformułowali oni wówczas tzw. wolnorodnikową teorię nowotworzenia, która zakładała, że zwiększona produkcja wolnych rodników prowadzi do unieśmiertelnienia komórek. Dalsze badania, które najpierw doprowadziły do odkrycia enzymów produkujących RFT-NOX, jako białek powszechnie występujących w różnych typach komórek, dowiodły również, że oksydazy NADPH są istotnym źródłem RFT w wielu różnych liniach komórek nowotworowych (SZATROWSKI i NATHAN 1991). Co więcej, ich podwyższony poziom odnajdywano w różnych typach nowotworów (Tabela 1).

Wysoki poziom RFT może przyspieszać wzrost i rozwój nowotworu uruchamiając kilka różnych mechanizmów. Po pierwsze, RFT działają mutagennie i przyczyniają się do wzrostu niestabilności genetycznej, która promuje proces transformacji nowotworowej. Udowodniono, że produkowane przez NOX reaktywne formy tlenu przyczyniają się do utlenienia zasad azotowych, szczególnie guaniny, jak również do

przerwania nici DNA w komórkach nowotworowych, powodując genetyczną heterogenność (ROY i współaut. 2015). Wiadomo też, że utlenienie zasad azotowych występujących w kwasie deoksyrybonukleowym jest jedną z najbardziej powszechnych przyczyn mutacji somatycznych w guzach litych. Fakt stwierdzenia obecności oksydazy NOX4 w błonie jądrowej nasuwa przypuszczenie, że produkowany przez nią nadtlenek wodoru może bezpośrednio uszkadzać DNA jądrowy (SPENCER i współaut. 2011). Ponadto, oksydaza ta występuje również w błonie mitochondrialnej i, jak wykazały badania KOZIELA i współaut. (2013), może ona poprzez inaktywację kompleksu I zaburzać prawidłowe funkcjonowanie mitochondriów. W efekcie dochodzi do zwiększenia oksydacyjnych uszkodzeń mitochondrialnego DNA, co przyczynia się do wzrostu stresu oksydacyjnego w całej komórce.

Kolejnym mechanizmem działania NOX, który może wywierać efekt pronowotworowy, jest udział tych enzymów w regulowaniu prożyciowych i proproliferacyjnych ścieżek przesyłania sygnału w komórce. Uważa się, że w odpowiedzi na mitogeny dochodzi do aktywacji oksydaz NADPH, które poprzez produkcję RFT wpływają na ścieżki przesyłania sygnału regulujące cykl komórkowy. Tak np. wykazano związek pomiędzy działaniem płytkowego czynnika wzrostu (PDGF) oraz naskórkowego czynnika wzrostu (EGF) a wzrostem poziomu RFT produkowanych z udziałem NOX1

Tabela 1. Występowanie poszczególnych oksydaz NADPH w różnych typach nowotworów.

Oksydaza NADPH	Typ nowotworu-występowanie	Referencje
NOX1	rak okrężnicy, niedrobnokomórkowy rak płuc, gruczolak żołądka	JUHASZ i współaut. 2009, DOROSHOW i współaut. 2012, ROY i współaut. 2015
NOX2	nowotwory pochodzenia hematopoetycznego	JUHASZ i współaut. 2009, DOROSHOW i współaut. 2012
NOX3	nie zaobserwowano	JUHASZ i współaut. 2009, DOROSHOW i współaut. 2012
NOX4	nowotwory jajnika, nerek, mózgu, czerniak, gruczolak żołądka	JUHASZ i współaut. 2009, YAMAURA i współaut. 2009, DOROSHOW i współaut. 2012, ROY i współaut. 2015
NOX5	rak piersi, przełyku, prostaty, białaczka włochatokomórkowa, czerniak, niedrobnokomórkowy rak płuc	JUHASZ i współaut. 2009, DOROSHOW i współaut. 2012
DUOX1	niska ekspresja w nowotworach ludzkich, rak trzustki	JUHASZ i współaut. 2009, DOROSHOW i współaut. 2012
DUOX2	rak płuc, tarczycy, okrężnicy, trzustki	JUHASZ i współaut. 2009, DOROSHOW i współaut. 2012, WU i współaut. 2013

(PARK i współaut. 2004), czy też zwiększoną aktywność NOX4 pod wpływem działającego na komórki TGF- $\beta$  (STURROCK i współaut. 2007). Jedną z grup cząsteczek, których aktywność podlega regulacji zależnej od RFT i które odgrywają istotną rolę w przekazywaniu sygnału od receptorów czynników wzrostowych są fosfatazy. Posiadają one wrażliwe na utlenienie reszty cysteinowe. W efekcie takiego utlenienia dochodzi do przejściowego zahamowania aktywności fosfatazy, co pozwala na utrzymującą się fosforylację kinaz receptorowych i aktywację białek docelowych (RAY i współaut. 2012). Wykazano na przykład, że pod wpływem działania EGF w komórkach śródbłonna naczyń dochodzi do aktywacji NOX4 i wzrostu RFT, które prowadzą do utlenienia reszt cysteinowych i zahamowania aktywności fosfatazy PTP1B (CHEN i współaut. 2008). Podobnej regulacji, zależnej od utlenienia reszt cysteinowych, podlegają również inne białka sygnałowe, takie jak czynniki transkrypcyjne i kinazy (RAY i współaut. 2012), dlatego też udział enzymów NOX w regulacji proliferacji może przebiegać poprzez szereg różnych białek. Podwyższony poziom NOX i produkowanych przez nie RFT poprzez zahamowanie aktywności fosfataz, przyczyniają się do przedłużonej fosforylacji i zwiększonej aktywacji kinaz receptorów dla czynników wzrostowych. W efekcie w komórce generowany jest sygnał do proliferacji, który nie podlega właściwej regulacji. Tak na przykład wykazano, że stała aktywność enzymów NOX w komórkach linii nowotworowych HepG2 i A431 prowadzi do utlenienia reszt cysteinowych obecnych w centrum aktywnym fosfatazy PTP1B. Zahamowanie aktywności NOX inhibitorem DPI prowadziło do obniżenia poziomu fosforylacji reszt tyrozynowych i ograniczało niezależny od podłoża wzrost komórek nowotworowych (LOU i współaut. 2008).

Opisywany był również udział RFT produkowanych przez enzymy NOX w komórkach nowotworowych w regulacji prożyciowych ścieżek przesyłania sygnału. Wykazano zależność pomiędzy RFT a zwiększoną aktywnością kinaz szlaków JAK/STAT i PI3K/AKT oraz czynników transkrypcyjnych NF $\kappa$ B i p53 (BLOCK i GORIN 2012).

Oksydazy NADPH uczestniczą również w ścieżce przesyłania sygnału generowanego przez onkogen RAS. Nadekspresja KRAS indukuje ekspresję NOX1 w kilku różnych typach komórek. Ponadto wykazano, że RFT produkowane przez NOX1 są niezbędne w transformacji nowotworowej wywołanej onkogenem RAS oraz do

wzrostu guzów w mysim modelu kancerogenezy (MITSUSHITA i współaut. 2004).

Obecne na podwyższonym poziomie w komórkach nowotworowych oksydazy NADPH promują procesy związane z angiogenezą, co jest niezbędne do wzrostu guzów. Wykazano, że RFT produkowane przez NOX1 i NOX4 były odpowiedzialne za zwiększoną ekspresję genu kodującego czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF), który wydzielany przez komórki nowotworowe czerniaka, stymuluje tworzenie nowych naczyń w obrębie guza (ARBISER i współaut. 2002).

W hodowli komórkowej NOX1 odgrywa również ważną rolę w migracji komórek nowotworowych, w której pośredniczy  $\alpha$ -integryna, oraz w sygnalizacji poprzez ścieżkę Wnt uważaną za krytyczną w rozwoju zarówno raka okrężnicy, jak i czerniaka (ROY i współaut. 2015).

Podsumowując, istnieje szereg badań wskazujących, że zwiększona ekspresja NOX odgrywa istotną rolę zarówno w procesie transformacji nowotworowej, jak i w promowaniu proliferacji komórek nowotworowych oraz wzrostu guza. Z tego też powodu oksydazy NADPH stanowią atrakcyjny cel terapeutyczny, co jest przedmiotem licznych badań.

## OKSYDAZY NADPH A ŚMIERĆ KOMÓRKOWA I STARZENIE

Wiele przeprowadzonych badań wskazuje na śmierć komórkową w odpowiedzi na aktywację NOX. Reaktywne formy tlenu mogą przyczyniać się do apoptozy (i) pośrednio poprzez uszkodzenia DNA i lipidów lub (ii) bezpośrednio przez cząsteczki sygnałowe aktywowane przez RFT. Sygnał proapoptotyczny może pojawiać się dzięki aktywacji kinaz MAP, takich jak SAPK/JNK, ERK1/2 i p38. Aktywacja kinaz MAP występuje w wielu przypadkach na drodze zależnego od RFT zahamowania fosfatazy tyrozynowej. Przy wyższym stężeniu RFT, nadtlenek wodoru może hamować kaspazy i w ten sposób prowadzić do zmiany apoptozy w nekrozę (BEDARD i KRAUSE 2007).

Zauważono jednak, że w pewnych warunkach produkowane przez NOX reaktywne formy tlenu wywierają efekt prożyciowy. Pochodzące od NOX reaktywne formy tlenu mogą działać antyapoptotycznie aktywując czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B lub kaskadę kinaz Akt/ASK1. Sugeruje się również, że nadtlenek jest naturalnym inhibitorem śmierci komórkowej zależnej od receptora Fas (BEDARD i KRAUSE 2007). Zatem aktywacja NOX może prowadzić do śmierci komórkowej, jednak w pewnych warunkach

może być czynnikiem antyapoptotycznym. Możliwych przyczyn tych pozornie sprzecznych funkcji oksydaz NADPH można doszukiwać się w: różnym poziomie produkowanych RFT, zróżnicowanej ekspresji i rozmieszczeniu poszczególnych izoform NOX, komórkowo-specyficznym zestawie wrażliwych na zmiany oksyredukcyjne białek (np. czynników transkrypcyjnych, kinaz, fosfataz, kaspaz) obecnych w danym typie komórek oraz metabolizmie anionorodnika ponadtlenkowego (który może działać antyapoptycznie) w stosunku do nadtlenu wodoru (którego działanie może być proapoptyczne) (PERVAIZ i CLEMENT 2002).

Zauważono, że RFT produkowane przez oksydazy NADPH mogą prowadzić do starzenia komórkowego zgodnie z opisywaną w literaturze prostarzeniową rolą tych cząsteczek (LENER i współaut. 2009, WEYEMI i współaut. 2011, KODAMA i współaut. 2012).

## CZYM JEST STARZENIE KOMÓRKOWE?

Każda prawidłowa komórka przechodzi liczne podziały, które odgrywają istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu zarówno tkanek, jak i całego organizmu, jego wzrostu i regeneracji. W 1961 r. Hayflick i Moorhead, prowadząc badania na fibroblastach udowodnili, że komórki hodowane *in vitro* mogą dzielić się tylko przez pewien czas, po czym zaprzestają podziałów, mimo iż warunki w których są hodowane zapewniają im dostęp do wszystkich czynników wzrostowych potrzebnych do proliferacji (HAYFLICK i MOORHEAD 1961). Maksymalną liczbę podziałów, którym ulegają tak hodowane komórki określa się jako tzw. limit Hayflicka, który może być różny w zależności od typu komórek. Opisane powyżej zjawisko związane z wyczerpywaniem potencjału proliferacyjnego komórek, zaobserwowane i opisane przez Hayflicka i Moorheada nazywa się starzeniem komórkowym. Starzejąca się komórka pomimo tego, iż jest żywa i aktywna metabolicznie traci nieodwracalnie zdolność do podziałów komórkowych.

Proces starzenia komórkowego, choć odkryty dzięki obserwacjom prowadzonym *in vitro*, zachodzi również w tkankach naszego organizmu. Akumulacja komórek starych towarzyszy starzeniu organizmu oraz chorobom związanym z wiekiem, takim jak cukrzyca czy choroby układu krążenia. Ostatnie badania prowadzone na organizmach modelowych dowiodły, że starzenie komórkowe może wręcz być odpowiedzialne za postępującą z wiekiem dysfunkcję różnych organów i tkanek (BAKER i współaut. 2012, 2016). Starzenie komórkowe może również pełnić w organizmie pozytywną rolę. Wykazano, że stanowi

ono barierę przeciwnowotworową, którą zdrowa komórka musi pokonać zanim przekształci się w komórkę nowotworową.

## JAKIE SĄ RODZAJE STARZENIA KOMÓRKOWEGO?

### STARZENIE REPLIKACYJNE

Opisany przez Hayflicka i Moorheada proces określa się jako tzw. starzenie replikacyjne. Dalsze badania przeprowadzone przez WATSONA (1972) udowodniły, że stopniowa utrata zdolności do podziałów komórkowych wynika ze skracania, wraz z każdym podziałem, telomerów mieszczących się na zakończeniach chromosomów. Telomery są to struktury występujące na końcach chromosomów komórek eukariotycznych, do skracania których dochodzi na skutek tzw. problemu końca replikacji (BIELAK-ŻMIJEWSKA i współaut. 2014). Obecność telomerów jest niezwykle ważna do prawidłowego funkcjonowania komórki. Istnieje grupa komórek posiadających aktywny enzym telomerazę, który jest w stanie odbudować skrócone telomery (SHAY i BACCHETTI 1997). Jego działanie obserwuje się w komórkach embrionalnych i w komórkach linii płciowej u mężczyzn. W komórkach somatycznych aktywność telomerazy jest bardzo niska, z nielicznymi wyjątkami, takimi jak komórki macierzyste skóry, komórki hematopoetyczne, komórki krypt jelitowych czy aktywowane limfocyty. Dzięki temu komórki te są w stanie dzielić się wielokrotnie przez długi czas. Poza tym wykazano, iż wysoką aktywność telomerazy wykazuje aż 90% typów nowotworów (GREIDER i BLACKBURN 1985). Proces reaktywacji telomerazy jest jednym z istotnych etapów transformacji nowotworowej komórek prawidłowych. Sprawia on, że komórki stają się nieśmiertelne i nie podlegają limitowi Hayflicka dzieląc się nieograniczoną liczbę razy. Sprzyja to powstawaniu kolejnych mutacji, które prowadzić mogą między innymi do nabywania oporności na stosowane terapie przeciwnowotworowe. Komórki nowotworowe nie ulegają starzeniu replikacyjnemu, natomiast pod wpływem pewnych czynników mogą ulegać starzeniu przyspieszonemu.

### STARZENIE PRZYSPIESZONE

Starzenie komórkowe może być również indukowane różnymi czynnikami stresowymi, za które uważa się między innymi promieniowanie jonizujące, wolne rodniki, uszkodzenia DNA czy tzw. stres hodowlany związany z niefizjologicznymi warunkami na jakie narażone są komórki w hodowli *in vitro* (COLLADO i SERRANO 2006). Taki proces określa się mianem starzenia przyspieszonego.

go. W przeciwieństwie do starzenia replikacyjnego, ten typ starzenia może być indukowany również w komórkach nowotworowych, np. pod wpływem chemioterapii lub radioterapii.

Starzenie przyspieszone nie jest związane ze skracaniem telomerów, które występuje w starzeniu replikacyjnym. W hodowli komórkowej obserwuje się je już po kilku dniach od zadziałania czynnika indukującego, w przeciwieństwie do starzenia replikacyjnego pojawiającego się po miesiącach. Wspólnym mianownikiem różnorodnych czynników wywołujących starzenie przyspieszone są uszkodzenia DNA w formie pęknięcia obydwu nici helisy. Tak na przykład stres oksydacyjny prowadzi do pojawiania się jednoniciowych pęknięć DNA, które w czasie replikacji bywają przekształcane w pęknięcia dwuniciowe (SEDELNIKOVA i współaut. 2010). Wśród czynników uszkadzających DNA znajduje się duża grupa chemioterapeutyków stosowanych powszechnie w leczeniu. Jednym z nich jest doxorubicyna. W Pracowni Molekularnych Podstaw Starzenia Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN wykazano, iż podawanie komórkom tego związku prowadzi do starzenia się zarówno komórek prawidłowych, jak i komórek nowotworowych (ŚLIWIŃSKA i współaut. 2009, MOSIENIAK i współaut. 2015, STRZESZEWSKA i współaut. 2018).

Szczególnym rodzajem starzenia przyspieszonego, o ogromnym znaczeniu dla prawidłowego funkcjonowania organizmu, jest starzenie indukowane onkogenami. Pionierskie badania prowadzone w latach 90. przez SERRANO i współaut. (1997) na fibroblastach pokazały, że starzenie komórkowe może być wynikiem ekspresji onkogenu *Ras*. Inne prace wskazują, że również nadekspresja takich onkogenów jak: *RAF*, *MEK*, *MOS*, *BRAF*

przyczynia się do indukcji tego procesu. Udowodniono, iż starzenie indukowane onkogenami zachodzi nie tylko w warunkach hodowli *in vitro*, ale też *in vivo*, zarówno u ludzi, jak i u myszy. Co ważniejsze, stanowi ono istotną barierę na drodze do transformacji nowotworowej (MOSIENIAK i STRZESZEWSKA 2014) (Ryc. 2).

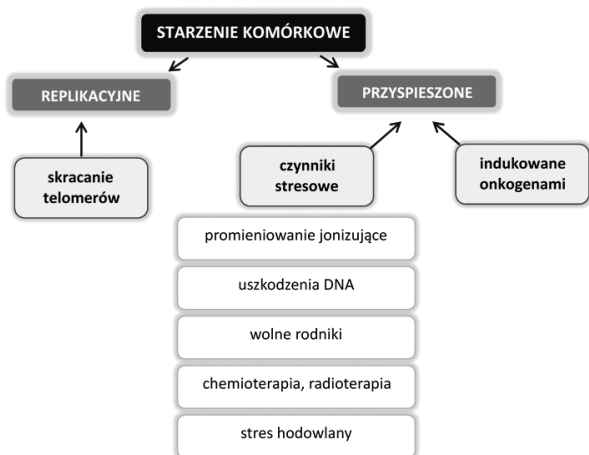
## CECHY KOMÓREK STARYCH

Komórki stare różnią się pod względem morfologicznym i funkcjonalnym od komórek młodych. Dlatego też, w celu ich identyfikacji zarówno w hodowli, jak i w tkance, stosuje się kilka markerów.

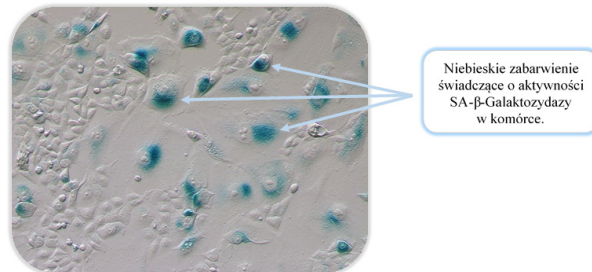
### ZMIANY WYSTĘPUJĄCE NA POZIOMIE STRUKTURY I MORFOLOGII

Komórka, która uległa procesowi starzenia, ma zdecydowanie większe rozmiary niż komórka młoda. Mówi się o jej tzw. rozplaszczeniu, które można obserwować w warunkach hodowli *in vitro*. Zmiany dostrzegalne są również w jądrze komórkowym, np. jego kształcie. Jądra komórek starych bywają pofragmentowane lub pojedynczemu jądru towarzyszy tzw. mikrojądro powstające w wyniku nieprawidłowego rozdziału chromosomów do komórek potomnych. Obserwuje się liczne ziarnistości oraz zwiększoną liczbę lizosomów i wakuol. Pojawia się także wzrost poziomu lipofuscyny brązowożółtego barwnika wytwarzanego w procesie utleniania lipoprotein w lizosomach (GEORGAKOPOULOU i współaut. 2013).

W komórkach, które uległy starzeniu replikacyjnemu bądź przyspieszonemu znacząco rośnie aktywność związanej ze starzeniem kwaśnej  $\beta$ -galaktozydazy (SA- $\beta$ -galaktozydaza) (ALSTER i KORWEK 2014) (Ryc. 3).



Ryc. 2. Schemat przedstawiający rodzaje starzenia komórkowego oraz czynniki, które je indukują.



Niebieskie zabarwienie świadczy o aktywności SA- $\beta$ -Galaktozydazy w komórce.

Ryc. 3. Komórki nowotworowe raka okrężnicy HCT116 które uległy starzeniu pod wpływem chemioterapeutyku – doxorubicyny. Dzięki zastosowanemu testowi cytochemicznemu z wykorzystaniem substratu galaktozydazy, komórki o podwyższonej aktywności SA- $\beta$ -galaktozydazy (komórki stare) zabarwiają się na niebiesko.

### ZNACZNIKI ZWIĄZANE Z PROLIFERACJĄ I REGULACJĄ CYKLU KOMÓRKOWEGO

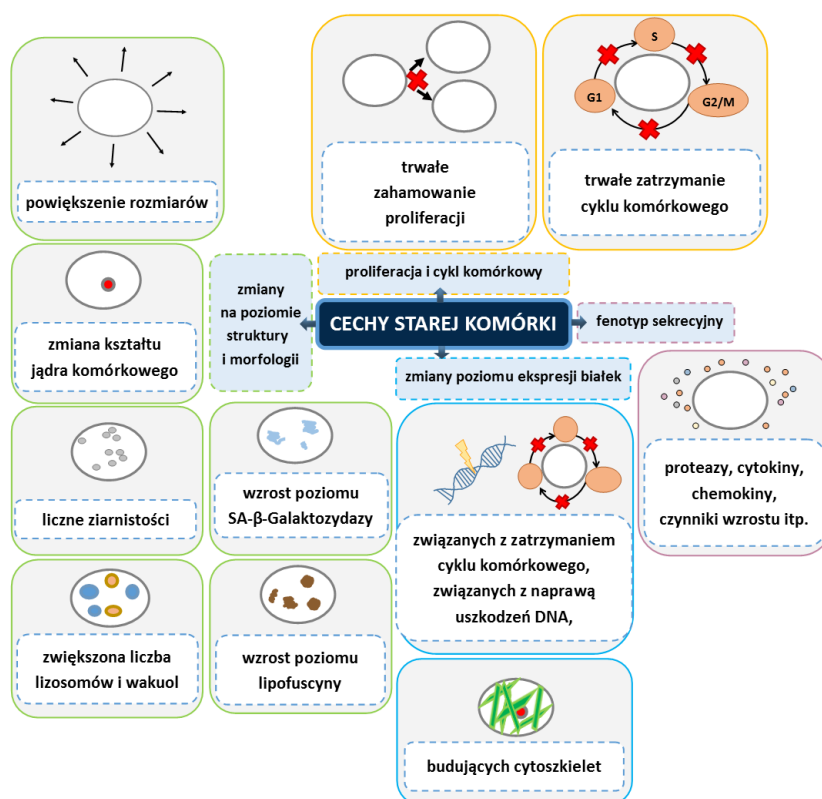
Jedną z podstawowych cech komórek starych jest ich trwale zatrzymanie w cyklu komórkowym. Komórki zatrzymane są w fazach G1 i/lub G2 w zależności od ich typu, rodzaju starzenia oraz czynnika indukującego. Chociaż nie musi to być reguła, to jednak zwykle podczas starzenia replikacyjnego komórki akumulują się w fazie G1, natomiast starzenie przyspieszone prowadzi do gromadzenia się komórek w fazie G1 i G2 (ALSTER i KORWEK 2014). W przypadku niektórych typów komórek nowotworowych zdarza się, iż wchodzi one w nieprawidłowy cykl komórkowy i na skutek tego stają się poliploidalne (ŚLIWIŃSKA i współaut. 2009, MOSIENIAK i współaut. 2015).

Skutkiem starzenia komórkowego jest zmiana poziomu ekspresji białek. Obserwuje się wzrost ekspresji przede wszystkim białek zaangażowanych w zahamowanie cyklu komórkowego. Silnie wyrażone mogą być białka zaangażowane w naprawę podwójnych pęknięć w DNA. Zmienia się też poziom wielu innych białek, które nie są bezpośrednio związane z indukcją procesu starzenia, np. białek cytoszkieletu.

### ZNACZNIKI ZWIĄZANE Z DNA I CHROMATYNĄ ORAZ FENOTYP SEKRECYJNY

Częstą przyczyną starzenia komórkowego są uszkodzenia pojawiające się w jej materiale genetycznym. Najistotniejsze dla indukcji procesu starzenia są pęknięcia dwuniciowego DNA. Takie zmiany prowadzą do trwałej aktywacji ścieżki odpowiedzi na uszkodzenia DNA (ang. DNA damage, DDR). W efekcie, w komórkach starych można zidentyfikować skupiska białek należących do tej ścieżki przesyłania sygnału, między innymi aktywnej kinazy ATM, ufosforylowanego histonu H2AX ( $\gamma$ H2AX) czy białka 53BP1. Białka te są zaangażowane w rozpoznanie miejsc uszkodzenia i ich naprawę (ALSTER i KORWEK 2014). Przez wiele lat sądzono, że prowadzące do starzenia uszkodzenia DNA mogą występować zarówno w odcinku telomerowym, jak i nietelomerowym, jednak wykazano, iż to uszkodzenia w odcinkach telomerowych przyczyniają się do trwałej aktywacji DDR i pojawienie się nawet kilku z nich w tym obszarze jest istotnym impulsem do indukcji starzenia (FUMAGALLI i współaut. 2012).

Jedną z istotnych cech komórek ulegających starzeniu jest zdolność do wydzielania



Ryc. 4. Schemat przedstawiający cechy komórki starej na poziomie jej struktury i morfologii, zmian jakie zachodzą w proliferacji oraz cyklu komórkowym, ekspresji określonych białek oraz charakterystycznego fenotypu sekrecyjnego.

różnego typu czynników do otaczającego je mikrośrodowiska. Tę cechę określa się mianem fenotypu sekrecyjnego określanego jako SASP (ang. senescence associated secretory phenotype) lub SMS (ang. senescence-messaging secretome). W jego skład wchodzi proteazy, cytokiny, chemokiny, czynniki wzrostu itp., które działają zarówno autokrynnie, jak i parakrynnie na sąsiadujące komórki. Wydzielane przez stare komórki czynniki mogą wpływać pozytywnie lub negatywnie na zachodzące w organizmie procesy, w zależności od kontekstu tkankowego.

Między innymi zaangażowane są w indukcję proliferacji i różnicowania komórek, angiogenezy, biorą udział w naprawie tkanek, transformacji epithelialno-mezenchymalnej, ale też mogą przyczyniać się do oporności na chemioterapię. Jedną z istotnych funkcji fenotypu sekrecyjnego jest komunikowanie się komórek starych z komórkami układu odpornościowego. Wykazano, że przyczynia się to do usuwania komórek starych z tkanki, w której się gromadzą (ALSTER i KORWEK 2014) (Ryc. 4).

#### STARZENIE KOMÓRKOWE W TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

Starzenie komórkowe stanowi barierę przeciwnowotworową. W procesie nowotworzenia dochodzi do przełamania tej bariery. W unieśmiertnionych komórkach podczas kolejnych etapów kancerogenezy może dochodzić do transformacji nowotworowej. Przyczyną tego są gromadzące się mutacje występujące w genach kodujących takie białka jak: p53, pRb, p16, które mają ważny udział w indukcji starzenia komórkowego. Zauważono jednak, iż pomimo tego, że komórki nowotworowe nie podlegają limitowi Hayflicka i nie ulegają starzeniu replikacyjnemu, to pozostają wrażliwe na indukcję starzenia przyspieszonego, zachodzącego pod wpływem różnych czynników chemicznych i fizycznych. Stare komórki nowotworowe zidentyfikować można przy pomocy takich samych markerów, jakie używane są do oceny komórek prawidłowych, które uległy starzeniu (MOSIENIAK i STRZESZEWSKA 2014). Badania przeprowadzone przez Roninsona (RONINSON 2003, RONINSON i DOKMANOVIC 2003) wykazały, że do najbardziej efektywnej indukcji starzenia komórek nowotworowych dochodzi na skutek stosowania czynników uszkadzających DNA, takich jak doksorubicyna lub cisplatyna. Natomiast niewielki efekt przynosiło użycie Taxolu i winkrystyny, których działanie wiąże się z zaburzeniem powstania wrzeciona podziałowego. Co ciekawe, badania CHANGA i współaut. (1999) pokazały, iż do indukcji starzenia komórko-

wego dojść może pod wpływem zastosowania dużo niższych stężeń związków, w porównaniu z tymi, które potrzebne są do indukcji śmierci komórki. W celu indukcji starzenia w komórkach nowotworowych można stosować również inne metody. Jedną z nich stanowią manipulacje genetyczne, powodujące nadekspresję genów kodujących białka biorące udział w hamowaniu cyklu komórkowego, takich jak: p21, p16, p57, p27, p15, geny supresorów nowotworowych: pRb, p53 czy p63, p73. Zauważono też, że do starzenia dochodziło również na skutek wprowadzenia genów kodujących stale aktywne formy kinaz RAF-1 i MKK, a także po poddaniu komórek działaniu czynników różnicujących, takich jak np. pochodne witaminy A (RONINSON 2003, RONINSON i DOKMANOVIC 2003). Inne badania wskazują na to, że w komórkach nowotworowych białka takie jak p53, p21, p16 są pozytywnymi regulatorami procesu starzenia komórkowego, ale nie są niezbędne do jego indukcji. Wskazuje to na fakt, iż istnieją alternatywne ścieżki przesyłania sygnału prowadzące do starzenia komórek nowotworowych. Badania z użyciem tkanek pobranych od pacjentów, którzy poddani byli chemioterapii wykazały, iż do starzenia komórek nowotworowych dochodzi także podczas leczenia. Co więcej, badania przeprowadzone na myszach dowiodły, że proces starzenia komórkowego może determinować skuteczność terapii (SCHMITT i współaut. 2002).

W komórkach nowotworowych, które uległy starzeniu komórkowemu, tak samo jak w komórkach prawidłowych, dochodzi do zatrzymania proliferacji, co jest niezwykle pożądanym efektem terapii przeciwnowotworowej i może prowadzić do ograniczenia wzrostu guza. Ponadto, stare komórki nowotworowe wydzielają szereg chemokin, które mobilizują komórki układu odpornościowego, przyczyniając się do eliminacji komórek guza (IANNELLO i współaut. 2013, XUE i współaut. 2007).

Podsumowując, starzenie komórkowe stanowi barierę przeciwnowotworową, a także często sprzyja powodzeniu terapii przeciwnowotworowych, czego dowodem są m.in. badania prowadzone przez HAUGSTETTERA i współaut. (2010), pokazujące korelację pomiędzy obecnością ulegających starzeniu komórek nowotworowych raka okrężnicy a dłuższą przeżywalnością pacjentów poddanych chemioterapii. Z drugiej strony, należy brać pod uwagę ryzyko, że komórki nowotworowe, które uległy starzeniu komórkowemu indukowanemu stresem mogą odzyskać zdolność do ponownych podziałów (ŚLIWINSKA i współaut. 2009, MOSIENIAK i współaut. 2015). Pomimo tego uważa się, iż starzenie



komórek nowotworowych, do którego indukcji wykorzystywać można kilka ścieżek molekularnych, stanowi interesujący cel terapii przeciwnowotworowych, niosący ze sobą wiele nadziei, ale wymagający jeszcze wielu badań.

### OKSYDAZY NADPH A HAMOWANIE PROLIFERACJI I STARZENIE KOMÓRKOWE

Jak wspomniano wcześniej, podwyższony poziom oksydaz NADPH może odgrywać istotną rolę w transformacji nowotworowej i w rozwoju nowotworu. Z tego względu podjęto badania mające na celu określenie wpływu inhibitora oksydaz (chlorek difenylonodionoiowy, DPI) na komórki nowotworowe.

Wykazano, że podanie DPI hamuje proliferację komórek nowotworowych raka okrężnicy (DOROSHOW i współaut. 2013). Co ważniejsze, podobny efekt zaobserwowano w badaniach prowadzonych na mysich modelach nowotworzenia, w których wzrost guzów był badany *in vivo*. SCAIFE (2005) w badaniach prowadzonych na komórkach nowotworowych raka piersi MCF-7 zaobserwował, że komórki zatrzymane na 48h w cyklu komórkowym po podaniu DPI, nie wznawiają proliferacji nawet jeśli są hodowane przez kilka dni w pożywce bez inhibitora. Jednak nie wykazano obecności komórek ulegających starzeniu w badanym modelu. SONG i współaut. (2008) zauważyli, że DPI blokuje przejście komórek z fazy G1 do fazy S. Zaś badania VENKATACHALAMA i współaut. (2008) dowiodły, że obserwowany efekt wpływu DPI na przechodzenie z fazy G1 do S może wynikać z hamującego wpływu właśnie na oksydazy NADPH. Podobnie DROSHOW i współaut. (2012) w pracy opisującej wpływ DPI na komórki nowotworowe (60 różnych linii) wykazali, że niższe dawki inhibitora przyczyniają się do hamowania cyklu komórkowego w fazie G1. Z kolei, zarówno HONG i współaut. (2007), jak i SCAIFE (2005) twierdzili, że podanie DPI prowadzi do zahamowania cyklu komórkowego w fazie G2. Efekt ten może być spowodowany zarówno opóźnionym przejściem z fazy G2 do M, tak jak to opisano w pracy VENKATACHALAMA i współaut. (2008), jak i przyspieszonym wyjściem z fazy M, który następuje bez prawidłowo zakończonego podziału mitotycznego i prowadzi do wejścia komórek w fazę tzw. tetraploidalnego G1 (4NG1), co przedstawiono w pracy SCAIFEGO (2004).

Należy jednak zauważyć, że stosowany powszechnie w wielu modelach eksperymentalnych inhibitor NOX-DPI, nie jest specyficzny tylko dla tych enzymów, ale działa również na inne flawoenzymy obecne w ko-

mórcie. Co istotne, niedawno opublikowane wyniki badań dowodzą, że zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych po podaniu DPI może wynikać z wpływu tego związku na łańcuch oddechowy, szczególnie na aktywność kompleksu I (OZSVARI i współaut. 2017). Dlatego na uwagę zasługują prace, w których specyficznym obniżono poziom ekspresji wybranych oksydaz NADPH. SHIMADA i współaut. (2011), prowadząc badania na liniach komórek nowotworowych raka pęcherza wykazali, że obniżenie poziomu NOX4 prowadziło do zahamowania ich proliferacji *in vitro* oraz ograniczało wzrost guza w badaniach prowadzonych na zwierzętach. Podobne wyniki uzyskano wykorzystując do badań komórki raka okrężnicy. W tym wypadku zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych było związane z obniżeniem poziomu NOX1 (WANG i współaut. 2011).

Podsumowując, wiele prac wskazuje, że hamowanie aktywności oksydaz NADPH może być atrakcyjnym celem w terapii przeciwnowotworowej. Wciąż brakuje jednak bezpośrednich dowodów świadczących o tym, że komórki nowotworowe ulegają starzeniu komórkowemu w wyniku zahamowania aktywności lub obniżeniu poziomu NOX. W świetle uzyskanych przez nas wyników (PRZYBYLSKA i współaut. 2016) dowodzących, że zarówno podanie DPI, jak i wyciszenie ekspresji genu kodującego NOX4 w ludzkich komórkach mięśni gładkich aorty prowadzi do starzenia komórkowego, możemy przypuszczać, że opisywane w literaturze długotrwałe zahamowanie podziałów komórek nowotworowych po podaniu inhibitorów oksydaz lub obniżeniu ich poziomu może również indukować starzenie.

### PODSUMOWANIE

Oksydazy NADPH to enzymy występujące specyficznym w określonych tkankach, zarówno prawidłowych, jak i tych, które zmienione są nowotworowo. Przez produkowane reaktywne formy tlenu biorą udział w licznych, istotnych procesach. Ich związek z procesem starzenia komórkowego prowadzącym do trwałego zahamowania proliferacji sprawia, że stanowią one interesujący cel poszukiwań dotyczących terapii przeciwnowotworowych.

#### Streszczenie

Oksydazy NADPH (NOX) są grupą enzymów występujących zarówno w prawidłowych, jak i nowotworowo zmienionych tkankach. Produkowane przez nie reaktywne formy tlenu (RFT) biorą udział w wielu istotnych procesach występujących w komórce. Zauważono związek aktywności NOX z procesem starzenia. Starzenie komórkowe to proces niezwykle interesujący i występujący powszechnie w organizmie ludzkim. Związane jest z trwałym zahamowaniem proliferacji, a w zdrowych

komórkach stanowi barierę przeciwnowotworową. Pewne warunki prowadzą do przyspieszonego starzenia komórek nowotworowych, co stanowi atrakcyjny cel terapii przeciwnowotworowych. Związek oksydaz NADPH z procesem starzenia komórkowego może być interesującym celem badań nad terapiami przeciwnowotworowymi.

## LITERATURA

- ALSTER O., KORWEK Z., 2014. *Znaczniki starzenia komórkowego*. Post. Biochem. 60, 138-46.
- ARBISER J. L., PETROS J., KLAFTER R., GOVINDAJARAN B., MCLAUGHLIN E. R., BROWN L. F., COHEN C., MOSES M., KILROY S., ARNOLD R. S., LAMBETH J. D., 2002. *Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 715-720.
- BAKER D. J., WIJSHAKE T., TCHKONIA T., LEBRASSEUR N. K., CHILDS B. G., SLUIS B., KIRKLAND J. L., DEURSEN J. M., 2012. *Clearance of p16<sup>INK4a</sup> - positive senescent cells delays ageing - associated disorders*. Nature 479, 232-236.
- BAKER D. J., CHILDS B. G., DURIK M., WIJERS M. E., SIEBEN C. J., ZHONG J., SALTNESS R. A., JEGANATHAN K. B., VERZOSA G. C., PEZESHKI A., KHAZAIE K., MILLER J. D., VAN DEURSEN J. M., 2016. *Naturally occurring p16<sup>INK4a</sup>-positive cells shorten healthy lifespan*. Nature 530, 184-189.
- BEDARD K., KRAUSE K. H., 2007. *The NOX Family of ROS-generating NADPH oxidases :physiology and pathophysiology*. Physiol. Rev. 87, 245-313.
- BIELAK-ŻMIJEWSKA A., GRABOWSKA W., PRZYBYLSKA D., 2014. *Rola starzenia komórkowego w starzeniu organizmu i chorobach związanych z wiekiem*. Post. Biochem. 60, 147-160.
- BLOCK K., GORIN Y., 2012. *Aiding and abetting roles of NOX oxidases in cellular transformation*. Nat. Rev. Cancer 12, 627-637.
- CAILLOU B., DUPUY C., LACROIX L., NOCERA M., TALBOT M., OHAYON R., DEME D., BIDART J. M., SCHLUMBERGER M., VIRION A., 2001. *Expression of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (Nox, LNOX, Duox) genes and proteins in human thyroid tissues*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 86, 3351-3358.
- CHANG B. D., BROUDE E. V., DOKMANOVIC M., ZHU H., RUTH A., XUAN Y., KANDEL E. S., LAUSCH E., CHRISTOV K., RONINSON I. B., 1999. *A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents*. Cancer Res. 59, 3761-3767.
- CHEN K., KIRBER M. T., XIAO H., YANG Y., KEANEY J. F., 2008. *Regulation of ROS signal transduction by NADPH oxidase 4 localization*. J. Cell Biol. 181, 1129-1139.
- CHENG G., RITSICK D., LAMBETH J. D., 2004. *Nox3 regulation by NOXO1, p47phox, and p67phox*. J. Biol. Chem. 279, 34250-34255.
- COLLADO M., SERRANO M., 2006. *The power and the promise of oncogene-induced senescence markers*. Nat. Rev. Cancer 6, 472-476.
- CROSS A. R., SEGAL A. W., 2004. *The NADPH oxidase of professional phagocytes - prototype of the NOX electron transport chain systems*. Biochim. Biophys. Acta 1657, 1-22.
- DOROSHOW J. H., JUHASZ A., GE Y., HOLBECK S., LU J., ANTONY S., WU Y., JIANG G., ROY K., 2012. *Antiproliferative mechanisms of action of the flavin dehydrogenase inhibitors diphenylene iodonium and di-2-thienyliodonium based on molecular profiling of the NCI-60 human tumor cell panel*. Biochem. Pharmacol. 83, 1195-1207.
- DOROSHOW J. H., GAUR S., MARKEL S., LU J., VAN BALGOOY J., SYNOLD T. W., XI B., WU X., JUHASZ A., 2013. *Effects of iodonium- class flavin dehydrogenases inhibitors on growth, reactive oxygen species production, cell cycle progression, NADPH oxidase 1 levels, and gene expression in human colon cancer cells and xenografts*. Free Radic. Biol. Med. 57, 162-175.
- FUMAGALLI M., ROSSIELLO F., CLERICI M., BAROZZI S., CITTARO D., KAPLUNOV J. M., BUCCI G., DOBREVA M., MATTI V., BEAUSEJOUR C. M., HERBIG U., LONGHESE M. P., D'ADDA DI FAGAGNA F., 2012. *Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation*. Nat. Cell Biol. 14, 355-365.
- GEORGAKOPOULOU E. A., TSIMARATOU K., EVANGELOU K., FERNANDEZ MARCOS P. J., ZOUMPOURIS V., TROUGAKOS I. P., KLETAS D., BARTEK J., SERRANO M., GORGOLIS V. G., 2013. *Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues*. Aging 5, 37-50.
- GREIDER C. W., BLACKBURN E. H., 1985. *Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts*. Cell 43, 405-13.
- HAUGSTETTER A. M., LODDENKEMPER C., LENZE D., GRÖNE J., STANDFUSS C., PETERSEN I., DÖRKEN B., SCHMITT C. A., 2010. *Cellular senescence predicts treatment outcome in metastasised colorectal cancer*. Br. J. Cancer 103, 505-509.
- HAYFLICK L., MOORHEAD P. S., 1961. *The serial cultivation of human diploid cell strains*. Exp. Cell Res. 25, 585-621.
- HONG J., KANG M. K., SONG J. D., PARK Y. C., 2007. *NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium induces p53 expression and cell cycle arrest in several cancer cell lines*. J. Life Sci. 17, 778-782.
- IANNELLO A., THOMPSON T. W., ARDOLINO M., LOWE S. W., RAULET D. H., 2013. *p53-dependent chemokine production by senescent tumor cells supports NKG2D-dependent tumor elimination by natural killer cells*. J. Exp. Med. 210, 2057-2069.
- JUHASZ A., GE Y., MARKEL S., CHIU A., MATSUMOTO L., VAN BALGOOY J., ROY K., DOROSHOW J. H., 2009. *Expression of NADPH oxidase homologues and accessory genes in human cancer cell lines, tumours and adjacent normal tissues*. Free Radic. Res. 43, 523-532.
- KODAMA R., KATO M., FURUTA S., UENO S., ZHANG Y., MATSUNO K., YABE-NISHIMURA C., TANAKA E., KAMATA T., 2012. *ROS-generating oxidases Nox1 and Nox4 contribute to oncogenic Ras-induced premature senescence*. Genes Cells 18, 32-41.
- KOZIEL R., PIRCHER H., KRATOCHWIL M., LENER B., HERMANN M., DENCHER N. A., JANSEN-DUERR P., 2013. *Mitochondrial respiratory chain complex I is inactivated by NADPH oxidase Nox4*. Biochem. J. 452, 231-239.
- LENER B., KOZIEL R., PIRCHER H., HÜTTER E., GREUSSING R., HERNDLER-BRANDSTETTER D., HERMANN M., UNTERLUGAUER H., JANSEN-DÜRR P., 2009. *The NADPH oxidase Nox4 restricts the replicative lifespan of human endothelial cells*. Biochem. J. 423, 363-374.
- LOU Y. W., CHEN Y. Y., HSU S. F., CHEN R. K., LEE C. L., KHOO K. H., TONKS N. K., MENG T.

- C., 2008. *Redox regulation of the protein tyrosine phosphatase PTP1B in cancer cells*. FEBS J. 275, 69-88.
- MITSUSHITA J., LAMBETH J. D., KAMATA T., 2004. *The superoxide-generating oxidase Nox1 is functionally required for Ras oncogene transformation*. Cancer Res. 64, 3580-3585.
- MOSIENIAK G., STRZESZEWSKA A., 2014. *Rola starzenia komórkowego w kancerogenezie i terapii przeciwnowotworowej*. Post. Biochem. 60,194-206.
- MOSIENIAK G., SLIWINSKA M. A., ALSTER O., STRZESZEWSKA A., SUNDERLAND P., PIECHOTA M., WAS H., SIKORA E., 2015. *Polyploidy formation in doxorubicin-treated cancer cells can favor escape from senescence*. Neoplasia 17, 882-893.
- OBERLEY L. W., OBERLEY T. D., BUETTNER G. R., 1981. *Cell division in normal and transformed cells: the possible role of superoxide and hydrogen peroxide*. Med. Hypotheses 7, 21-42.
- OZSVARI B., BONUCCELLI G., SANCHEZ-ALVAREZ R., FOSTER R., SOTGIA F., LISANTI M. P., 2017. *Targeting flavin-containing enzymes eliminates cancer stem cells (CSCs), by inhibiting mitochondrial respiration: Vitamin B2 (Riboflavin) in cancer therapy*. Aging 9, 2610-2628.
- PARK H. S., LEE S. H., PARK D., LEE J. S., RYU S. H., LEE W. J., RHEE S. G., BAE Y. S., 2004. *Sequential activation of phosphatidylinositol 3-kinase, beta Pix, Rac1, and Nox1 in growth factor-induced production of H2O2*. Mol. Cell. Biol. 24, 4384-4394.
- PERVAIZ S., CLEMENT M. V., 2002. *A permissive apoptotic environment: function of a decrease in intracellular superoxide anion and cytosolic acidification*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 290, 1145-1150.
- PRZYBYLSKA D., MOSIENIAK G., 2014. *Rola oksydazy NADPH NOX4 w regulacji procesów proliferacji, starzenia i różnicowania komórek*. Post. Biochem. 60, 69-76.
- PRZYBYLSKA D., JANISZEWSKA D., GOZDZIK A., BIELAK-ZMIJEWSKA A., SUNDERLAND P., SIKORA E., MOSIENIAK G., 2016. *NOX4 downregulation leads to senescence of human vascular smooth muscle cells*. Oncotarget 7, 66429-66443.
- RAY P. D., HUANG B. W., TSUJI Y., 2012. *Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling*. Cell Signal. 24, 981-990.
- RONINSON I. B., 2003. *Tumor cell senescence in cancer treatment*. Cancer Res. 63, 2705-2715.
- RONINSON I. B., DOKMANOVIC M., 2003. *Induction of senescence-associated growth inhibitors in the tumor-suppressive function of retinoids*. J. Cell Biochem. 88,83-94.
- ROY K., WU Y., MEITZLER J. L., JUHASZ A., LIU H., JIANG G., LU J., ANTONY S., DOROSHOW J. H., 2015. *NADPH oxidases and cancer*. Clin. Sci. 128, 863-875.
- SCAIFE R. M., 2004. *G2 cell cycle arrest, down-regulation of cyclin B, and induction of mitotic catastrophe by the flavoprotein inhibitor diphenyleneiodonium*. Mol. Cancer Ther. 3, 1229-1237.
- SCAIFE R. M., 2005. *Selective and irreversible cell cycle inhibition by diphenyleneiodonium*. Mol. Cancer Ther. 4, 876-884.
- SCHMITT C. A., FRIDMAN J. S., YANG M., LEE S., BARANOV E., HOFFMAN R. M., LOWE S. W., 2002. *A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy*. Cell 109, 335-346.
- SEDELNIKOVA O. A., REDON C. E., DICKEY J. S., NAKAMURA A. J., GEORGAKILAS A. G., BONNER W. M., 2010. *Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis*. Mutat. Res. 704, 152-159.
- SERRANO M., LIN A. W., MCCURRACH M. E., BEACH D., LOWE S. W., 1997. *Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a*. Cell 88, 593-602.
- SHAY J. W., BACCHETTI S., 1997. *A survey of telomerase activity in human cancer*. Eur. J. Cancer 33, 787-791.
- SHIMADA K., FUJII T., ANAI S., FUJIMOTO K., KONISHI N., 2011. *ROS generation via NOX4 and its utility in the cytological diagnosis of urothelial carcinoma of the urinary bladder*. BMC Urol. 11, 22.
- SONG J. D., KIM K. M., KIM K. H., KIM C. D., KIM J. M., YOO Y. H., PARK Y. C., 2008. *Differential role of diphenyleneiodonium, a flavoenzyme inhibitor, on p53-dependent and -independent cell cycle progression*. Int. J. Oncol. 33, 1299-1306.
- SPENCER N. Y., YAN Z., BOUDREAU R. L., ZHANG Y., LUO M., LI Q., TIAN X., SHAH A. M., DAVISSON R. L., DAVIDSON B., BANFI B., ENGELHARDT J. F., 2011. *Control of hepatic nuclear superoxide production by glucose 6-phosphate-dehydrogenase and NADPH oxidase-4*. J. Biol. Chem. 286, 8977-8987.
- STRZESZEWSKA A., ALSTER O., MOSIENIAK G., CIOLKO A., SIKORA E., 2018. *Insight into the role of PI3K family members and NF-κB in DNAdamage-induced senescence and senescence-associated secretory phenotype of colon cancer cells*. Cell Death Dis. 9, 44
- STURROCK A., HUECKSTEADT T. P., NORMAN K., SANDERS K., MURPHY T. M., CHITANO P., WILSON K., HOIDAL J. R., KENNEDY T. P., 2007. *Nox4 mediates TGF-beta1-induced retinoblastoma protein phosphorylation, proliferation, and hypertrophy in human airway smooth muscle cells*. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 292, L1543-L1555.
- SZATROWSKI T. P., NATHAN C. F., 1991. *Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells*. Cancer Res. 51, 794-798.
- ŚLIWIŃSKA M. A., MOSIENIAK G., WOLANIN K., BABIK A., PIWOŃKA K., MAGALSKA A., SZCZEPANOWSKA J., FRONK J., SIKORA E., 2009. *Induction of senescence with doxorubicin leads to increased genomic instability of HCT116 cells*. Mech. Ageing Dev. 130, 24-32.
- UENO N., TAKEYA R., MIYANO K., KIKUCHI H., SUMIMOTO H., 2005. *The NADPH oxidase Nox3 constitutively produces superoxide in a p22phox-dependent manner: its regulation by oxidase organizers and activators*. J. Biol. Chem. 280, 23328-23339.
- VENKATACHALAM P., DE TOLEDO S. M., PANDEY B. N., TEPHLY L. A., CARTER A. B., LITTLE J. B., SPITZ D. R., AZZAM E. I., 2008. *Regulation of normal cell cycle progression by flavin-containing oxidases*. Oncogene 27, 20-31.
- WANG R., DASHWOOD W. M., NIAN H., LÖHR C. V., FISCHER K. A., TSUCHIYA N., NAKAGAMA H., ASHKTORAB H., DASHWOOD R. H., 2011. *NADPH oxidase overexpression in human colon cancers and rat colon tumors induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)*. Int. J. Cancer 128, 2581-2590.
- WATSON J. D., 1972. *Origin of concatemeric T7 DNA*. Nat. New Biol. 239,197-201.
- WEYEMI U., LAGENTE-CHEVALLIER O., BOUFRAQECH M., PRENOIS F., COURTIN F., CAILLOU B., TALBOT M., DARDALHON M., AL GHUZLAN A., BIDART J. M., SCHLUMBERGER M., DUPUY C., 2011. *ROS-generating NADPH oxidase NOX4*

- is a critical mediator in oncogenic H-Ras-induced DNA damage and subsequent senescence. *Oncogene* 31, 1117-1129.
- WU Y., ANTONY S., HEWITT S. M., JIANG G., YANG S. X., MEITZLER J. L., JUHASZ A., LU J., LIU H., DOROSHOW J. H., ROY K., 2013. *Functional activity and tumor-specific expression of dual oxidase 2 in pancreatic cancer cells and human malignancies characterized with a novel monoclonal antibody*. *Int. J. Oncol.* 42, 1229-1238.
- XUE W., ZENDER L., MIETHING C., DICKINS R. A., HERNANDO E., KRIZHANOVSKY V., CORDON-CARDO C., LOWE S. W., 2007. *Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas*. *Nature* 445, 656-660.
- YAMAURA M., MITSUSHITA J., FURUTA S., KINIWA Y., ASHIDA A., GOTO Y., SHANG W. H., KUBODERA M., KATO M., TAKATA M., SAIDA T., KAMATA T., 2009. *NADPH oxidase 4 contributes to transformation phenotype of melanoma cells by regulating G2-M cell cycle progression*. *Cancer Res.* 69, 2647-2654.

**KOSMOS Vol. 68, 1, 133–144, 2019**

KATARZYNA PISZCZATOWSKA, GRAŻYNA MOSIENIAK

*Laboratory of Molecular Bases of Ageing, Nencki Institute of Experimental Biology PAS, Pasteura 3, 09-093 Warszawa, E-mail: g.mosieniak@nencki.gov.pl*

#### NADPH OXIDASES AS A PROMISING TARGET FOR ANTICANCER THERAPY

##### Summary

NADPH oxidases (NOX) are group of enzymes occurring in healthy and tumor altered tissues. Reactive oxygen species (ROS) which are produced by them take part in many essential processes in the cell. Connection between NOX activity and senescence was observed. Senescence is an extremely interesting and commonly occurring process in human organism. It is associated with irreversible inhibition of cell proliferation and in healthy cells may act as an anticancer barrier. Under some circumstances premature senescence of cancer cells may occur, what makes it attractive aim of studies towards development of anticancer therapies.

Key words: senescence, hallmarks of senescent cell, anticancer therapies, reactive oxygen species, NADPH oxidases