



Politechnika  
Śląska

**Politechnika Śląska**

**Wydział Automatyki, Elektroniki i Informatyki**

**Małgorzata Adamiec-Organiściok**

**Regulacja programowanej i nieprogramowanej śmierci  
komórkowej w różnych liniach komórkowych**

Rozprawa doktorska napisana pod kierunkiem  
Dr hab. n. med. Magdaleny Skoniecznej, Prof. PŚ  
i promotora pomocniczego  
dr. inż. Romana Jaksika

Gliwice, 2023



*Ferroptoza, imię tak śmiałe,  
Śmierć wykuta w uścisku żelaza,  
Tak cicho, a jednak tak szybko i pewnie,  
Sposób na zakończenie uroku komórki.*

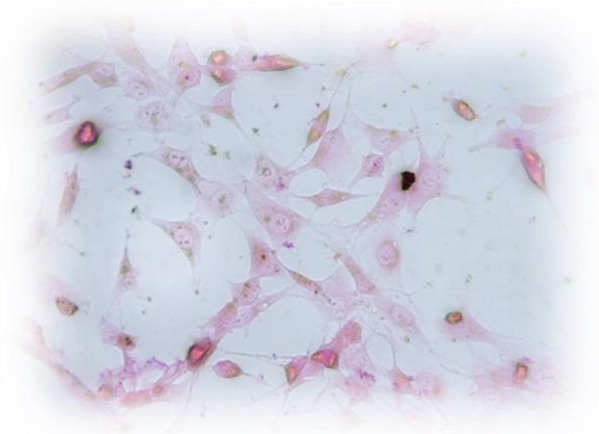
*Szelest potęgi metalu,  
Powolna, ale stała utrata światła,  
Iskra zgasła, nigdy nie widziana,  
Spokojna śmierć, nie tak obsceniczna.*

*Żelazo uchwycone cichymi pazurami,  
Los, który tworzy bez aplauzu,  
Śmierć tak potężna, że nikt nie może oszukać,  
Ciemność, której nikt nie może pokonać.*

*A jednak w tym żelaznym panowaniu  
Tam leży piękno, tak tajemnicze,  
Śmierć, która uwalnia ducha,  
Zamknięcie poszukiwane przez wieczność.*

*Więc słuchaj teraz, do tego nieznanego losu,  
Bo ferroptoza to życie stracone,  
Ostateczne wyjście - choć wydaje się okrutne,  
Uwolnienie ze świata marzeń.*

*ChatGPT 2023*





*Niniejsza rozprawa powstała dzięki pomocy wielu osób, którym chciałabym w tym miejscu złożyć serdecznie podziękowania.*

*Przede wszystkim mojej promotorki - dr hab. Magdalenie Skoniecznej, prof. PŚ, za opiekę, profesjonalizm, wsparcie, przekazaną wiedzę i wszelką pomoc, którą otrzymywałam już od rozpoczęcia realizacji pracy inżynierskiej. Dziękuję za wiele godzin konsultacji... zarówno fizycznych, jak i telefonicznych. Za rozmowy na naukowe, jak i te prywatne, tysiące kartek z zapiskami i schematami, niezliczone maile i wiarę w moje możliwości.*



*Dziękuję Prof. dr. hab. Andrzejowi Świerniakowi za pomoc w przyjęciu na doktorat,  
opiekę i wsparcie merytoryczne przez cały okres studiów.*

*Dziękuję też dr Darii Gendosz de Carillo ze Śląskiego Uniwersytetu Medycznego za  
współpracę, podsuniecie licznych pomysłów, wspólne eksperymenty, wiele godzin  
rozmów oraz pomoc w uzyskaniu części wyników i ich interpretacji.*

*Dr. Romanowi Jaksikowi za pomoc w bioinformatycznym ujęciu wyników z niniejszej  
pracy.*

*Współpracownikom z Katedry Inżynierii i Biologii Systemów oraz Centrum Biotechnologii  
Politechniki Śląskiej za wieloletnią pomoc i życzliwość.*

*Dr. Damianowi Sojce, za pomoc merytoryczną, niezliczone rozmowy naukowe, jak  
również te mniej formalne.*

*Chciałabym też podziękować Studentom, którzy pomogli mi w przeprowadzeniu części  
eksperymentów. Bez nich nie udałoby się zweryfikować tak wielu aspektów tej rozprawy.*

*W szczególności dziękuję Łukaszowi Cienciale, Kindze Gawron i Magdalenie Węgrzyn  
za niezliczone godziny spędzone w hodowli komórkowej, przy mikroskopie,  
termocyklerze oraz za wiarę w momentach, kiedy ją traciłam.*





*Pragnę również podziękować Mężowi i Rodzicom za to, że wytrzymywali ze mną  
zwłaszcza na końcowym etapie pisania tej pracy, za cierpliwość, wsparcie i wiarę w  
moje możliwości.*



## Spis treści

Wykaz niektórych skrótów .....	14
Streszczenie w języku polskim.....	17
Streszczenie w języku angielskim.....	19
1. Wprowadzenie .....	20
1.1 Potencjał redoks.....	20
1.2 Wolne rodniki.....	21
1.2.1 Reaktywne formy tlenu (RFT).....	22
1.2.1.1 Anionorodnik ponadtlenkowy.....	24
1.2.1.2 Nadtlenek wodoru.....	24
1.2.2 Reaktywne formy azotu .....	25
1.2.2.1 Tlenek azotu.....	25
1.3 Antyoksydanty .....	25
1.3.1 Glutation.....	26
1.3.2 Tioredoksyna .....	27
1.3.3 FSP1.....	29
1.4 Rola żelaza w potencjale redoks .....	29
1.5 Peroksydacja lipidów .....	30
1.6 Śmierć komórkowa.....	31
1.6.1 Przypadkowa śmierć komórkowa.....	33
1.6.1.1 Nekroza .....	33
1.6.2 Regulowana śmierć komórkowa .....	33
1.6.2.1 Programowana śmierć komórki.....	34
1.6.2.2 Apoptoza.....	34
1.6.2.3 Autofagia.....	35
1.6.2.4 Piroptoza.....	36
1.6.2.5 Ferroptoza .....	37
1.7 Edycja genomu metodą CRISPR Cas9 .....	39
1.8 Efekt sąsiedztwa (Bystander Effect).....	41
1.9 Tablica decyzyjna.....	42
2. Hipoteza i cele pracy .....	44
2.1 Hipoteza.....	44
2.2 Cel pracy.....	44

2.2.1	Szczegółowe cele pracy.....	45
3.	Materiały i metody.....	46
3.1	Hodowla <i>in vitro</i> , linie komórkowe.....	46
3.1.1	Induktor śmierci – erastyna.....	47
3.2	Oznaczenie żywotności komórek.....	48
3.3	Pomiary i analiza cytometryczna.....	49
3.3.1	Analiza cyklu komórkowego.....	49
3.3.2	Analiza śmierci apoptotycznej .....	49
3.3.3	Analiza Reaktywnych form tlenu .....	50
3.3.4	Analiza anionorodnika ponadtlenkowego .....	50
3.3.5	Analiza tlenu azotu .....	50
3.3.6	Flowing softwerc.....	51
3.4	Badanie zmian ekspresji genów.....	51
3.4.1	Izolacja całkowitego RNA.....	51
3.4.2	Odwrotna transkrypcja .....	52
3.4.3	Real-time-qPCR.....	52
3.5	Oznaczenie wewnątrzkomórkowego żelaza .....	55
3.6	Badanie zmian ekspresji białek (metoda western blot).....	55
3.7	Badanie poziomu totalnego glutationu w komórce (GSH/GSSG).....	56
3.8	Oznaczenia zmian w mitochondrialnym potencjale błonowym $\Delta\Psi_m$ .....	57
3.9	Ocena zmian masy mitochondrialnej.....	57
3.10	Mikroskopia TEM.....	58
3.11	Analiza poziomu oksydacji lipidów.....	59
3.12	Mikroskopia konfokalna .....	59
3.13	Efekt sąsiedztwa (Bystander Effect).....	60
3.14	Edycja genomu metodą CRISPR/Cas9.....	60
3.15	PCR ilościowy.....	62
3.16	Analiza bioinformatyczna baz danych .....	62
3.17	Analiza statystyczna.....	63
3.17.1	Test Q.....	63
3.17.2	Test T.....	64
3.17.3	Współczynnik korelacji Pearsona.....	64
4.	Wyniki.....	65
4.1	Żywotność komórkowa i odpowiedź mitochondrialna .....	65

4.2	Cykl komórkowy .....	67
4.3	Śmierć apoptotyczna i nekrotyczna.....	68
4.4	Poziom reaktywnych form tlenu .....	70
4.4.1	Poziom anionordnika ponadtlenkowego.....	71
4.4.2	Poziom tlenu azotu.....	72
4.5	Ekspresja genów odpowiedzialnych za przełączanie się typów śmierci .....	72
4.5.1	Ferropototyczny szlak peroksydacji lipidów .....	73
4.5.1.1	TFRC.....	73
4.5.1.2	ACSL4.....	77
4.5.1.3	FSP1 .....	79
4.5.1.4	PROM2 .....	80
4.5.2	Szlak SLC7A11/GPX4 .....	82
4.5.2.1	SLC7A11 .....	83
4.5.2.2	GPX4.....	84
4.6	Ekspresja ferropototycznych białek śmierci.....	91
4.6.1	GPX4 .....	92
4.6.2	FACL4 .....	93
4.7	Poziom totalnego glutationu w komórce (GSH/GSSG) .....	94
4.8	Potencjał mitochondrialny.....	95
4.9	Masa mitochondrialna.....	96
4.10	Analiza obrazów mikroskopowych.....	97
4.11	Poziom oksydacji lipidów.....	99
4.12	Edycja genomu metodą CRISPR .....	100
4.12.1	Test MTT .....	101
4.13	Efekt sąsiedztwa (Bystander Effect).....	103
4.14	Tablica decyzyjna.....	107
4.15	Analiza sieci zależności regulacyjnych między genami markerowymi .....	112
4.16	Korelacje .....	117
5.	Dyskusja .....	118
6.	Podsumowanie.....	128
9.	Bibliografia.....	133
10.	Dorobek naukowy autora .....	143
	Pełne artykuły naukowe .....	143
	Monografie .....	144

## Wykaz niektórych skrótów

$\Delta\Psi_m$  - transbłonowy potencjał mitochondrialny;

ATP - Adenozyno-5'-trifosforan;

APS – nadsiarczan amonu;

Cas9 - białko związane z CRISPR 9 (ang. *CRISPR associated protein 9*);

CRISPR – zgrupowane regularnie rozmieszczone krótkie powtórzenia palindromiczne (ang. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*);

CrRNA – transaktywujący RNA Crisp (tracrRNA) (ang. *trans-activating crisper RNA (tracrRNA)*)

DSB – pęknięcia dwuniciowe (ang. *doublestranded breaks*);

GPX – peroksydaza glutationowa;

GSH – glutation;

GSR – reduktaza glutationowa;

GSSG – disulfid glutationu;

HCT116 – komórki raka okrężnicy (ang. *colorectal colon cancer*);

HNH - domena endonukleazy nazwana od charakterystycznych reszt histydyny i asparaginy;

LPS - lipopolisacharyd;

MTT - 1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan, bromku 3-[4,5-dimetylotiazolo-2-ilo]-2,5-difenylotetrazolu (MTT)

NADPH – zredukowana forma dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego;

NADP+ – ester fosforanowy dinukleotydu;

NEM - N-etylomaleimid (ang. *N-ethylmaleimide*);

NO – tlenek azotu;

NOS – syntaza tlenku azotu (ang. *nitric oxide synthase*);

NOX – oksydazy NADPH;

NOXO1 - organizator 1 oksydazy NADPH (ang. *NADPH oxidase organizer 1*);

NRF2 - jądrowy czynnik erytroidalny 2 (ang. *nuclear factor erythroid 2*);

OXPPOS – mitochondrialny system fosforylacji oksydacyjnej (ang. *mitochondrial oxidative phosphorylation system*);

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> - anionorodnik ponadtlenkowy;

PAM – motyw sąsiadujący z sekwencją rozdzielającą, protoprzerywnikiem (ang. *protospacer adjacent motif*);

PBS - roztwór soli fizjologicznej;

PCR - reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*);

RCD – regulowana śmierć komórkowa (ang. *regulated cell death*);

RFA – reaktywne formy azotu (ang. *reactive nitrogen species, RNS*);

RFT – reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species, ROS*);

RPM, r.p.m. – obroty na minutę (ang. *rotate per minute*);

RuvC - rezolwaza, która rozszczepia złącze Hollidaya;

SDS - siarczan dodecyłu sodu;

sgRNA – pojedynczoniciowy wiodący RNA (ang. *single-guide RNA*);

TEMED - N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina.





## Streszczenie w języku polskim

Regulowana śmierć komórki (ang. *regulated cell death*, RCD), odgrywa znaczącą rolę w homeostazie organizmu, zarówno w stanach fizjologicznych, jak i patologicznych. Nadmierna lub niewystarczająca RCD może powodować choroby, takie jak neurodegeneracyjne czy nowotworowe. Śmierć komórek jest procesem wymaganym w przebiegu wielu procesów fizjologicznych, w tym podczas embriogenezy, rozwoju układu odpornościowego i niszczeniu uszkodzonych komórek. Regulowana śmierć komórkowa może przybrać różne formy, np. apoptozy, nekroptozy lub ferroptozy. Zrozumienie i poznanie ścieżek śmierci, jak również ich regulacji jest ważne zarówno z punktu naukowego, jak i medycznego do zastosowań leczniczych.

Zagadnienia przedstawione w rozprawie doktorskiej koncentrują się na badaniu przebiegu ferroptozy w różnych liniach komórkowych *in vitro*, a także procesach związanych z regulacją programowanej i nieprogramowanej śmierci komórkowej. Do tej pory w ramach podjętych prac badano wpływ różnych czynników, które odpowiadają za indukcję lub inhibicję ścieżek śmierci w komórkach. W literaturze można znaleźć opisane przypadki hamowania lub indukcji śmierci, poprzez dodanie specyficznych związków, tzw. regulatorów (induktorów lub inhibitorów ścieżek sygnałowych). W założeniach można sprawdzać zależności różnych czynników, chemicznych i fizycznych, takich jak promieniowanie UV czy jonizujące, IR (ang. *ionizing radiation*), w kombinacjach regulator-regulator; regulator-UV; regulator-IR, i określać ich wpływ na wybraną ścieżkę śmierci, a także zaobserwować skutki i efekty uboczne w komórkach sąsiadujących (ang. *bystander effect*). **Celem podjętych prac było scharakteryzowanie różnych ścieżek śmierci komórkowych oraz próba stworzenia systemu decyzyjnego regulacji ich indukcji/wyciszenia.** Komórki wykazywać mogą różną wrażliwość na dany rodzaj śmierci, jedne mogą być bardziej wrażliwe, a drugie odporne. Zależność ta ma kluczowe znaczenie w leczeniu nowotworów. Spośród badanych linii, dwie z nich wykazały oporność na indukcję śmierci, co potwierdzone zostało profilem ekspresji markerów molekularnych, poziomem oksydacji lipidów, analizą baz danych, jak i literaturowo. Komórki prawidłowe keratynocytów, HaCaT są odporne na indukcję ferroptozy, podobnie jak przewlekła białaczka, K562. Natomiast z komórek

nowotworowych największą wrażliwością na ferroptozę wykazały się komórki czerniaka z guza pierwotnego, 1205Lu.

## Streszczenie w języku angielskim

Regulated Cell Death (RCD) plays a significant role in the homeostasis of the organism, both in physiological and pathological states. Excessive or insufficient RCD can lead to diseases such as neurodegenerative or cancerous conditions. Cell death is a necessary process in many physiological processes, including embryogenesis, immune system development, and the elimination of damaged cells. Regulated cell death can take on various forms, such as apoptosis, necroptosis, or ferroptosis. Understanding and knowledge of these death pathways, as well as their regulation, is important for both scientific and medical applications.

The issues presented in the doctoral dissertation focus on the study of ferroptosis progression in different *in vitro* cell lines, as well as processes related to the regulation of programmed and non-programmed cell death. So far, the work has examined the impact of various factors that induce or inhibit death pathways in cells. The literature describes cases of inhibiting or inducing cell death by adding specific compounds, called regulators (inducers or inhibitors of signaling pathways). The assumptions allow for testing the relationships between various factors, both chemical and physical, such as UV or ionizing radiation (IR), in combinations of regulator-regulator; regulator-UV; regulator-IR, to determine their influence on a selected death pathway, as well as to observe the effects and side effects on neighboring cells (bystander effect). **The aim of the conducted work was to characterize different cell death pathways and attempt to create a decision-making system for regulating their induction/suppression.** Cells can exhibit different sensitivity to a specific type of death, with some being more sensitive and others more resistant. This dependency is crucial in cancer treatment. Among the tested cell lines, two have shown resistance to death induction, which was confirmed by the expression profile of molecular markers, lipid oxidation levels, database analysis, and literature. Normal keratinocyte cells, HaCaT, are resistant to ferroptosis induction, as well as chronic myeloid leukemia cells, K562. However, melanoma cells from the primary tumor, 1205Lu, showed the highest sensitivity to ferroptosis.

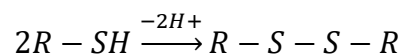
# 1. Wprowadzenie

Komórki są narażone na nieodwracalne zaburzenia w mikrośrodkowisku zarówno zewnątrz-, jak i wewnątrzkomórkowym, co może spowodować aktywację jednej z wielu kaskad transdukcji sygnałów prowadzących do ich śmierci [1,2]. W odpowiedzi na różne formy stresu, w szczególności stres oksydacyjny, śmierć komórki może przybierać różne formy. Regulowana śmierć komórki (RCD) odgrywa ważną rolę w homeostazie organizmu, zarówno w stanach fizjologicznych, jak i patologicznych. Brak kontroli nad regulacją pojedynczych lub mieszanych rodzajów śmierci komórek może powodować choroby, takie jak nowotwory, neurodegeneracje czy choroby autoimmunologiczne [3–5]. Regulowana śmierć komórki może przybierać różne formy, w tym apoptozy, nekroptozy lub ferroptozy [6].

## 1.1 Potencjał redoks

Zdrowie każdego człowieka zależy od wielu czynników, między innymi od równowagi wskaźnika redoks, czyli utrzymania podobnego poziomu pomiędzy procesami utleniania (oksydacji) oraz redukcji (antyoksydacji). Każda z komórek charakteryzuje się ściśle określonym stężeniem elektronów, tzw. stanem redoks, który znajdują się w różnych kompartmentach komórki. Wewnątrzkomórkowy potencjał redoks wpływa na funkcje komórkowe, a jego rozregulowanie wiąże się z procesami chorobowymi [7–9]. Stan redoks w warunkach fizjologicznych utrzymywany jest w wąskim zakresie, natomiast przy patologicznych warunkach stan redoks może ulec zmianie na wyższe lub niższe wartości.

W biologii wyróżnia się trzy systemy redoks, opierające się na małych molekułach, kofaktorach redoks oraz łańcuchach bocznych białek. Sulfhydrylowa grupa cysteiny łatwo ulega utlenieniu, tworząc cystynę.



Wzajemna przemiana występuje w kilku białkach redoks, m.in. w oksydazie ksantynowej czy tioredoksynie. Różnorodne małe cząsteczki, organiczne, jak i nieorganiczne, mogą działać w układach biologicznych, jako czynnik redoks. Dinukleotyd nikotynamidoadeninowy (NAD) oraz fosforan dinukleotydu

nikotynamidoadeninowego (NADP) biorą udział w wielu różnych biologicznych reakcjach redoks [10–12].

Sygnalizacja redoks jest procesem regulacyjnym i rozpoczyna się od zakłócenia homeostazy redoks, co może nastąpić w wyniku wzrost ilości reaktywnych form tlenu w komórce, RFT (ang. *reactive oxygen species*, ROS), albo poprzez spadek aktywności układów antyoksydacyjnych. Fizjologiczna regulacja redoks polega na regulowanym wzroście ilości wolnych rodników zarówno RFT, jak i reaktywnych formy azotu, RFA (ang. *reactive nitrogen speaces*, RNS), prowadząc do tymczasowego zaburzenia równowagi, następnie do jej wyrównania. Wybiórcze utlenianie, redukcja, jak również modyfikacje chemiczne tioli czujnikowych prowadzą do zmiany aktywności białka i transdukcji sygnału w wyniku fluktuacji redoks. Tirole białkowe są wysoko wrażliwe na nadtlenek wodoru czy tlenek azotu, przez co często stosowane są, jako czujniki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vivo* [9,13–15].

## 1.2 Wolne rodniki

Występowanie w materiałach biologicznych wolnych rodników odkryto po raz pierwszy około 70 lat temu (ok. 1954) [13,16]. Wolne rodniki zdefiniować można, jako fragmenty cząsteczek lub cząsteczki zawierające, co najmniej jeden niesparowany elektron. Wiele z nich jest wysoce reaktywnych i energetycznie niestabilnych, zachowując się jak reduktory lub utleniacze, ponieważ mogą zarówno przyjąć elektron, jak i oddać go innym cząsteczkom [9,17,18].

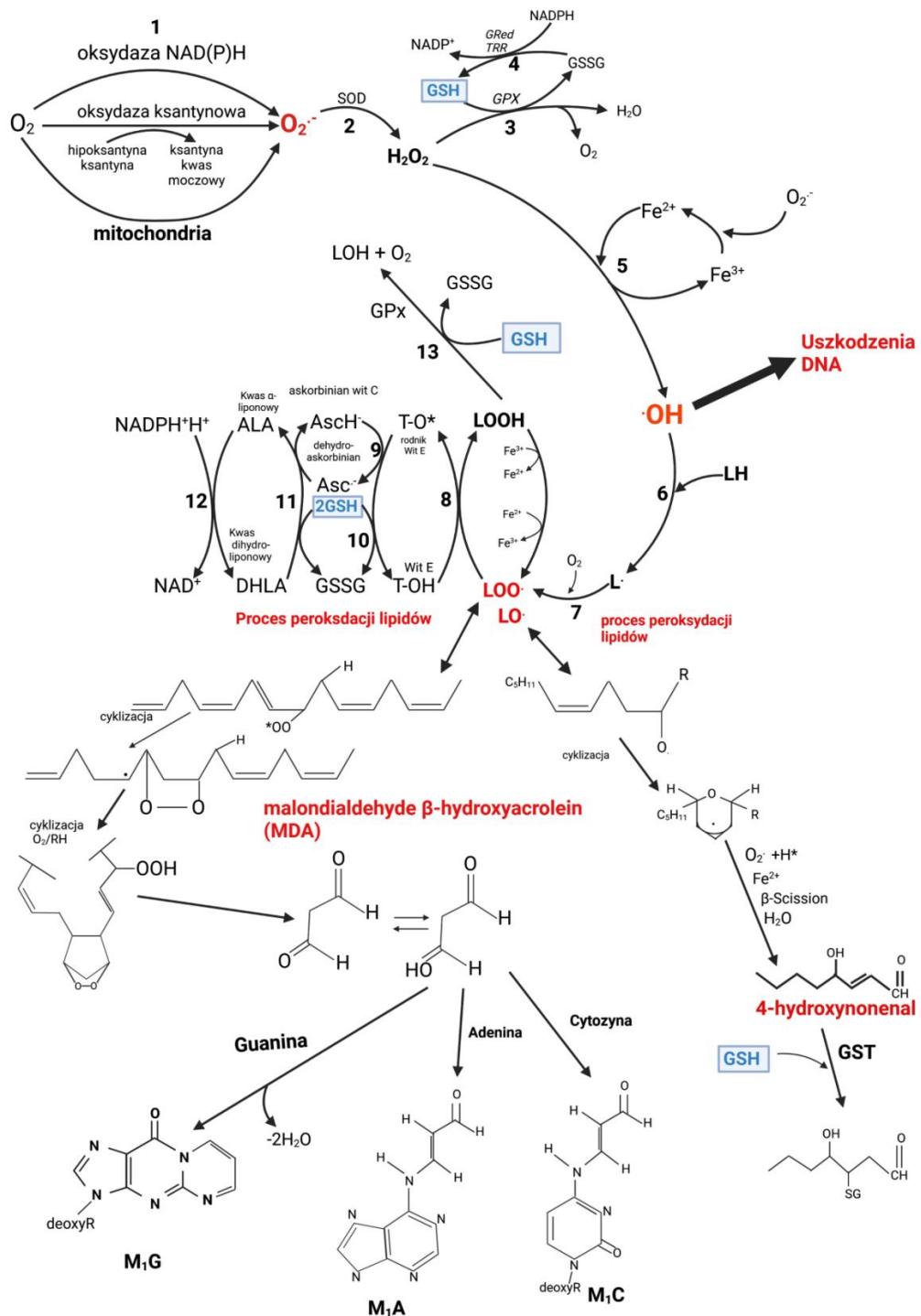
Głównymi źródłami wolnych rodników są źródła zewnętrzne, np. składniki dymu tytoniowego, promieniowanie UV, ozon, promieniowanie rentgenowskie czy zanieczyszczenia powietrza; mogą również pochodzić z naturalnych podstawowych przemian metabolicznych i reakcji biochemicznych [9,18]. Produkcja rodników zachodzi w wyniku jednoelektronowej redukcji cząsteczek tlenu; w komórce ok. 1-2 % tlenu nie przekształca się w wodę, a w reaktywne formy tlenu, które w celu neutralizacji muszą otrzymać elektron [7,8,13,19].

### 1.2.1 Reaktywne formy tlenu (RFT)

Rodniki, które pochodzą z tlenu prezentują najważniejszą klasę generowanych w żywych systemach rodników. Reaktywne formy tlenu to rodnikowe lub nierodnikowe formy tlenu, których cechą charakterystyczną jest bardzo wysoka reaktywność. Za ich produkcję w komórce (źródło endogenne) odpowiadają głównie mitochondria, błona plazmatyczna, retikulum endoplazmatyczne czy peroksyzomy [9,17,20,21]. Jednym z ważnych wytwórców wewnątrzkomórkowych utleniaczy jest rodzina enzymów związanych z błoną, a ich aktywność oparta jest na redukcji estru fosforanowego dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego do NADPH. Oprócz tych dwóch źródeł produkcji RFT komórka posiada dodatkowe źródła, które obejmują wiele innych enzymów wewnątrzkomórkowych, w tym oksydaz ksantynowych, cyklooksygenaz, enzymów cytochromu p450 czy lipooksygenaz, które to wytwarzają utleniacze w ramach naturalnej enzymatycznej funkcji. RFT mogą również wytwarzać się na skutek bodźców egzogennych, takich jak promieniowanie jonizujące, ultrafioletowe (UV), dym tytoniowy infekcje patogenami czy toksyny środowiskowe [21]. W zdrowej komórce RFT uczestniczą w procesach, m. in. usuwania leków z organizmu, wydzielania hormonów, czy w podstawowym funkcjonowaniu systemu obronnego. Sam tlen cząsteczkowy (diltlen) już ma unikalną konfigurację elektronową i również jest rodnikiem. Addycja do niego kolejnego elektronu powoduje tworzenie anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2^{\cdot-}$ ) [13,18,22]. Powszechnie uważane jest, że samorzutnej dysmutacji do nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ) ulega on w celach sygnalizacyjnych (Rys.1). Kanały akwaporyny, białka błony komórkowej, powodują przedostanie się nadtlenu wodoru z powrotem, lub z zewnętrznych, nie endogennych źródeł, do wnętrza komórki [7].

Zbyt duża ilość RFT w komórce może spowodować uszkodzenia jej struktur i doprowadzić do zaburzeń procesów, tym samym doprowadzając do zakłócenia prawidłowej fizjologii komórki. Brak występowania równowagi pomiędzy wytwarzaniem RFT, a obroną antyoksydacyjną, jest związany z patogenezą różnych chorób, m.in. nowotworów, astmy czy nadciśnienia płucnego. Homeostaza może zostać zaburzona w obecności warunków hiperoksji, występowania stanu zapalnego, niedokrwienia czy w przypadku upośledzenia,

lub uszkodzenia tarczy antyoksydacyjnej. RFT mogą bezpośrednio powodować uszkodzenia lipidów, białek czy kwasów nukleinowych, prowadząc do śmierci komórki [23–25].



**Rysunek 1.** Szlaki powstawania RFT oraz peroksydacji lipidów w komórkach, na podstawie [9]. Wykonano w BioRender.com

### **1.2.1.1 Anionorodnik ponadtlenny**

Anionorodnik ponadtlenny należy do grupy reaktywnych cząsteczek RFT, produkowany jest głównie przez mitochondria i powstaje w wyniku procesów metabolicznych. Mitochondrialny łańcuch transportu elektronów to główne źródło ATP w komórkach eukariontów, cząsteczki niezbędnej do prowadzenia procesów życiowych. Błony mitochondrialne, na których zlokalizowane są elementy łańcucha transportu elektronowego nie są w pełni szczelne i podczas transdukcji elektronów ich część przedostaje się do cytozolu, powodując tzw. przeciek elektronowy. Jest to źródłem komórkowych RFT, w głównej mierze tworzących się natychmiast nadtlenny [7,9,13,26]. Na drodze oksydacji anionorodnik ponadtlenny może przekształcić się w silniejsze reaktywne formy tlenu. Jest on słabo reaktywny, a jego działanie utleniające jest redukowane przez dysmutazę ponadtlenną (SOD), która katalizuje przekształcanie anionorodnika do  $H_2O_2$ . Pełni on ważne role w komórce, jako cząsteczka sygnałowa, zwiększając produkcję interleukiny 2, czyli czynnika wzrostu limfocytów T, a poprzez oksydazy NADPH neutralizuje różnego rodzaju patogeny w fagocytach [9,13,19,20].

### **1.2.1.2 Nadtlenny wodoru**

Głównym źródłem nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ) w warunkach fizjologicznych w komórkach są peroksysony. Uczestniczą one w kilku procesach metabolicznych wykorzystujących tlen i są głównym miejscem zużycia tlenu [9,17,18]. Nadtlenny wodoru jest silnym utleniaczem, generowanym celowo, jako produkt uboczny przy tworzeniu anionorodnika ponadtlennego, w innych procesach metabolicznych lub jako jeden z produktów oddychania mitochondrialnego. Komórki wyposażone są w wiele enzymów redukujących nadtlenny wodoru, w tym peroksyredoksynę, peroksydazę glutationową czy katalazę, odpowiadające za utrzymanie homeostazy wewnątrzkomórkowej. Nadtlenny wodoru bezpośrednio reaguje z tiolami [13,17,18,27].



## 1.2.2 Reaktywne formy azotu

Reaktywne formy azotu (RFA), związki pochodzące z tlenku azotu (NO), są to związki zawierające azot o niesparowanych elektronach i charakteryzują się dużą reaktywnością. Do tej grupy zaliczane są m. in. kation i anion nitrozylowy, tlenek azotu, dwutlenek azotu, kation nitrylowy i nadtleonoazotyn. Powstają one w wyniku reakcji wolnych rodników z NO. Stres nitrozylowy jest odpowiedzialny za ich nadprodukcję i może prowadzić do nieodwracalnych, i trwałych zmian w komórce [28–30].

### 1.2.2.1 Tlenek azotu

Tlenek azotu (ang. *nitric oxide*, NO), to cząsteczka regulatorowa procesów komórkowych, biorąca udział w sygnalizacji redoks powodując np. nitrozylację białek. NO jest trującym, bezbarwnym i wysoce reaktywnym gazem. Produkowany jest zarówno endogennie przez komórki, jak i wydzielany jest egzogennie. Za jego produkcję endogennie odpowiedzialne są syntazy tlenku azotu (ang. *nitric oxide synthase*, NOS) i powstaje na drodze utleniania L-argininy. Źródłem egzogennym są palniki, zanieczyszczenia w powietrzu oraz smog z ruchu ulicznego (zanieczyszczenia pochodzące z ruchu drogowego czy z procesów technologicznych w przemyśle) [28,31,32].

## 1.3 Antyoksydanty

Antyoksydanty, związki hamujące utlenienie cząsteczek oraz reakcji chemicznych w wyniku, których mogą wytwarzać się wolne rodniki powodujące uszkodzenia komórki. Związki te powodują przekształcanie rodników w nieaktywne pochodne. W celu zrównoważenia stresu oksydacyjnego i utrzymania optymalnego poziomu redoks komórki posiadają i wytwarzają przeciwutleniacze, takie jak białka: glutation czy tioredoskyna. Egzogennie podawane są antyoksydanty w suplementach diety, powszechnie uważa się, że zapobiegają one chorobom, np. niedokrwiennej serca czy nowotworom [9,22,33,34].

Egzogenne antyoksydanty, dostarczane z pokarmem, neutralizują wolne rodniki. Zaliczamy do nich takie substancje jak:

- Karotenoidy (m.in.  $\beta$ -karoten, luteina, astaksantyna czy likopen) - głównym ich źródłem są owoce i warzywa, a także mikroalgi i makroglony. Rozpuszczalne w tłuszczach, chronią nienasycone kwasy tłuszczowe przed utlenieniem, obniżają poziom cholesterolu. Aktywność antyoksydacyjna powoduje regulację stresu oksydacyjnego (poprzez stabilizację błony komórkowej) oraz mediatory zapalne, powodując ochronę przed zespołami metabolicznymi, nowotworami, chorobami neurodegeneracyjnymi czy fotooksydacyjnymi chorobami oczu i skóry.
- Witamina C – najbardziej znany antyoksydant, wymagany do syntezy kolagenu i biosyntezy, niektórych hormonów, rozpuszczalny w wodzie. Do skutecznego działania, jako przeciwutleniacz musi być utrzymany wysoki poziom tej witaminy.
- Witamina E – chroni przed peroksydacją lipidów, zabezpiecza DNA przed uszkodzeniami powstałymi w wyniku utlenienia.
- Flawonoidy - występują w zielonej i czarnej herbacie, ich biologiczne działanie polega na hamowaniu utlenienia oraz zwiększają zawartość tzw. „dobrego” cholesterolu [33–37].

Przeciwutleniacze produkowane mogą być przez organizm (endogenne), a ich zadaniem jest przeciwdziałanie wolnym rodnikom oraz indukcja procesów redukcji. Do głównych antyoksydantów tworzących tarcze przeciwutleniającą, należą m. in. glutation czy tioredoksyna, peroksydaza glutationowa, czy białko supresorowe ferroptozy (FSP1) [38,39].

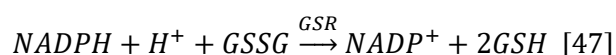
### 1.3.1 Glutation

Synteza glutationu (GSH) zależna jest od ligazy glutaminowej (GCL) i syntetazy glutationowej (GSS); zależna jest również od cystyny, która transportowana jest do komórki wymiennie z glutaminianem poprzez antyporter glutaminianu/cystyny  $X_C^-$  [40]. Glutation jest tripeptydem (cysteina, glicyna i kwas glutaminowy), należącym do najważniejszych przeciwutleniaczy, bierze on udział

w procesie S-glutationylacji w wyniku, czego chroni białą przed nieodwracalnymi skutkami utlenienia. W komórce występuje w dwóch stanach: zredukowanym (GSH) oraz utlenionym (GSSG). Stosunek tych dwóch form (GSH/GSSG) określa stan redoks komórek, a w zdrowych komórkach w spoczynku powinny mieć one stosunek >100, podczas gdy w komórkach narażonych na stres oksydacyjny spada do 10. Powstaje w cytozolu, natomiast aktywnie może być pompowany do mitochondriów. GSH bierze udział w redukcji nadtlenu wodoru, co powoduje utlenienie do disulfidu glutationu (GSSG), przy udziale peroksydazy glutationowej [41–43].

Zdolność komórek do redukcji GSSG do GSH jest obniżona, w wyniku dużego stresu oksydacyjnego. Glutationylacja to odwracalna reakcja, w której do białka, przyłącza się glutation, tworząc mostek disiarczkowy. Podczas, gdy w komórce poziom nadtlenu wodoru wzrasta, glutation utlenia się do formy disulfidu glutationu, w celu zredukowania reaktywnej formy tlenu, do wody. Proces ten katalizuje peroksydaza glutationowa (GPX). Peroksydaza glutationowa 4 (GPX4) jest jednym z głównych wewnątrzkomórkowych enzymów hydrolizujących nadtlenuki lipidów; jej aktywność jest wykorzystywana w naprawie błon komórkowych, które zostały uszkodzone przez nadtlenuki lipidów [42].

W celu zachowania równowagi w poziomie GSH/GSSG w komórce występuje zwiększona ekspresja reduktazy glutationowej (GSR). GSR, enzym pochodzenia cytozolowego oraz mitochondrialnego, pełni funkcje katalizatora reakcji, redukcji formy GSSG, która przy udziale NADPH prowadzi do powstania dwóch cząsteczek GSH, a NADPH ulega utlenianiu do  $NADP^+$  [44–47].



### 1.3.2 Tioredoksyna

Tioredoksyna (TXN, TRX) jest donorem wodoru dla reduktazy rybonukleotydowej i peroksydazy. Jest małym białkiem, odgrywającym ważną rolę w wielu procesach biologicznych w tym sygnalizacji reakcji utlenienia i redukcji. U ludzi kodowana jest przez dwa geny: TXN1 (główna cytozolowa

izoforma) i TXN2 (izoforma mitochondrialna) [48]. Ważną rolę odgrywa również w sygnalizacji międzykomórkowej. Białko to ma działanie przeciwutleniające, ułatwiając redukcję innych białek poprzez wymianę cysteinowego disiarczku tiolu. Tioredoksyna jest wszechobecna, występuje zarówno u eukariontów i prokariotów. W komórce białko to jest utrzymywane w formie zredukowanej przez reduktazę tioredoksyny (TRXrd) w reakcji zależnej od NADPH [41,49–51]. Reduktaza tioredoksyny, TRX i NADPH razem tworzą układ Trx. TRXrd jest zależnym od NADPH dimerycznym selenoenzymem wymaganym do redukcji i recyklingu utlenionego TXN1.

Izoformy tioredoksyny są wszechobecne wśród organizmów, a mitochondria posiadają swój własny system tioredoksyny. Cytozolowa izoforma pełni liczne obronne funkcje przed stresem oksydacyjnym, kontroluje wzrost, apoptozę oraz wykazuje aktywność kocytokinową i chemokinową [51,52]. Podstawową funkcją tego białka, jest redukcja utlenionych reszt cysteiny i rozszczepienie wiązań disiarczkowych. Utleniony TRX redukowany jest przez reduktazę tioredoksyny, a ta z kolei jest redukowana przez NADPH. Pozakomórkowe formy TRX w komórkach eukariotycznych pełnią działanie podobne do cytokin [31,41,44,53].

TRXrd przyczynia się do zmniejszonej wrażliwości komórek na induktor ferroptozy (śmierci związanej z akumulacją produktów peroksydacji lipidów; szczegółowy opis rozdział 1.6.2.5), erastynę, co skutkuje redukcją stresu oksydacyjnego. Małocząsteczkowe białko TXN-1 bierze udział w reakcjach redoks, a jego nadekspresja może powodować hamowanie ferroptozy poprzez zwiększenie ilości GSH i GPX4. Świadczy to o wzajemnym oddziaływaniu GSH-TRX, co zapewnia komórce przetrwanie w warunkach nadmiernego stresu oksydacyjnego. System Trx odpowiedzialny jest za dostarczanie elektronów peroksydazie tioredoksyny (TPX), a jej funkcja jest podobna do funkcji GPX w usuwaniu RFT, poprzez redukcję  $H_2O_2$  i wodoronadtlenków z wysoką szybkością [44,50,52,54,55].

### 1.3.3 FSP1

Białko supresorowe ferroptozy 1 (ang. *ferroptosis suppressor protein 1*, FSP1) jest kluczowym składnikiem niemitochondrialnego systemu antyoksydacyjnego koenzymu Q (CoQ), działającym równolegle do kanonicznego szlaku GPX4 związanego z glutationem. FSP1 redukuje ubichinon, czyli utlenioną postać CoQ do ubichinolu, przez co jest uważany za ważny czynnik oporności na ferroptozę, śmierci związanej z akumulacją produktów peroksydacji lipidów. Ekspresja FSP1 jest zwiększona w komórkach opornych na ferroptozę, gdzie białko, które jest flawoproteiną silnie hamuje ścieżkę ferroptozy. FSP1 przyczynia się do regeneracji przeciwutleniaczy osadzonych w błonie. FSP1 w wyniku stresu oksydacyjnego, rekrutowane jest do błony plazmatycznej, gdzie pełni rolę oksydoreduktazy redukującej koenzym Q10 (CoQ10), produkując lipofilowy przeciwutleniacz wychwytyjący rodniki [38,56–59].

## 1.4 Rola żelaza w potencjale redoks

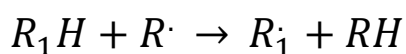
Wszystkie organizmy żywe mają wysokie zapotrzebowanie na czujniki stanu redoks. Żelazo ze względu na swoje właściwości elektrochemiczne, jest uważane za idealnie aktywny kofaktor reakcji redoks, jest zatem niezbędne w wielu procesach biologicznych [14]. Oprócz udziału żelaza w oddychaniu komórkowym, metabolizmie, wiązaniu azotu czy fosforanów, jest ono również wykorzystywane, jako swoisty czujnik stanu redoks w komórkach. Dzięki różnym stopniom utlenienia, niektóre metale mogą służyć, jako antyoksydanty, dzięki wrażliwości na fluktuacje redoks ich stopnie utlenienia mogą ulec zmianie. Redukcja lub utlenienie metali przejściowych powoduje zmianę ich liczby koordynacyjnej, a co za tym idzie również preferencje do specyficznych ligandów, zapewniając tym samym potencjalny mechanizm transdukcji sygnałów redoks do bramki białkowej. Żelazo jest w szczególności wykorzystywane w różnych reakcjach redoks. Metal ten jest czwartym najobficiej występującym pierwiastkiem na Ziemi. Jako przejściowy pierwiastek pierwszego rzędu posiada orbital d, który nie jest całkowicie wypełniony elektronami, co umożliwia mu występowanie na różnych stopniach utlenienia. Żelazo najczęściej występuje na II i III stopniu utlenienia. Metal ten reaguje z RFT, m. in. anionorodnikiem ponadtlenkowym, czy  $H_2O_2$  i tlenem [14,34,60,61].

## 1.5 Peroksydacja lipidów

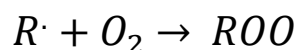
Peroksydacja lipidów jest formą tlenowej degradacji lipidów, zachodzącą we wszystkich komórkach. W tym szlaku biochemicznym wolne rodniki w procesie niekontrolowanej ilości elektronów z lipidów błon komórkowych na skutek, czego dochodzi do uszkodzenia komórek czy tkanek. Badania lipidomiczne ujawniły, że fosfolipidy zawierające wielonienasycone kwasy tłuszczowe (ang. polyunsaturated fatty acids, PUFA) są lipidami, które są najbardziej podatnymi na peroksydację i powodują późniejszą śmierć komórek [62]. W procesie peroksydacji lipidów wolny rodnik utlenia nienasycony łańcuch lipidów - zwłaszcza PUFA, zawierające podwójne wiązanie węgiel-węgiel, powodując powstanie lipidu hydroperoksydowanego i rodnika alkilowego. Skutkuje to zmianą w strukturze błony, wpływając na płynność dwuwarstwy fosfolipidowej i uszkadzając integralność. Wysoki poziom RFT lub wolnych rodników może skutkować bezpośrednim uszkodzeniem lipidów [21,63–66].

Całość tego procesu zachodzi w wyniku wolnorodnikowej reakcji łańcuchowej: peroksydacja lipidów przebiega w trzech etapach: inicjacji, propagacji i terminacji, a produktami chemicznymi tego procesu są nadtlenki lipidów. Inicjatorami reakcji wolnorodnikowej łańcuchowej są w tym wypadku reaktywne formy tlenu, a przede wszystkim rodnik hydroksylowy i hydroperoksylowy [21,63].

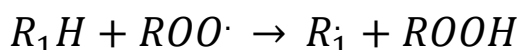
Inicjator peroksydacji lipidów (najczęściej cząsteczka zawierająca kompleks żelazo-tlen) najpierw wytwarza rodnik, który koncentruje się na wiązaniu węgiel-węgiel, a następnie reaguje on z tlenem. Inicjacja jest etapem, w którym wytwarzany jest rodnik kwasu tłuszczowego, najczęściej w wyniku połączenia reaktywnych form tlenu, które łącząc się z atomem wodoru tworzą rodnik kwasu tłuszczowego, produktem ubocznym reakcji jest cząsteczka wody. Głównymi uczestnikami inicjacji są zatem metal przejściowy oraz wodoronadtlenek lipidu (LOOH). Utworzony lipidowy rodnik hydroksylowy ( $R\cdot$ ) rozpoczyna fazę propagacji [63,67].



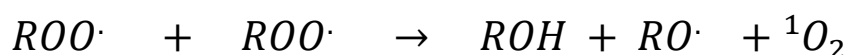
Propagacja jest etapem, w którym rodnik kwasu tłuszczowego reaguje z tlenem cząsteczkowym w wyniku, czego tworzy się rodnik peroksydowy (ROO) kwasu tłuszczowego.



Jest on bardzo niestabilny, dlatego reaguje z wolnym kwasem tłuszczowym w wyniku, czego powstaje wodoronadtlenek lipidów. To napędza cykl od nowa [21,64,67].



ROOH jest pierwszym stabilnym produktem reakcji peroksydacji lipidów. Ostatnim etapem jest terminacja, gdzie rodniki reagujące ze sobą tworzą kolejny rodnik, więc proces sam w sobie jest mechanizmem reakcji łańcuchowej. Reakcja rodnikowa trwa tak długo, aż dwa rodniki reagując ze sobą, tworzą formę nie-rodnikową. Terminacja jest możliwa, gdy stężenie rodników jest na tyle wysokie, aby dwa rodniki mogły się ze sobą zderzyć. W organizmach żywych znajdują się cząsteczki przyspieszające ten etap, są to wspomniane już wcześniej antyoksydanty [67–69].



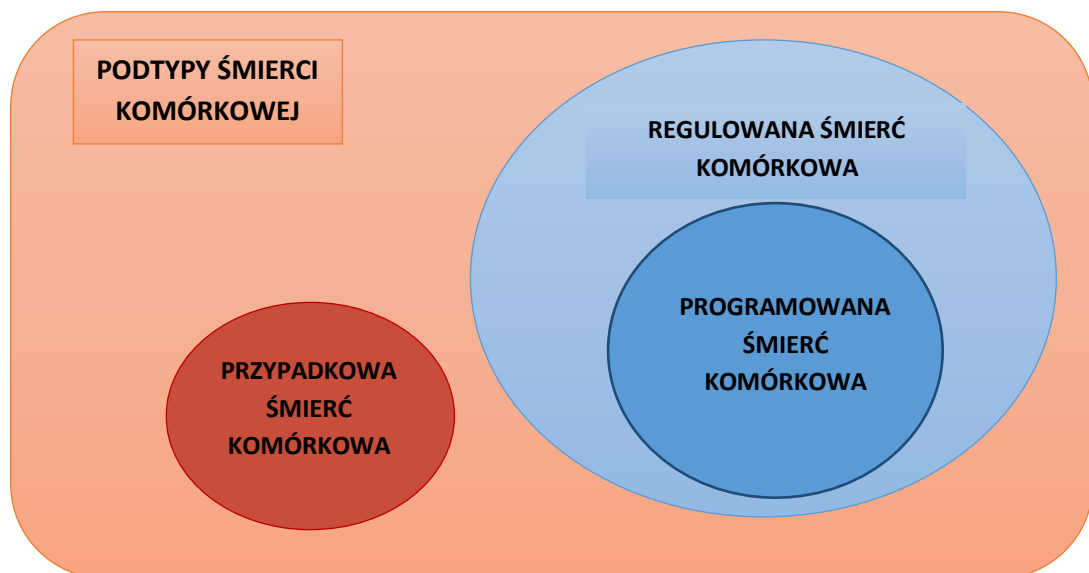
Z kolei białka mogą znacznie różnić się podatnością na uszkodzenia oksydacyjne, zależy to w głównej mierze od stanu konformacji białek, te nieuszkodzone są mniej wrażliwe na utlenienie od tych, które są nieprawidłowo sfaldowane [9].

Sama peroksydacja lipidów odgrywa również ważną rolę w szlakach regulowanej śmierci komórkowej. Jest ona również głównym czynnikiem wywołującym ferroptozę, rodzaj regulowanej nekrotycznej śmierci komórkowej, wynikającej z nagromadzenia produktów peroksydacji lipidów [63,70].

## 1.6 Śmierć komórkowa

Pierwsze próby opisanie mechanizmów śmierci komórkowej datuje się na połowę lat 60. XX wieku [71]. Obecnie wiadomo, że fundamentalnym aspektem

embriogenezy i rozwoju prawie wszystkich organizmów, jest programowana śmierć komórki, np. apoptoza. Historycznie, taka śmierć komórki była obserwowana głównie w rozwijających się systemach embrionów i przez wiele lat uważana była za ważną tylko na etapie formowania tkanek i narządów w rozwoju organizmu. W ostatnich latach pogląd ten się zmienił i znaczenie kontrolowanej śmierci komórkowej zostało zauważone w innych aspektach rządzących życiem [5,72]. Początkowo sklasyfikowano ją w trzy klasyczne typy: apoptozę, autofagię i nekrozę. Zarówno apoptoza, jak i autofagia uważane są za znajdujące się pod kontrolą biologiczną, czyli są zaprogramowanymi rodzajami śmierci komórkowej. System klasyfikacji śmierci komórkowej obecnie narzuca zasadniczo podział na dwa typy, przypadkową śmierć komórkową (ang. *accidental cell death*, ACD) i regulowaną (ang. *regulated cell death*, RCD). ACD jest wywołana przez nieoczekiwany uraz lub atak, powodując przytłoczenie wszelkich możliwych mechanizmów kontrolnych i ochronnych. RCD wręcz przeciwnie, obejmuje ona precyzyjne kaskady sygnalizacyjne: ma unikalne konsekwencje zarówno funkcjonalne, biochemiczne, jak i immunologiczne. RCD jest również znana, jako programowana śmierć komórki (ang. *programmed cell death*, PCD), jeśli występuje w warunkach fizjologicznych [4,71,73].



**Schemat 1.** Schemat podziału rodzajów śmierci komórkowej na podtypy. Na podstawie [4,73].



### **1.6.1 Przypadkowa śmierć komórkowa**

Komórki narażone na stres związany z ekstremalnymi bodźcami fizykochemicznymi lub mechanicznymi obumierają w sposób niekontrolowany w wyniku natychmiastowego rozpadu strukturalnego. Proces takiego nieuniknionego mechanizmu śmierci komórkowej jest określany, jako przypadkowa śmierć komórkowa (ang. *accidental cell death*, ACD) [73].

#### **1.6.1.1 Nekroza**

Nekroza scharakteryzowana została, jako bierna, przypadkowa śmierć komórki w wyniku zaburzeń środowiska oraz niekontrolowanego uwalniania zawartości wnętrza komórki. Jest to termin używany głównie przez patologów do określenia martwicy tkanek lub komórek i jest sumą zmian, jakie zaszły w komórkach po jej nagłej śmierci. Następuje skutek występowania ekstremalnej temperatury, zmiany ciśnienia, stresu chemicznego czy stresu osmotycznego. Brak fagocytozy powoduje utratę integralności ciałek apoptotycznych i prowadzi to do wtórej lub apoptotycznej nekrozy (martwe komórki poprzez proces apoptozy). Sama nekroza informuje o tym, że komórka umarła, ale niekoniecznie wskazuje, jak doszło do śmierci, i który szlak śmierci był pierwotnie aktywowany [5,68,72,74–77].

### **1.6.2 Regulowana śmierć komórkowa**

Regulowana śmierć komórkowa (ang. *regulated cell death*, RCD) to proces wszechobecny w organizmach żywych, który jest niezbędny do utrzymania homeostazy komórkowej, jak również przywrócenia równowagi biologicznej w warunkach stresu. RCD bierze udział w ściśle zintegrowanych kaskadach sygnalizacyjnych i mechanizmach, w których pośredniczą molekularnie. RCD może wystąpić fizjologicznie lub poprzez jej aktywację, gdy zawiodą mechanizmy adaptacyjne w odpowiedzi, np. na zaburzenia mikrośrodowiska zewnątrzkomórkowego lub wewnątrzkomórkowego. W przeciwieństwie do ACD, RCD obejmuje mechanizm molekularny zakodowany genetycznie, dzięki temu przebieg można regulować farmakologicznie lub genetycznie. RCD uruchamia się stosunkowo późno, jako odpowiedź na

niepowodzenia mechanizmów naprawczych, które mają za zadanie przywrócenie homeostazy komórkowej. Regulowana śmierć komórki występuje nie tylko, jako odpowiedź na bodźce z mikrośrodowiska, ale również w rozwoju embrionalnym, w homeostazie tkanek, czy w odpowiedziach immunologicznych. Jest procesem wszechobecnym w organizmach żywych, niezbędnym do utrzymania homeostazy, jak również przywrócenia równowagi biologicznej w warunkach stresu. Nadmierna lub niewystarczająca RCD może powodować choroby, np. neurodegeneracyjne, nowotworowe. Regulowana śmierć komórkowa może przybierać różne formy, w tym apoptozy, nekroptozy czy ferroptozy [4,73,78–80].

### **1.6.2.1 Programowana śmierć komórki**

Programowana śmierć komórki (ang. *programed cell death*, PCD) jest postacią całkowicie fizjologicznej postaci RCD. Jest to każdy proces komórkowy, na skutek, którego dochodzi do śmierci komórki. Pierwszy raz została opisana w połowie XIX wieku poprzez obserwacje morfologii umierających komórek. Często kontrolowana jest przez określone geny zwane markerami, które chronią lub powodują śmierć. Jest ona ważna w rozwoju układu nerwowego oraz w różnicowaniu, jak i śmierci komórek odpornościowych. Niepowodzenie procesu może prowadzić do nowotworów i chorób autoimmunologicznych, a jej nadmiar może skutkować niewydolnością immunologiczną, czy neurodegeneracją [78,81–84].

### **1.6.2.2 Apoptoza**

Apoptoza opisywana jest, jako aktywny i zaprogramowany proces autonomicznego rozpadu komórek, pozwalając na uniknięcie stanu zapalnego [74,85]. Apoptoza jest naturalnym procesem, regulowanym w organizmie wielokomórkowym. Dzięki temu mechanizmowi organizm usuwa uszkodzone komórki. Inicjacja apoptozy może obejmować szlak zewnętrzny lub wewnętrzny [85–87]. Apoptoza obejmuje głównie fragmentację DNA i kondensację jądrową. Śmierć na drodze apoptozy odbywa się głównie poprzez aktywację kaspaz, jako fizjologiczna forma śmierci komórki jest wykorzystywana, m.in. podczas rozwoju embrionalnego dla kształtowania tkanek i elementów ciała, czego dobrym

przykładem jest tworzenie się palców w kończynach. Stres genotoksyczny może aktywować apoptotyczną śmierć komórki poprzez szlaki zależne lub niezależne od kaspaz [72,86,88].

Apoptoza porównywana jest do zaplanowanego, kontrolowanego samobójstwa komórki, mającego na celu dobro całego organizmu. Śmierć ta, niezbędna jest zatem do utrzymania homeostazy tkanek. Jej biologiczną rolą jest eliminowanie zużytych i uszkodzonych komórek, które mogą być szkodliwe dla organizmu. Wiele komórek jest zdolnych do samobójczej śmierci, ale to, z jaką łatwością mogą w jakikolwiek sposób wejść w apoptozę, zależy od ich rodzaju i stopnia rozwoju. Proces ten obserwowany jest zarówno podczas embriogenezy (tworzenie układu nerwowego ssaków, tworzenie soczewki oka), jak i w organizmach dorosłych (np. segregacja dojrzewających limfocytów T w grasicy) [87–89].

### **1.6.2.3 Autofagia**

Podstawowym procesem katabolicznym, polegającym na kontrolowanym rozkładzie cząsteczek chemicznych, fragmentów komórek i organelli przez komórkę w celu utrzymania homeostazy, jest kanoniczna autofagia lub makroautofagia. Jest to proces bardzo konserwatywny, występujący we wszystkich organizmach eukariotycznych [90–92]. Podstawowym procesem katabolicznym, w którym materiał wewnątrzkomórkowy jest degradowany w celu utrzymania homeostazy, jest kanoniczna autofagia lub makroautofagia. Występuje ona zarówno w zdrowych komórkach, jak i w stanach patologicznych i chorobowych. Autofagia służy do degradacji uszkodzonych lub niepotrzebnych białek lub organelli. W chorobie autofagia była postrzegana, jako adaptacyjna odpowiedź na stres, promująca przeżycie komórki; ale w innych przypadkach wydaje się, że sprzyja śmierci komórek i zachorowalności. W skrajnym przypadku głodu rozkład składników komórkowych sprzyja przetrwaniu komórek poprzez utrzymanie poziomów energii komórkowej. Autofagia odgrywa rolę w różnych funkcjach komórkowych. Jednym szczególnym przykładem są np. komórki drożdży, w których łaknienie (pragnienie jedzenia) powoduje wysoki poziom autofagii [93,94]. Pozwala to na degradację zbędnych białek i recykling

aminokwasów niezbędnych do syntezy białek przetrwania. U wyższych eukariotów, autofagia jest indukowana w odpowiedzi na wyczerpanie składników odżywczych, które występuje u zwierząt np. po urodzeniu, gdzie dopływ substancji odżywczych poprzez łożysko zostaje przerwany. Podobnie wygląda sytuacja w warunkach *in vitro*, przy niedoborze składników odżywczych w hodowanych komórkach i tkankowych [90,92].

Autofagia składa się z następujących etapów:

1. sekwestracja – wokół cytoplazmy i organelli tworzy się autofagosom;
2. transport do lizosomu – autofagosom łączy się z lizosomem;
3. degradacja – lizosom uwalnia enzymy rozkładające materiał w autofagosomie;
4. utylizacja produktów degradacji – wszystkie peptydy komórkowe rozkładają się do aminokwasów [90,91].

#### 1.6.2.4 Piroptoza

Piroptoza, to rodzaj litycznej śmierci komórki, która charakteryzuje się szybkim pęknięciem błony komórkowej, co skutkuje uwolnieniem zawartości komórkowej oraz mediatorów prozapalnych (w tym IL-1 $\beta$  i IL-18). Najczęściej pojawia się po infekcji i kiedy następuje odpowiedź przeciwdrobnoustrojowa. Śmierć ta charakteryzuje się również aktywnością komórek odpornościowych, rozpoznających obce organizmy, uwalniając cytokiny prozapalne, w wyniku czego komórka pęcznieje, pęka i obumiera. Uwolnione cytokiny powodują mobilizację innych komórek odpornościowych, niezbędnych do eksploracji infekcji i przyczyniają się do występowania stanu zapalnego w tkance. Inicjacja piroptozy w zainfekowanych makrofagach jest spowodowana rozpoznaniem składników flageliny gatunków bakterii *Salmonella sp.* i *Shigella sp.* oraz podobnych wzorców molekularnych związanych z patogenami (ang. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) w innych patogenach drobnoustrojowych, przez receptory podobne do NOD (NLR). Receptory te działają jak receptory typu *toll-like* błony komórkowej (TLR), ale rozpoznają antygeny znajdujące się w komórce, a nie poza nią [74,89,95,96].

Infekcja uruchamia autodestrukcyjny system. Typowe cytokiny nowotworowe to: czynnik nekrozy nowotworów (TNF), IL-6, IL-8, interferony typu I (IFN) i czynnik regulujący interferon (IRF). Odpowiedź zapalna jest niezależna od śmierci komórki [74,89,95]. Pomimo tego, że uruchamiana ścieżka aktywacji kaspazy-1 jest zróżnicowana, propagacja kaskady śmierci doprowadza do eliminacji komórki pirotycznej. Liza komórki następuje po utworzeniu porów w błonach komórkowych, z szacowaną wielkością porów 1,1-2,4 nm, co zaburza gradient jonów komórkowych. Wynikający z tego wzrost ciśnienia osmotycznego powoduje napływ wody do cytozolu, a w konsekwencji pęcznienie i pękanie komórki. Zawartość cytozolu uwalniana jest za pośrednictwem kanałów. Następnie nieaktywne cytokiny prozapalne są dalej cięte przez kaspazę 1 i przez to aktywowane. Ponadto ma miejsce cięcie DNA oraz proces kondensacji jądrowej [91,97].

#### **1.6.2.5 Ferroptoza**

Ferroptoza (ang. ferroptosis) to rodzaj nieapoptotycznej, zaprogramowanej śmierci komórki zależnej od żelaza. Charakteryzuje się akumulacją produktów peroksydacji lipidów. Ferroptozę zapoczątkowuje niewydolność mechanizmów obronnych, w tym antyoksydantów glutationozależnych, co prowadzi do niekontrolowanej peroksydacji lipidów i ostatecznie do śmierci komórek [98,99]. W komórkach charakterystycznymi objawami jest głównie zmniejszona objętość mitochondriów, zwiększona gęstość błony dwuwarstwowej oraz zmniejszenie lub całkowity zanik krist mitochondrialnych [100–102]. Błona komórkowa jest nienaruszona, a jądro ma normalną wielkość. W komórkach z ferroptożą dochodzi do utraty wewnątrzkomórkowego GSH i zmniejsza się aktywność peroksydazy glutationowej 4 (GPX4), enzymu naprawy lipidów, głównego antyoksydanta, w wyniku, czego nie dochodzi do redukcji nadtlenu lipidów.  $Fe^{2+}$  katalizuje reakcję utlenienia lipidów, reakcja przebiega w sposób podobny do reakcji Fentona, w wyniku, której powstaje nadmiar RFT [79,103,104]. Hamowanie hydroperoksydazy lipidowej GPX4, indukują ekspresję prominy2 (PROM2), białka pentaspaniny zaangażowanego w regulację dynamiki lipidów. PROM2 ułatwia odporność na ferroptozę w komórkach poprzez promowanie tworzenia ciałek wielopęcherzykowych zawierających ferrytynę (MVB) i

egzosomów, które transportują żelazo na zewnątrz komórki, hamując ferroptozę [105]. Cechy charakterystyczne dla ferroptozy to duże zapotrzebowanie na żelazo i akumulacja nadtlenków lipidów błonowych.

ACSL4 (ang. *acyl-CoA synthetase long-chain family member 4*) jest enzymem odgrywającym ważną rolę w metabolizmie kwasów tłuszczowych oraz bierze udział w przebiegu ferroptozy, jako jej główny prekursor. Jego rola polega na przyłączaniu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (ang. *polyunsaturated fatty acids, PUFAs*) do fosfolipidów w ścieżce tej śmierci, jest również uważany za marker ferroptozy, a jego ekspresja jest wysoka w komórkach wrażliwych na ferroptozę [106,107].

Białko receptora transferyny (ang. *transferrin receptor, TFRC*) jest odpowiedzialne za transport ze środowiska pozakomórkowego żelaza za pośrednictwem transferyny. Na skutek czego, narasta wewnątrzkomórkowy poziom RFT, poprzez reakcję Fentona. Wzrost RFT powoduje utlenianie lipidów i śmierć komórki na drodze ferroptozy. W pierwszej fazie ferroptozy ekspresja genu kodującego to białko jest kluczowa. Zwiększona ekspresja tego receptora występuje w komórkach nowotworowych, co prowadzi do akumulacji żelaza w komórkach [40,102].

Białko supresorowe ferroptozy (ang. *ferroptosis suppressor protein 1, FSP1*) uważane jest za kluczowy składnik systemu antyoksydacyjnego, bazującego na koenzymie Q10 (CoQ). FSP1 odpowiedzialny jest za redukcję ubichinonu, czyli utlenionej postaci CoQ do ubichinolu zredukowanej postaci, dzięki czemu uważa się go za ważny czynnik oporności na ferroptozę. Istnieje on, jako samodzielny szlak równoległy do GPX4, który współpracuje z nim i glutationem, hamując peroksydację lipidów i ferroptozę. Szlak FSP1-CoQ(10)-NAD(P)H występuje niezależnie, jako system inhibicji ferroptozy. Szlak jest wydajniejszy w komórkach opornych na ferroptozę [38,57].

Mitochondria, jako niezbędne organella w większości typów komórek, ze względu na ich ważną rolę w generowaniu ATP oraz obecność w nich mitochondrialnego systemu fosforylacji oksydacyjnej (ang. *mitochondrial oxidative phosphorylation system, OXPHOS*), gdzie, jako produkt uboczny zachodzi produkcja RFT, stanowią ważny element w propagacji ścieżki ferroptozy. W komórce biorą udział w różnych typach RCD, w tym wewnętrznej

i zewnętrznej apoptozie czy autofagii, pełniąc główną rolę w homeostazie tkanek [40,108,109]. Farmakologiczna indukcja ferroptozy poprzez hamowanie antyportera xCT indukuje wytwarzania mitochondrialnych RFT, fragmentację mitochondriów czy utratę potencjału błony mitochondrialnej (MMP) [110].

Nadtlenki lipidów są kluczowym czynnikiem w powstawaniu ferroptozy, której skutkiem jest atak RFT na błony komórkowe i organella. Mitochondria są ważnym źródłem RFT, a cykl kwasów tlenokarbonylowych, TCA, rozpoczyna reakcję łańcucha transportu elektronów, kończąc fosforylacją oksydacyjną. Elektrony uwięzione w kompleksach łańcucha elektronowego (ang. electron transport chain, ETC) mogą migrować, powodując wytworzenie nadtlenku, który ulega przemianie w  $H_2O_2$  przez SOD. Ten ostatni może reagować z  $Fe^{2+}$  i przekształcać się w rodniki hydroksylowe lub alkoksylowe w wyniku, czego powstają toksyczne stężenia rodników. Ponadto, ferroptozą i peroksydacja lipidów prowokują uszkodzenia mitochondrialne, zwiększając produkcję RFT i zakłócając metabolizm energii. Wrażliwość komórek na inhibitory GPX4 jest różna w zależności od statusu linii komórkowej, prawidłowa czy np. nowotworowa, co oznacza, że również inne czynniki wpływają na oporność na ferroptozę [57,59,100].

## 1.7 Edycja genomu metodą CRISPR Cas9

CRISPR/Cas9 jest rewolucyjną technologią, umożliwiającą z dużą precyzją oraz efektywnością na edycję genomu, poprzez zmianę sekwencji nukleotydowej genów, co jeszcze niedawno było możliwe z wykorzystaniem wyłącznie żmudnej i nieprecyzyjnej technologii, obciążonej błędami i niską efektywnością. Nowatorska metoda wykorzystuje naturalny mechanizm obronny, ewolucyjnie wykształcony wobec bakteriofagów u bakterii [111–114]. Mechanizm ten został dostosowany do celów medycznych i biotechnologicznych. Obecność systemu CRISPR/Cas, po raz pierwszy została zaobserwowana w późnych latach 80 w bakteriiach *Escherichia coli*, w szczepie K12, pierwszy raz opisane przez Ishino i wsp., z Uniwersytetu w Osace [113,115–117]. W późniejszych latach odnotowano również obecność tego systemu w genomie archeonów. Dopiero w połowie 2000 roku zrozumiano rolę sekwencji CRISPR w systemie obronnym

bakterii przed wirusami [115,118]. System CRISPR/Cas, do tej pory można podzielić na dwie klasy. W systemach CRISPR/Cas klasy 1 (typy I i III) moduł efektorowy składa się z wielobiałkowego kompleksu, natomiast systemy klasy 2 (typy II, IV, V i VI) wykorzystują tylko jedno białko efektorowe [113,119,120]. Mechanizm działania systemu CRISPR/Cas jest specyficzny dla typu I klasy, do której został sklasyfikowany. Można go podzielić na trzy główne etapy: adaptację (akwizycji sekwencji rozdzielającej, ang. spacerów), biogenezę crRNA oraz interferencję (przechwycenie) celu. W pierwszym etapie fragment inwazyjnych kwasów nukleinowych (tzw. protospacerów) jest włączany do macierzy CRISPR, co umożliwia gospodarzowi zapamiętanie materiału genetycznego (sekwencji) atakującego intruza, ukazując adaptacyjną naturę odpornościowego układu [113,121,122]. Podczas biogenezy crRNA (CRISPR RNA), aby umożliwić wytworzenie odporności, macierz CRISPR jest transkrybowana do długiego prekursora crRNA (pre-crRNA), a następnie jest przekształcana w dojrzałe crRNA, zawierające zapamiętaną sekwencję intruza [113,122,123]. W ostatnim etapie dojrzałe crRNA kieruje obroną immunologiczną, prowadząc do zniszczenia obcego materiału genetycznego poprzez stworzenie kompleksu z białkami efektorowymi, typu Cas [113,124]. Systemy typu I, II i V posiadają zabezpieczenie przed samorozpoznaniem, rozpoznają specyficzną sekwencję PAM (motyw sąsiadujący z protoprzerwywnikiem), która znajduje się w zależności od typu powyżej (typ I i V) lub poniżej (typ II) rozpoznawanej sekwencji [113,125–128]. Obecnie system CRISPR/Cas jest szeroko stosowany, jako najnowocześniejsza technologia edycji genomu w domenie eukariotycznej. System oparty na CRISPR/Cas9 składa się ze zmodyfikowanego genu, nukleazy Cas9, enzymu odpowiedzialnego za cięcie DNA gospodarza i sgRNA (jednoniciowego naprowadzającego RNA; ang. *single guide RNA*). Poszczególne składniki dostarczane są do komórki za pomocą wektorów wirusowych, a następnie dochodzi do edycji genomu i naturalnie występujący gen zostaje zmodyfikowany na obu niciach DNA. System edycji genów oparty na technologii CRISPR/Cas9 może również edytować (zmieniać sekwencję) poprzez wycięcie danego fragmentu genu lub insercję dodatkowego fragmentu [117,129].

Proces edycji genomu przy pomocy CRISPR-Cas9 składa się z trzech etapów, Pierwszym jest rozpoznanie, podczas którego zaprojektowana



i przygotowana cząsteczka RNA (sgRNA), kieruje endonukleazę Cas9 oraz łączy się komplementarnie do rozpoznawanej sekwencji w genomie. Nukleaza Cas9 tworzy pęknięcia dwuniciowe (DSB) powyżej sekwencji PAM (3 pary zasad powyżej) [117]. Sekwencja PAM jest krótką, o długości 2-5 par, zasad sekwencją DNA znajdującą się poniżej miejsca cięcia, a jej długość różni się w zależności od gatunku bakterii, gdzie oryginalnie została rozpoznana. Najczęściej używaną nukleazą do edycji genomu jest Cas9, rozpoznająca sekwencje PAM w pozycji 5'-NGG-3' (gdzie, N może oznaczać dowolną zasadę nukleotydową) [130,131]. Kolejnym etapem jest rozplecenie nici DNA, gdy nukleaza Cas9 rozpozna miejsce docelowe z odpowiednim PAM, powoduje lokalną denaturację, a po nim następuje przyłączenie produktów transkrypcji z wprowadzonych plazmidów i tworzy się hybryda DNA-RNA. Następuje aktywacja nukleazy do podwójnoniciowego cięcia DNA. Domena HNH rozszczepia komplementarną nić, podczas gdy nukleaza RuvC inicjuje cięcie niekomplementarnej nici docelowego DNA, tworząc DSBs o tępych końcach. Ostatnim krokiem jest naprawa, w której to podwójnoniciowe uszkodzenia są naprawiane przez system naprawczy komórki gospodarza [132–135].

## 1.8 Efekt sąsiedztwa (Bystander Effect)

Efekt sąsiedztwa (ang. *bystander effect*; BY) obserwowany jest w komórkach sąsiadujących z komórkami, które zostały bezpośrednio aktywowane. Jest to odpowiedź biologiczna komórki wywołana procesami zachodzącymi np. w otaczającej ją tkance, komórkach sąsiadujących (podobnie jak w fizjologii sygnalizacja parakrynną) lub nawet odległych, efekt abscopalny (ang. *abscopal effect*). Efekt ten jest formą komunikacji międzykomórkowej. Czynniki będący toksycznym lub wywołujący fizjologiczny efekt może w ten sposób być odbierany zarówno bezpośrednio, przez traktowane komórki (autokrynnie), jak i pośrednio przez wysyłane sygnały do komórek znajdujących się w najbliższym otoczeniu (parakrynnie). Wyróżnia się kilka typów efektu sąsiedztwa. Klasyczny efekt (typ I) wywołany jest sygnałami molekularnymi, które uwalniane są przez komórki traktowane, i zwykle odnosi się do wywołanych

w nich szkodliwych efektów, m.in. tworzenia mikrojąder z uszkodzonych chromosomów lub nieprawidłowo zreplikowanego w fazie S podziału mitotycznego DNA, indukcji apoptozy. Typ drugi, w odróżnieniu do typu I powoduje zwiększoną przeżywalność komórek ko-inkubowanych, natomiast typ III zwiększoną przeżywalność komórek bezpośrednio traktowanych. Na efekt obserwatora przede wszystkim największy wpływ ma pochodzenie tkankowe, jak i sam typ komórek. Prowadzić do niego może kilka mechanizmów transdukcji sygnałów, m. in. dominująca dyfuzja z komórki do komórki toksycznych metabolitów; z komórek, które wykazują znaczną ekspresję metabolitów do sąsiednich komórek; przy użyciu transportu aktywnego przez połączenia międzykomórkowe; przy pomocy biernej dyfuzji pomiędzy komórkami [57,136–139]. W pracy założono, że sygnalizacja międzykomórkowa może dotyczyć także transdukcji sygnałów śmierci ferroptotycznej.

## 1.9 Tablica decyzyjna

Tablica (tabela) decyzyjna to zwięzła reprezentacja wizualna określająca, jakie działania należy wykonać na podstawie danych warunków. Są to algorytmy, których wynikiem jest zestaw działań. Służą do modelowania skomplikowanej logiki, mogąc ułatwić zobaczenie wszystkich możliwych kombinacji [140–142]. Główne zastosowanie mają w biznesie, ale można je również stosować w innych dziedzinach, gdzie konieczne jest podejmowanie decyzji. Informacje wyrażane przez tablice decyzyjne mogą być również reprezentowane, jako drzewa decyzyjne lub używając języków programowania, jako seria instrukcji warunkowych *if-then-else* (instrukcja warunkowa, „if” zostanie wykonany, jeśli warunek zostanie spełniony, jeśli nie „else” zostanie wykonany), lub *switch-case* (instrukcja warunkowa, w której porównujemy wartość z wieloma przypadkami). Każda z decyzji odpowiada zmiennej, każda akcja jest procedurą do wykonania, a wpisy określają, czy akcja ma zostać wykonana dla zestawu alternatyw, któremu odpowiada wpis. Jednym z zastosowań tablic jest ujawnianie warunków, w których pewne czynniki są nieistotne dla działań, które należy podjąć oraz umożliwiają wykrycie kombinacji warunków wcześniej niebranych pod uwagę, co usprawnia procedurę podejmowania decyzji [141–144]. Zastosowanie tablicy decyzyjnej ma na celu ułatwienie podjęcia decyzji, w przypadku tej pracy pozwoli

to określić, jakim szlakiem śmierci komórka odpowie w wyniku jej indukcji: czy ścieżka śmierci zostanie wykonana kanonicznie, czy też nastąpią wewnątrzkomórkowe przełączenia na inny typ śmierci. Decyzja w komórce jest podejmowana poprzez analizę szeregu zmiennych parametrów.

## 2. Hipoteza i cele pracy

### 2.1 Hipoteza

Ferroptoza jest regulowana w zależności od linii komórkowej i pochodzenia tkankowego, czego objawem jest typowa dla wybranych komórek wrażliwość lub oporność na indukcję tego typu śmierci.

### 2.2 Cel pracy

Regulowana śmierć komórki (ang. Regulated Cell Death, RCD), odgrywa znaczącą rolę w homeostazie organizmu, zarówno w stanach fizjologicznych, jak i patologicznych. Nadmierna lub niewystarczająca RCD, może powodować choroby, takie jak neurodegeneracyjne czy nowotworowe. Śmierć komórek jest procesem wymaganym w przebiegu wielu procesów fizjologicznych, w tym podczas embriogenezy, rozwoju układu odpornościowego i niszczeniu uszkodzonych komórek. Regulowana śmierć komórkowa może przybrać różne formy np. apoptozy, nekroptozy lub ferroptozy. Zrozumienie i poznanie ścieżek śmierci, jak również ich regulacji jest ważne zarówno z punktu naukowego, jak i medycznego do zastosowań leczniczych.

Zagadnienia przedstawione w rozprawie doktorskiej koncentrują się na badaniu przebiegu ferroptozy w różnych liniach komórkowych *in vitro*, a także procesów związanych z regulacją programowanej i nieprogramowanej śmierci komórkowej. Do tej pory, w ramach podjętych prac, badano wpływ różnych czynników, które odpowiadają za indukcję lub inhibicję ścieżek śmierci w komórkach. W literaturze można znaleźć opisane przypadki hamowania lub indukcji śmierci, poprzez dodanie specyficznych związków, tzw. regulatorów (induktorów lub inhibitorów ścieżek sygnałowych). W założeniach można sprawdzać zależności różnych czynników, chemicznych i fizycznych, takich jak promieniowanie UV czy jonizujące, IR (ang. *ionizing radiation*), w kombinacjach regulator-regulator; regulator-UV; regulator-IR, i określać ich wpływ na wybraną ścieżkę śmierci, a także zaobserwować skutki i efekty uboczne w komórkach sąsiadujących (ang. *bystander effect*). **Celem podjętych prac było scharakteryzowanie różnych ścieżek śmierci komórkowych oraz próba stworzenia systemu decyzyjnego regulacji ich indukcji/wyciszenia.**

### **2.2.1 Szczegółowe cele pracy**

W pracy wykonana została analiza danych, uzyskanych z własnych eksperymentów *in vitro* oraz porównano je ze zdeponowanymi w otwartych bazach danych, dla różnych ścieżek śmierci komórkowych, związanych także z udziałem w regulacji ich indukcji/przebiegu/wyciszenia metali ciężkich (Fe).

Oceniono istotność kluczowych dla ścieżki ferroptozy genów, które zostały poddane edycji/wycięte metodą CRISPR/Cas9 dla wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnałów, w celu wytypowania tzw. wewnątrzkomórkowych centrów decyzyjnych/regulacyjnych w przełączaniu kanonicznych szlaków sygnałowych, związanych ze śmiercią komórkową.

Otrzymane wyniki eksperymentalne zestawiono w tabelę, na podstawie, których następuje „wybór typu śmierci” pod wpływem egzo- lub endogennych stresogennych/regulatorowych czynników - opracowano wstępny system podejmowania decyzji, na podstawie tzw. tablicy decyzyjnej.

### 3. Materiały i metody

#### 3.1 Hodowla *in vitro*, linie komórkowe

W badaniach wykorzystane zostały linie komórkowe prawidłowe i nowotworowe. Wykorzystano zarówno komórki adherentne, HaCaT, 1205Lu czy HCT116, jak i nieadherentne: HL60 i K562 (Tabela 1). Komórki adherentne to takie, które rosną przylegając do powierzchni naczynia, w którym zostają wysiane, natomiast nieadherentne rosną w zawieszynie w medium, i nie przylegają do powierzchni naczynia.

**Tabela 1** Linie komórkowe wykorzystane w badaniach i wyznaczony dla erastyny - parametr  $IC_{50/80}$ .

<b>Linia komórkowa</b>	<b>Schorzenie</b>	<b>Pochodzenie</b>	<b><math>IC_{50}</math></b>
HaCaT (dystrybutor CSL Cell Line Service GmbH)	Unieśmiertelnione prawidłowe keratynocyty	Naskórek	$IC_{80} = 10 \mu M$
NHDF (dystrybutor Lonza)	Prawidłowe fibroblasty skóry	Fibroblasty	N/A
1205Lu (Dystrybutor ATTC)	Melanoma I stadium z guza pierwotnego	Czerniak	$3,5 \mu M$
451Lu (Dystrybutor ATTC)	Melanoma IV stopnia z przerzutu	Czerniak	N/A
Me45	Czerniak złośliwy[145]	Czerniak	$8 \mu M$
A549 (Dystrybutor ATTC)	Rak płuca	Nabłonek	$12 \mu M$
HCT116 p53+/+ (Dystrybutor ATTC)	Rak jelita grubego (Colorectal Carcinoma)	Nabłonek, jelito grube; Okrężnica	$12 \mu M$
HCT116 p53-/-	Rak jelita grubego (Colorectal Carcinoma) knockout TP53	Nabłonek, jelito grube; Okrężnica	N/A

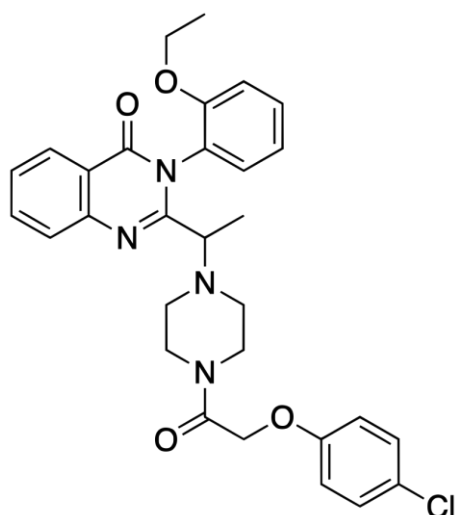
K562 (Dystrybutor ATTC)	Przewlekła białaczka szpikowa (Chronic Myelogenous Leukemia)	Komórki limfoblastyczne	12 $\mu$ M
HL60 (Dystrybutor ATTC)	Ostra białaczka szpikowa (Acute Promyelocytic Leukemia)	Komórki promieloblastyczne	7,5 $\mu$ M

N/A – nie analizowane

Komórki hodowane były w butelkach plastikowych (Sarstedt, Niemcy) o powierzchni 25 cm<sup>2</sup> w 6 ml medium w standardowych warunkach (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> oraz przy wilgotności atmosfery 80 %). Komórki hodowano w pożywkach RPMI, DMEM oraz DMEM-F12 (PAA, Polska, uzupełnione 10% FBS (EURx, Polska) i roztworem Penicilin-Streptawidyn Solution (100x; Sigma-Aldrich, Niemcy). Wszystkie redukcje ilości komórek i wymiany medium wykonywane były w warunkach sterylnych w komorze z laminarnym przepływem powietrza.

### 3.1.1 Induktor śmierci – erastyna

Erastyna została po raz pierwszy opisana w 2003 roku, a jej nazwa jest skrótem od „eradicator of RAS and ST-expressing cells” (eliminatory komórek wykazujących ekspresję RAS i ST). Jest to mała cząsteczka zdolna zainicjować ferroptotyczną śmierć komórki. Erastyna wiąże się i aktywuje zależne od napięcia kanały anionowe (VDAC), odwracając hamowanie tubuliny na VDAC2/3, hamuje układ antyporterowy cystyna-glutaminian Xc<sup>-</sup>. Komórki traktowane erastyną pozbawiane są cysteiny, co powoduje brak możliwości syntetyzowania glutationu. Brak glutationu w konsekwencji prowadzi do nadmiernej peroksydacji lipidów i śmierci ferroptotycznej komórek [146,147].



**Rysunek 2** Wzór strukturalny erastyny [147].

### 3.2 Oznaczenie żywotności komórek

Komórki wysiewano po 8-10 tysięcy na dołek (w zależności od linii komórkowej) na płytkę 96-dołkową, na 24 godziny przed eksperymentem, w celu umożliwienia im przyłgnięcia do dna dołka (w przypadku komórek adherentnych, natomiast krok ten pomijano przy komórkach nieadherentnych). Po etapie adaptacji i adhezji komórki traktowano induktorem ferroptozy - erastyną w kilku dawkach, określono  $IC_{50}$ , stężenie podawanego związku, które powoduje redukcję żywotności w 50% w porównaniu do nietraktowanej kontroli (Tabela 1) i wybrano dwie dawki, którymi następnie traktowano linie komórkowe w celu indukcji śmierci komórkowej. Ponownie sprawdzono odpowiedź oceniając żywotność (aktywność mitochondrialną) komórek. Wysianą płytkę podzielono na trzy części (komórki kontrolne nietraktowane, oraz traktowane), zostawiając skrajne dołki wolne, jako próbę ślepą (blank). Do komórek badanych dodano roztwór erastyny w dwóch dawkach, 5 i 10  $\mu M$ , w pełnej pożywce, żywotność oceniona została po upływie 24 godzin przez dodanie odczynnika MTT. Reakcja opiera się na katalizowanej przez mitochondria konwersji substratu z żółtawego, rozpuszczalnego w wodzie, bromku 3-[4,5-dimetylotiazolo-2-ilo]-2,5-difenylo-tetrazolu (MTT) do purpurowego, nierozpuszczalnego w wodzie, MTT-formazanu. Zamiennie użyto też odczynnika MTS, związku tetrazoliowego (3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-5-(3-karboksymetoksyfenylo)-2-(4-sulfofenylo)-2H-tetrazoliowy, sól wewnętrzna; MTS). Oznaczenie wykonano wg protokołu producenta [148,149] (Promega).



### **3.3 Pomiary i analiza cytometryczna**

Komórki wysiane zostały na 6-dołkowe płytki na 24 godziny (w przypadku komórek adherentnych, natomiast krok ten pomijano przy komórkach nieadherentnych) a następnie traktowano roztworem induktora ferroptozy, erastyny w dwóch dawkach, 5 i 10  $\mu\text{M}$  przez 24 godziny. Po inkubacji komórki zebrano, rozdzielono po 300  $\mu\text{l}$  zawiesiny komórkowej do probówek 1,5 ml, typu eppendorf. Następnie dodano barwniki (MitoSox, DAF-FM, carboxy-H2DCFDA lub CellRox Green). Próbkę inkubowano w ciemności 20 minut, następnie odwirowano i przepłukiwano roztworem soli fizjologicznej (PBS). W przeciągu kolejnych 20 minut wykonano analizę przy pomocy cytometru przepływowego FACSAria™ III (Becton Dickinson).

#### **3.3.1 Analiza cyklu komórkowego**

Połowę zawiesiny komórkowej z dołka odpipetowano, przepłukano PBS i zawieszono w 400  $\mu\text{l}$  70% etanolu i zamrożono na  $-20^{\circ}\text{C}$  do czasu analizy. Przed pomiarem próbki odwirowano (2000 rpm, 3 minuty), przepłukano dwukrotnie sterylnym buforem PBS i ponownie odwirowano. Znad osadu usunięto PBS pozostawiając ok 50  $\mu\text{l}$ , dodano RNAzę do końcowego stężenia 20  $\mu\text{l/ml}$  (Merck). Następnie barwiono jodkiem propidyn (PI, stężenie końcowe 100  $\mu\text{g/ml}$ ; Merck). Wnika on do martwych komórek barwiąc ich kwasy nukleinowe na kolor czerwono – pomarańczowy [150]. Mieszaninę inkubowano przez 15 minut w ciemności, a następnie próbki analizowano przy pomocy cytometru przepływowego FACSAria™ III (Becton Dickinson, laser 488 nm, LP 550, BP 575/25).

#### **3.3.2 Analiza śmierci apoptotycznej**

Wpływ induktora na indukcję śmierci apoptotycznej oceniono na podstawie ilości komórek nekrotycznych i apoptotycznych przy pomocy cytometrii przepływowej i zestawu Annexine-V-FITC apoptotic Kit (Invitrogen). Zebrane komórki przepłukano PBS i zawieszono w 500  $\mu\text{l}$  "annexin V-staining Buffer" (10 mM HEPES; 140mM NaCl; 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$ ; pH 7,4). Następnie dodano PI oraz

Anneksynę-V-FITC, mieszaniny inkubowano 30 min w ciemności w temperaturze pokojowej, następnie wykonano pomiar cytometryczny. Metoda ta polega na rozróżnieniu komórek nienaruszonych (brak sygnału PI/FITC), wczesno-apoptotycznych (brak PI/obecność sygnału FITC) oraz późno-apoptotycznych (obecność sygnałów PI/FITC) i nekrotycznych (sygnał PI/ brak FITC). Podczas analizy komórki z pozytywnym sygnałem PI uznano za nekrotyczne, natomiast FITC za apoptotyczne [151].

### **3.3.3 Analiza Reaktywnych form tlenu**

W celu oznaczenia komórkowego poziomu RFT użyto odczynnika CellRox Green Reagent w stężeniu końcowym 5  $\mu$ M (Thermo Scientific, pomiar całkowitego poziomu RFT; cytoplazmatycznego i jądrowego) Pomiar wykonano za pomocą cytometru przepływowego FACSAria™ III, przy ustawieniach dla kanału FITC (laser 488 nm, LP 505, BP 530/30). Barwnik CellRox Green wykazuje fluorescencję zieloną wyłącznie w żywych komórkach i wykryciu reaktywnych form tlenu [152].

### **3.3.4 Analiza anionorodnika ponadtlenkowego**

Pomiar poziomu anionorodnika ponadtlenkowego w komórkach dokonano za pomocą barwnika MitoSOX w stężeniu końcowym 500 nM. Barwnik ten utlenia się w kontakcie z anionorodnikiem ponadtlenkowym w komórce, czego efektem jest czerwona fluorescencja [153]. Po zebraniu komórek, dodano barwnik i inkubowano przez 30 minut w 37°C. Następnie poziom fluorescencji został zmierzony za pomocą cytometru przepływowego FACSAria™ III, przy ustawieniach dla kanału PE (laser 561 nm, LP 556, BP 585/42).

### **3.3.5 Analiza tlenu azotu**

Pomiar tlenu azotu (NO) wykonano z użyciem barwnika DAF-FM, który nie wykazuje fluorescencji do czasu związania się z NO. DAF-FM wiążąc się z NO tworzy związek benzotiazolu, który wykazuje zieloną fluorescencję [154].

Komórki zebrano z szalki, dodano barwnika, aby końcowo stężenie roztworu wynosiło 1  $\mu\text{M}$  stężenie i inkubowano przez 30 minut w 37°C. Następnie zmierzono poziom fluorescencji dla kanału FITC przy pomocy cytometru przepływowego - Becton Dickinson FACSAria III, (laser 488 nm, LP 503, BP 530/30).

### **3.3.6 Flowing software**

Analiza danych uzyskanych z cytometrii przepływowej wykonana została przy użyciu programu Flowing Software wersja 2.5.1 (wydana 4.11.2013). Program ten umożliwia tworzenie histogramów, wykresów punktowych oraz statystyki, przy udziale zawartych regularnych narzędzi analitycznych. Jest to projekt badawczy, a jego autorem jest Perttu Terho, Turku Centre for Biotechnology University of Turku, Finland. Projekt ten miał na celu uzyskanie przyjaznego i skutecznego narzędzia, dzięki któremu możliwa byłaby analiza danych z przepustowością zarówno wysoką jak i podstawową.

## **3.4 Badanie zmian ekspresji genów**

Izolację całkowitego RNA, reakcję odwrotnej transkrypcji i RT-qPCR, przeprowadzano z zachowaniem szczególnej ostrożności, aby do mieszaniny nie dostały się RNAzy, w tym celu sprzęt, rękawiczki oraz blat roboczy przetarto inhibitorem RNAz – LabZap firmy A&A Botechnology.

### **3.4.1 Izolacja całkowitego RNA**

Izolacja została przeprowadzona na komórkach kontrolnych oraz tych potraktowanych induktorem. Komórki zebrane z naczyń hodowlanych zawieszono w 400  $\mu\text{l}$  fenozeolu, a następnie wykonano izolację zgodnie z protokołem załączonym do zestawu do izolacji całkowitego RNA firmy A&A Botechnology [155]. Po oczyszczeniu RNA wyplukano je z krzemionkowego złoża minikolumny dodając 50  $\mu\text{l}$  wody jałowej. Po zakończonej procedurze zmierzono stężenie otrzymanego RNA, przy pomocy *NanoDrop 2000* (Thermo Fisher Scientific). Urządzenie to mierzy absorbancję próbek o objętości od 0,5  $\mu\text{l}$

do 2 µl, DNA, RNA jak również białek. Do badań genomycznych wykorzystywany jest materiał niezdegradowany, mający odpowiednią czystość i jakość, czego miarą jest stosunek A260/A280, którego wartość była dla RNA powinna być większa niż 2.

### **3.4.2 Odwrotna transkrypcja**

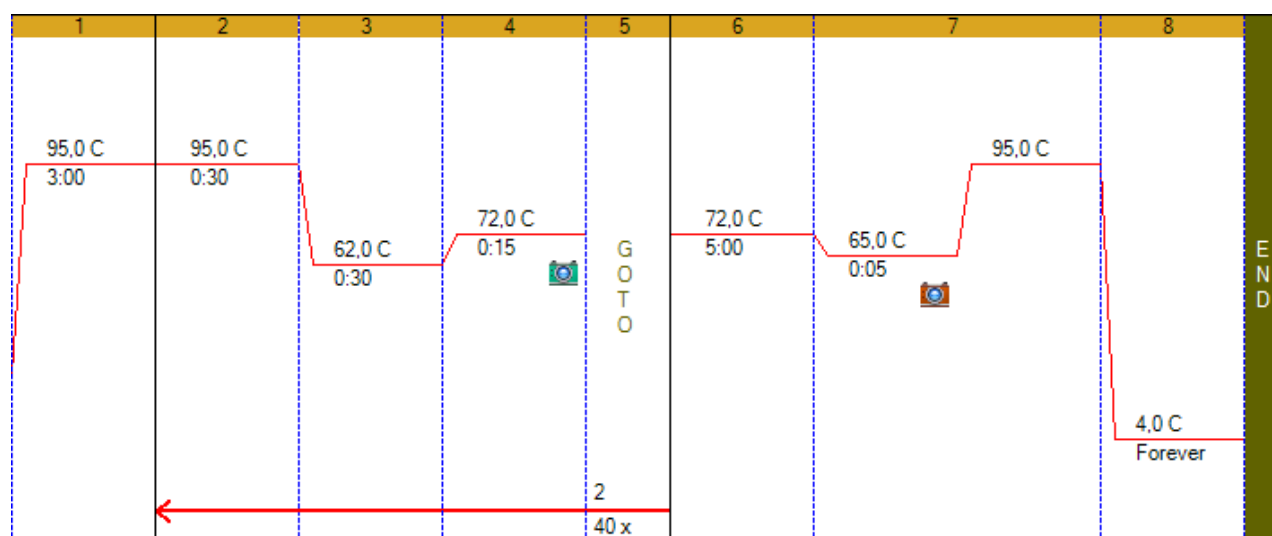
Uzyskane matrycowe RNA, poddane zostało odwrotnej transkrypcji zestawem NG-dART firmy EURx w wyniku, czego otrzymano cDNA. Reakcje w obrębie eksperymentu były przeliczane na podstawie pomiaru absorbancji na maksymalną ilość RNA, jakie można przepisać z próbki o najmniejszym stężeniu. Reakcję złożono zgodnie z protokołem producenta [156], przygotowując mieszaninę reakcyjną RNA z wodą. Reakcję przeprowadzono w termocyklerze (BioRad), inkubując w pierwszym kroku mieszaniny przez godzinę w 50°C, a następnie w celu terminacji reakcji kolejne 5 minut w 85°C. Otrzymane cDNA przechowywano w -20°C, do czasu dalszych eksperymentów.

### **3.4.3 Real-time-qPCR**

Ilościowa reakcja PCR w czasie rzeczywistym, czyli real-time-qPCR (RT-qPCR), wykorzystana została do zbadania poziomu realtywnego przyrostu ekspresji genów w komórkach po zastosowaniu induktora śmierci ferroptotycznej, następującej w wyniku akumulacji produktów peroksydacji lipidów. Metoda ta polega na oznaczeniu ilościowym cDNA, przepisane na transkryptach mRNA badanych genów. W reakcji użyty został barwnik fluorescencyjny SYBR® Green, służący do detekcji amplifikowanego fragmentu cDNA, który to wiąże się do dwuniciowego DNA, jednak, co za tym idzie wiąże się również do niespecyficznych produktów, takich jak primer-dimer (cząsteczki primerów połączone ze sobą). Może prowadzić to do uzyskania wyników fałszywie dodatnich [157].

Próbki rozplanowano na płytkę 96-dołkową tak, aby na każdy dołek w reakcji dodawane było po 1 ng cDNA. Mieszaninę reakcyjną przygotowano na 3 dołki badane oraz 3 referencyjne i pół dołka zapasu. W próbówce

wymieszano kolejno wodę, cDNA i RT PCR Mix SYBR® (A&A Biotechnology), następnie zworteksowano i zwirowano, a następnie podzielono na dwie próbki. Reakcję przygotowano na 15 µl na jeden dołek/reakcję zgodnie z protokołem producenta [158] (A&A biotechnology). Reakcja została przeprowadzona zgodnie z protokołem (Rys. 3), a dla każdego z primerów użyto odpowiedniej temperatury przyłączania starterów (Tabela 2) w kroku 3.



**Rysunek 3** Protokół temperaturowy reakcji RT-qPCR z programu CFX Maestro 1.1 firmy Bio-Rad.

**Tabela 2** Sekwencje primerów użytych w reakcji RT-qPCR i temperatura ich przyłączania w reakcji PCR.

Gen	Primer forward (5'- 3')	Primer reversed (5'- 3')	Tm (°C)
<b>ACSL4</b>	GCTATCTCCTCAGACACACCGA	AGGTGCTCCAACCTCTGCCAGTA	57
<b>TFRC</b>	GGAGACTGTCCCTCTGACTGG	GCTTCACATTCTTGCTTTCTGAG	57
<b>FSP1</b>	CTGCCCTTCTCTCATCTTATCCT	CTGCCTCACCATGTCCTCATAG	62
<b>TXN</b>	TGAAGCAGATCGAGAGCAAGAC	TTCATTAATGGTGGCTTCAAGC	58
<b>TXNRD1</b>	TCCTATGTCGCTTTGGAGTGC	GGACCTAACCATAACAGTGACGC	58
<b>SLC7A11</b>	TGGTCAGAAAGCCTGTTGTGT	ATGGTCAGAGACATGCCAC	57
<b>NRF2</b>	GCGACGGAAAGAGTATGAGC	TTCTGACTGGATGTGCTGGG	57
<b>GPX4</b>	AGTGAGGCAAGACCGAAGTAA	CTTCCCGAACTGGTTACACG	62

<b>IRP2</b>	TGCTGTACGAAATTGTGATGGC	CTTGAAGAAGAACACGGGCAG	62
<b>PROM2</b>	AGAGCACCTGACATTCACCC	CTCGTACCGCACCCACCTCAT	60,2
<b>RPL41</b>	TCCTGCGTTGGGATTCCGTG	ACGGTGCAACAAGCTAGCGG	57-62

Gen *RPL41* stosowany był, jako gen referencyjny (ang. *housekeeping gene*, geny porządkowe), czyli taki, który ulega stabilnej ekspresji we wszystkich komórkach, niezależnie od warunków, należy on do komórkowych szlaków metabolizmu podstawowego. Geny referencyjne są trwale ekspresjonowane niezależnie od tkanki, stadium rozwoju, stanu cyklu komórkowego czy sygnałów zewnętrznych [159]. Reakcja przeprowadzona była z użyciem Real-Time 2xPCR Master Mix SYBR A firmy A&A Biotechnology, o składzie:

Taq DNA polimeraza,

- dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP),
- MgCl<sub>2</sub>,
- bufor reakcyjny z barwnikiem SYBR Green.

Dane otrzymane z reakcji RT-qPCR oraz analiza danych, obsługa termocyklera oraz zbieranie danych, przeprowadzone zostało za pomocą programu Bio-Rad CFX Maestro 1.1 (Bio-Rad). Odczytane przez termocykler wartości cykli progowych C<sub>q</sub> (Ct) posłużyły do obliczenia względnego poziomu ekspresji badanych genów w komórkach badanych (traktowanych erastyną) w porównaniu do ekspresji względem komórek nietraktowanych (kontrolnych). W celu obliczeń skorzystano z metody  $R=2^{-\Delta\Delta C_t}$  [160]. Pomiaru wykonano dla genu referencyjnego (RPL41) oraz dla genów markerowych śmierci (Tabela 2). Dało to możliwość obliczenia ratio, tzw. relatywnego przyrostu ekspresji (R), na bazie intensywności poziomu fluorescencji danego genu w punkcie odcięcia C<sub>q</sub> (C<sub>q</sub><sub>badany</sub> oraz C<sub>q</sub><sub>referencyjny</sub>), używając wzoru [160,161]:

$$R = \frac{2^{\Delta C_q \text{ badany (kontrola-próba badana)}}}{2^{\Delta C_q \text{ referencyjny (kontrola-próba badana)}}}$$

gdzie:

R- relatywny przyrost ekspresji badanego genu, przyrost ilości transkryptu w próbie do genu referencyjnego

$\Delta Cq_{\text{badany}}$  - różnica wartości cykli progowych (Cq) dla genu badanego, nietraktowana próba minus traktowana,

$\Delta Cq_{\text{referencyjny}}$  - różnica wartości cykli progowych (Cq) dla genu referencyjnego, nietraktowana próba minus traktowana.

Obliczenia wykonywane zostały w programie Microsoft Excel 2010.

### **3.5 Oznaczenie wewnątrzkomórkowego żelaza**

Stężenie żelaza zmierzono za pomocą zestawu Iron Stain Kit (Prussian Blue Stain) (Abcam, ab150674). W celu pomiaru żelaza wewnątrzkomórkowego, komórki wysiano po 200 tysięcy na szkiełka nakrywkowe znajdujące się na płytce 6-dołkowej, następnego dnia dodano induktor ferroptozy, erastynę w dwóch dawkach, 5 i 10  $\mu\text{M}$ . Do barwienia tkanek żelazem, Iron Stain Kit (Prussian Blue Stain) zastosowano zgodnie z procedurą producenta. Komórki na szkiełku płukano wodą destylowaną i barwiono roztworem żelaza przez 3 min. Morfologię tkanki wizualizowano za pomocą dostarczonego roztworu czerwieni jądrowej. Następnie preparat utrwalono i wykonano zdjęcia komórek na mikroskopie w świetle widzialnym (OLYMPUS, model aparatu: DP72).

### **3.6 Badanie zmian ekspresji białek (metoda western blot)**

Komórki wysiano po 400 tysięcy na płytkę 6-dołkową, po 24 godzinach indukowano roztworem erastyny w dwóch dawkach 5 i 10  $\mu\text{M}$ . Po 24 godzinach inkubacji całkowite lizaty białkowe zebrano poprzez zeskrobanie komórek w buforze RIPA (1 x PBS, 1% NP-40, 0,1% SDS, 0,5% SDC, 50 mM NaF, 1 mM PMSF) uzupełnionym mieszaniną inhibitorów proteazy (Roche Molecular Systems, Inc; Rotkreuz, Szwajcaria). Próbkę inkubowaną była na lodzie przez 15 minut, a następnie lizaty odwirowywano (4°C przez 15 minut przy 22 000  $\times$  g) i do dalszych etapów procedury wykorzystywano supernatant. Próbkę zawierającą taką samą ilość białka (30  $\mu\text{g}$ ) rozdzielono na żelach gradientowych poliakryloamidowych (10 % lub 12 %) razem z markerami masy cząsteczkowej (Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards, Bio-Rad). Półsuchy transfer na

membranę nitrocelulozową przeprowadzono stosując system Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad). Membranę zablokowano 5% roztworem mleka przez godzinę (mleko rozpuszczone w TTBS) przemyto TTBS (0.25 M Tris-HCl (pH 7.5), 0.15 M NaCl, and 0.1% Tween-20) 3 razy po 10 minut w temp. temperaturze pokojowej. Po odpłukaniu niespecyficznie związanych przeciwciał, membrany inkubowano przez godzinę w roztworze 5% mleka w TTBS z przeciwciałem drugorzędowym. Immunodetekcję przeprowadzono przy użyciu odczynników ECL z zestawu Western Bright Quantum (Advansta, San Jose, CA, USA). Po aktywacji sygnału wykonano zdjęcia przy użyciu G: BOX chemiXX6 (Syngene, Frederick, MD, USA). GAPDH wykrywano za pomocą pierwszorzędowego króliczego przeciwciała anty-human (1:5000), a następnie skoniugowanego z HRP drugorzędowego mysiego przeciwciała anty-króliczego (1:10 000) (oba z Santa Cruz Biotechnology). Do wykrycia GPX4 użyto przeciwciała anty-human (1:500) firmy Proteintech z drugorzędowym anty-rabbit (1:20 000) firmy Santa Cruz. Badanie zmian ekspresji białek metodą western blot wykonano we współpracy z dr Damianem Sojką z Narodowego Instytutu Onkologii w Gliwicach.

### **3.7 Badanie poziomu totalnego glutationu w komórce (GSH/GSSG)**

Komórki wysiano po 10 tysięcy na 96-dołkowej płytce (Sarstedt, Niemcy). Do pożywki hodowlanej dodano monochlorobiman (MCB; Sigma, Niemcy), który penetruje komórki i reaguje z GSH, tworząc związek fluorescencyjny GSH-monochlorobiman [162]. Próbki inkubowano ze związkiem przez 30 minut, po czym zmierzono fluorescencję przy długości fali  $\lambda=490$  nm (wzbudzenie: 394 nm, emisja: 490 nm), stosując czytnik płytek (Infinite 200 PRO, Tecan, Männedorf, Szwajcaria).



### **3.8 Oznaczenia zmian w mitochondrialnym potencjale błonowym $\Delta\Psi_m$**

Podczas indukcji śmierci komórkowej, jak również procesów komórkowych związanych z produkcją RFT w komórce dochodzi do zmian potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Spadek potencjału skutkuje uwolnieniem do cytoplazmy cytochromu c, wzrostem produkcji reaktywnych form tlenu, aktywacją kaspaz, a co za tym idzie indukcją apoptozy [49,84]. W celu określenia zmiany potencjału błonowego mitochondriów ( $\Delta\Psi_m$ ), wykorzystany został ester tetraetylorodaminy (TMRE, Sigma) - związek specyficznie łączący się z wewnętrzną stroną błony mitochondrialnej [108,163]. Dzień przed podaniem induktora, komórki w ilości 10 tysięcy siano na płytkę 96-dołkową. Następnego dnia komórki poddano indukcji erastyną i inkubowano kolejne 24 h. Po indukcji do komórek podawano roztwór TMRE o końcowym stężeniu 50 nM (Sigma), a następnie inkubowano 20 minut w 37°C, próbki przepłukano PBS i analizowano za pomocą multifunkcyjnego czytnika płytek Varioskan™ LUX (Thermo Fisher Scientific, wzbudzenie: 547 nm, emisja: 585 nm).

### **3.9 Ocena zmian masy mitochondrialnej**

Ocenę zmiany masy mitochondrialnej w badanych komórkach dokonano wykorzystując barwnik fluorescencyjny 3,6-bis(dimetylamino)-10-nonyl akrydynę (N-nonylo oranż akrydyny - NAO; Molecular Probes), barwnik ten wiąże się z mitochondriami niezależnie od ich potencjału błonowego [164]. Dzień przed podaniem induktora, komórki w ilości 10 tysięcy siano na płytkę 96-dołkową. Następnego dnia komórki poddano indukcji erastyną i inkubowano 24 h. Po indukcji do komórek podawano roztwór NAO o końcowym stężeniu 100 nM (Sigma), a następnie inkubowano 20 minut w 37°C, próbki przepłukano PBS i analizowano za pomocą multifunkcyjnego czytnika płytek Varioskan™ LUX (Thermo Fisher Scientific). Poziom fluorescencji mierzono przy wzbudzeniu 489 nm, oraz emisji 525 nm.

### 3.10 Mikroskopia TEM

Komórki traktowane erastyną w dwóch dawkach, 5 i 10  $\mu\text{M}$  po upływie 24 godzin utrwalono w 3% aldehydzie glutarowym w buforze kakodylanowym (pH 7,4) przez 60 minut w temperaturze pokojowej. Następnie komórki przemyto kilkakrotnie w buforze kakodylanowym (pH 7,4) i po ostatnim przemyciu komórki w buforze ogrzano do 37°C. Następnie usunięto bufor i taką samą objętość 2% agarozy niskotopliwej (o niskiej temperaturze żelowania (typ VII, Sigma-Aldrich), szybko dodano do komórek i pozostawiono na 15 minut w temperaturze 37°C. Po tym czasie komórki usunięto z szalek i przeniesiono do probówek eppendorfa, w celu odwirowania przy 2000 g przez 2 minuty w temperaturze 37°C. Na koniec probówki eppendorfa z komórkami w agarozie umieszczono w lodówce na 30 minut i utwardzone bloki agarozowe pocięto na małe kawałki.

Następnie zatopione komórki utrwalono w 1% tetratlenku osmu i odwodniono w szeregu etanolu (50%, 70%, 90% i 96%) i tlenku propylenu. Następnie próbki infiltrowano mieszaninami 2:1 (obj.:obj.) i 1:2 (obj.:obj.) tlenku propylenu/Epon 812, zatopiono w żywicy epoksydowej Epon 812 (SERVA Electrophoresis GmbH — Heidelberg, Niemcy), a następnie polimeryzowano przez 48 godz. w 60°C. Ultracienkie skrawki wycięto z reprezentatywnych próbek nożem diamentowym (45°C; Diatom AG, Biel, Szwajcaria) przy użyciu Power Tomo PC RMC Boeckeler, zamontowano na siatkach miedzianych o oczkach 300 i wybarwiono 0, 5% wodnym roztworem octanu uranylu i cytrynianem ołowiu za pomocą barwnikiem Leica EM AC 20. Po wysuszeniu na powietrzu siatek zbadano je w transmisyjnym mikroskopie elektronowym TECNAI™ G2 12 Spirit BioTWIN (FEI, Eindhoven, Holandia) przy 120 kV. Obrazy z reprezentatywnych regionów zostały zarejestrowane za pomocą kamery Morada CCD (Olympus Soft Imaging System Solutions GMBH, Münster, Niemcy). Obrazowanie wykonano we współpracy z dr Darią Gendosz de Carillo oraz mgr inż. Łukaszem Mielańczykiem z Katedry i Zakładu Histologii i Patologii Komórki w Zabrze-Rokitnicy, Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.

### **3.11 Analiza poziomu oksydacji lipidów**

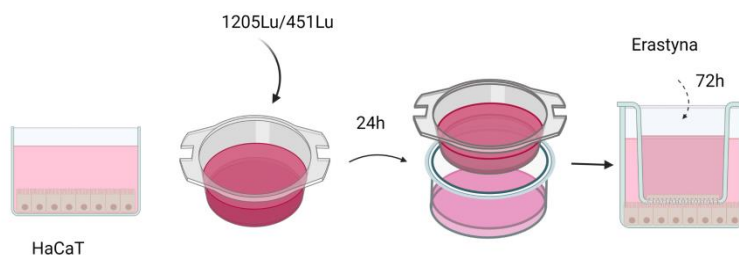
Ocenę poziomu oksydacji wykonano na dwa sposoby: poprzez odczyt fluorescencji na czytniku fluorescencyjnym oraz mikroskopie konfokalnym (rozdział 3.12).

Komórki w ilości 10 tysięcy na dołek wysiano na płytkę 96-dołkową na dzień przed eksperymentem. Następnego dnia komórki inkubowano przez 30 min w 37°C z C11-BODIPY (581/591) (Cayman) w końcowej ilości 1  $\mu\text{M}$ , następnie dwa razy przepłukano PBS i dodano erastynę w dwóch dawkach, 5 i 10  $\mu\text{M}$ . Odczyt wykonano na czytniku płytek wielofunkcyjnym Varioskan™ LUX (Thermo Fisher Scientific, wzbudzenie: 484/581; emisja: 510/610).

### **3.12 Mikroskopia konfokalna**

Komórki wysiano w ilości 20-25 tysięcy (w zależności od linii tak, aby można było obejrzeć pojedyncze komórki) na płytkę do obserwacji mikroskopowych, ze szkiełkiem na środku płytki ( $\mu$ -Dish 35 mm, ibidi), o powierzchni 3.5 cm<sup>2</sup>, na dzień przed eksperymentem. Następnego dnia komórki inkubowano przez 30 min w 37°C z C11-BODIPY (581/591) (Cayman) w końcowej ilości 1  $\mu\text{M}$ , następnie dwa razy przepłukano PBS i dodano erastynę w dwóch dawkach, 5 i 10  $\mu\text{M}$ . Po upływie 24 h sygnały zostały przechwycone przy użyciu mikroskopu konfokalnego Olympus FluoView FV1000™ (Olympus LS, Tokio, Japonia), akwizycję wykonano w dwóch kanałach: (zielony) 493/552 nm oraz (czerwony) 570/670 nm. Otrzymane obrazy przetwarzano i zapisywano przy użyciu programu Imaris Viewer 10.0.0 (Oxford instruments).

### 3.13 Efekt sąsiedztwa (Bystander Effect)



**Rysunek 4** Schemat eksperymentu ko-inkubacji do badania sygnalizacji międzykomórkowej. Utworzono za pomocą BioRender.com.

W eksperymentalnym układzie zbadano odpowiedź biologiczno-chemiczną w komórkach, które nie były bezpośrednio poddane działaniu erastyny. W tym przypadku induktorem ferroptozy była erastyna podana bezpośrednio do insertów (Falcon) z czerniakami. Po upływie 24 godzin od wysiania komórek, inserty z komórkami czerniaka połączono z płytką, gdzie hodowano prawidłowe keratynocyty dalszą ko-inkubację prowadzono przez kolejne 72 godziny. Po zbadaniu ekspresji genów markerowych, w populacjach bezpośrednio traktowanych erastyną (czerniakach) i ko-inkubowanych (keratynocytach) oceniono charakter sygnalizacji międzykomórkowej. Zbadano ekspresję genów markerowych dla stanu zapalnego i ferroptozy.

### 3.14 Edycja genomu metodą CRISPR/Cas9

Komórki HaCaT, wysiano na płytce 24-dółkowej w konfluencji 70%-80%, następnego dnia przeprowadzono transfekcję zgodnie z protokołem. Zastosowano Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent (Invitrogen™) oraz 1 µg plazmidu Glutathione Peroxidase 4/GPX4 Double Nickase Plasmid (Santa Cruz Biotechnology), nukleaza przecina DNA na obu niciach, tworząc pęknięcia trudne do naprawy. W pierwszym kroku przygotowano mieszaninę lipofektaminy oraz plazmidu, inkubowano przez 5 minut z pożywką bez surowicy i antybiotyku w temperaturze pokojowej, w ciemności. Następnym krokiem było połączenie lipofektaminy z plazmidem i inkubacja przez 20 minut w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła. Po inkubacji dodano przygotowaną mieszaninę do komórek i pozostawiono na 4 do 5 godzin, do momentu, obserwacji zmiany kondycji

komórek. Po zakończonej inkubacji wymieniono pożywkę na świeżą. Po 24 godzinach skontrolowano proces transfekcji na mikroskopie fluorescencyjnym, na kanale GFP, JuLI\_FL™ (NanoEntek, Seul, Korea Południowa), było to możliwe, dzięki zakodowanemu genowi GFP na jednym z podanych plazmidów. Po 48 h od transfekcji, medium zmieniono na selekcyjne z puromycyną, co również było możliwe dzięki zakodowanej oporności na puromycynę na jednym z plazmidów. Po kolejnych 72 h wymieniono medium na pełne, bez puromycyny. Zebrano komórki na western blot, a następnie sprawdzono poziom białka GPX4. W przypadku uzyskania niecałkowitego wycięcia, przeprowadzono selekcję klonalną, wysiewając po jednej komórce (1/dółek) na dółek płytki 96-dółkowej. W wyniku proliferacji wyprowadzone kolonie przenoszono na coraz większe naczynia. Wykonano genetyczną i proteomiczną walidację wyprowadzonych klonów, spośród nich wybrano: klony kontrolne, (które przeszły przez proces transfekcji, ale nie mają zmiany w obrębie genu) oraz takie z całkowitym wycięciem genu GPX4. Dla sprawdzenia, czy zmiany w obrębie badanej sekwencji genu zaszły w sposób zamierzony, porównano sekwencje wprowadzanych plazmidów z sekwencją edytowaną w genomie gospodarza (uzyskane od producenta), do nich zaprojektowano startery znajdujące się powyżej i poniżej miejsc cięcia technologią CRISPR/Cas9:

```
...GTTTAAGGAGGAGGAGCGTTTCAGGTCTTCAGGGCCGCAGGGCCTC
GGTGTCCCCGCCACCGACCCGCTCCCGATCCCTTCCTGCCTCAGGG
TCCCGGGCTCAGCCTCCCGTCCACGCTCCCTGCTCAGCTTCCTTTGC
CTTGCAGTGCGCGTCCCGGGACGACTGGCGCTGTGCGCGCTCCATG
CACGAGTTTTCCGCCAAGGACATCGACGGGCACATGGTTAACCTGGA
CAAGTACCGGTGGGCGCTCGCCTGGGGTGGGGCGCGGGGTTCGGGC
CCTGGGAGGGGGCCGTGTTCTTCTGCGCTGACGCCCGGATCCTCG
CAGGGGCTTCGTGTGCATCGTCACCAACGTGGCCTCCAGTGAGGC
AAGACCGAA...
```

W modyfikowanym fragmencie genu GPX4, kolorem czerwonym i niebieskim zaznaczono szukane sekwencje sgRNA z plazmidu, natomiast na fioletowo sekwencje, dla których zaprojektowano startery. Przeprowadzenie reakcji amplifikacji fragmentu modyfikowanego genu, z zastosowaniem zestawu zaprojektowanych starterów pozwala na potwierdzenie lub wykluczenie wprowadzonej zmiany na poziomie ilościowym - dopiero zsekwencjonowanie

amplikonów pozwala na całkowite potwierdzenie/wykluczenie wprowadzonej zmiany (edycji genu).

### **3.15 PCR ilościowy**

Z osadu komórkowego wyizolowano DNA używając zestawu Genomic Mini firmy A&A Biotechnology. Zmierzono stężenie DNA i przeliczono, aby w obrębie eksperymentu każda analizowana próbka miała taką samą ilość DNA. Reakcję przygotowano przy użyciu zestawu KAPA2G Robust DNA Polymerase (Roche). Zaprojektowano startery GPX4 o następującej sekwencji:

F: GAGGAGCGTTCAGGTCTTCA

R: GTGACGATGCACACGAAGC

Przygotowane reakcję wstawiono do termocyklera i ustawiono protokół termiczny:

1. 95°C 3 minuty;
2. 95°C, 20 sekund;
3. 62,2°C, 45 sekund;
4. 72°C, 40 sekund;
5. Powrót do punktu 2, 40 cykli;
6. 72°C, 4 minut.

### **3.16 Analiza bioinformatyczna baz danych**

Wykonano analizę baz danych pod kątem sprawdzenia ekspresji genów, dla tych, których ekspresji nie potwierdzono reakcją RT-qPCR - niski poziom bazowy w komórkach lub całkowity brak ekspresji w badanej linii komórkowej. Wykonano analizę sieci regulacji (ang. *regulation network*). Analizę wykonano w oparciu o dane zdeponowane w bazach NCBI i cBioportal, FerrDb V2 [165]. W bazach tych znajdują się dane z wielu eksperymentów, w cBioportal można porównać różne typy nowotworów, sprawdzić profil genu dla danej tkanki. Baza ta umożliwia wygenerowanie, na podstawie wykonanej online analizy, wykresów w różnych formach, wizualizacji danych oraz umożliwia na pobieranie

wygenerowanych danych do dalszej i samodzielnej analizy. Dane zawarte w bazie dotyczą genomiki nowotworów.

FerrDb jest pierwszą bazą danych, które zostały potwierdzone eksperymentalnie regulatorami i markerami ferroptozy oraz skojarzeniami ferroptozy z chorobą. Adnotacje wygenerowane są z aktualnie dostępnych artykułów ferroptozy w bazie publikacji PubMed. Baza aktualizowana jest, co 6 miesięcy (ostatni dostęp w dniu 30.06.2023).

### 3.17 Analiza statystyczna

Wszystkie wyniki przedstawiono, jako średnią z co najmniej trzech biologicznych powtórzeń. Poziom istotności zmian w obrębie prób badanych, względem kontroli (próby nietraktowanej), wyznaczono za pomocą testu T-studenta, gdzie istotność statystyczną oznaczono “\*”, przy wartości  $p < 0,05$ .

#### 3.17.1 Test Q

Wszystkie wykresy utworzone zostały ze średnich wyników eksperymentalnych, następnie nałożono na nie odchylenia standardowe. Następnie wykonano test Dixona (test Q), aby wyeliminować wartości odstające. Wyniki uporządkowano w ciągu rosnąco, a następnie obliczone zostały parametry R, Q1 i Q2.

$$R = x_n - x_1$$

$$Q_1 = \frac{x_2 - x_1}{R}$$

$$Q_2 = \frac{x_n - x_{n-1}}{R}$$

$$Q = \frac{Q_1}{Q_2}$$

gdzie: R - wartość rozstępu;  $x_n$  - n-ty wyraz ciągu; Q1/Q2 - wartości testu Q.

Wartości Q1 i Q2 porównywane były z wartością krytyczną  $Q_{kr}$  odczytaną z tabeli przedziału ufności. Jeśli któraś z nich przekraczała wartość  $Q_{kr}$  odrzucana została pierwsza lub ostatni wyraz ciągu [166].

### 3.17.2 Test T

Test t-studenta jest testem parametrycznym, który polega na porównaniu ze sobą dwóch zbiorów uśrednionych wartości liczbowych. Test ten zastosowano w celu określenia, czy różnice w liniach komórkowych są istotne statystycznie. Test zakłada hipotezę, że średnie w grupach nie różnią się od siebie, na ustalonym poziomie istotności 0,05 [167].

### 3.17.3 Współczynnik korelacji Pearsona

Współczynnik Pearsona zastosowano w celu określenia, czy pomiędzy otrzymanymi wynikami, stanowiącymi zmienne prostoliniowe w przedziale domkniętym  $[-1,1]$ , istnieje korelacja. W założeniu współczynnika Pearsona, zwiększenie wartości jednej z cech powoduje proporcjonalne zmiany średnich wartości drugiej cechy (wzrost lub spadek). Na podstawie Tabeli 3, korelacje interpretowano, jako silne, słabe, ujemne lub dodatnie [168,169].

Tabela 3 Interpretacja poziomu korelacji.

KORELACJE	UJEMNE	DODATNIE
SŁABE	-0,5 do 0,0	0,0 do 0,5
SILNE	-1,0 do -0,5	0,5 do 1,0

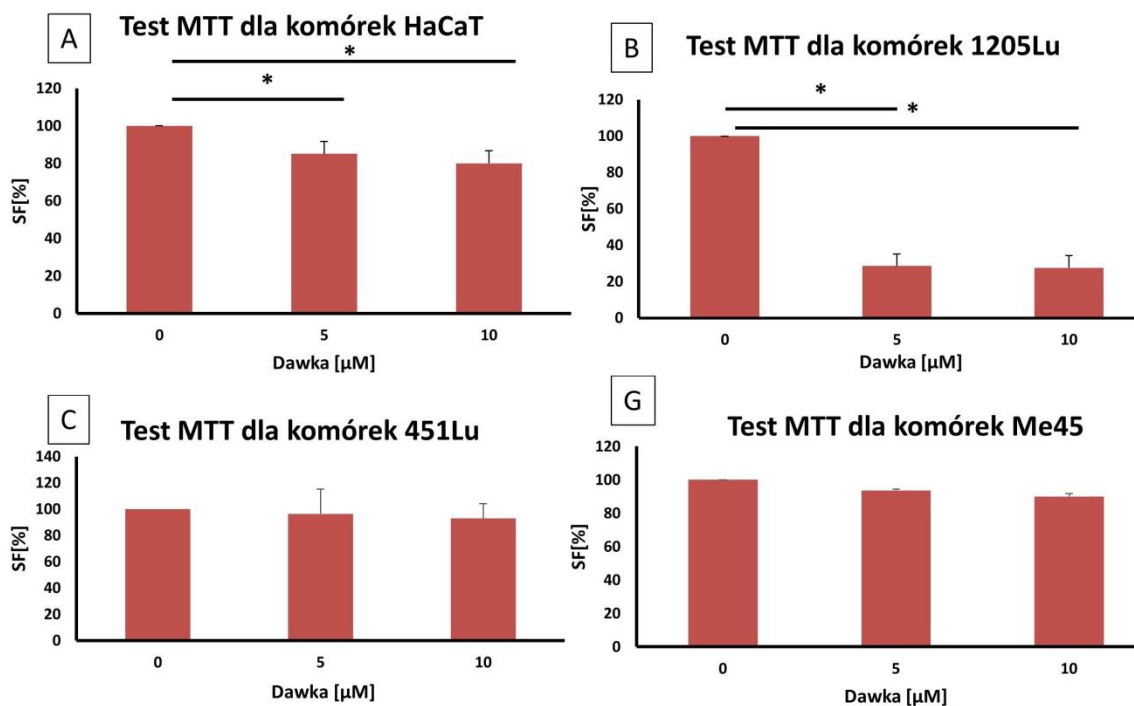


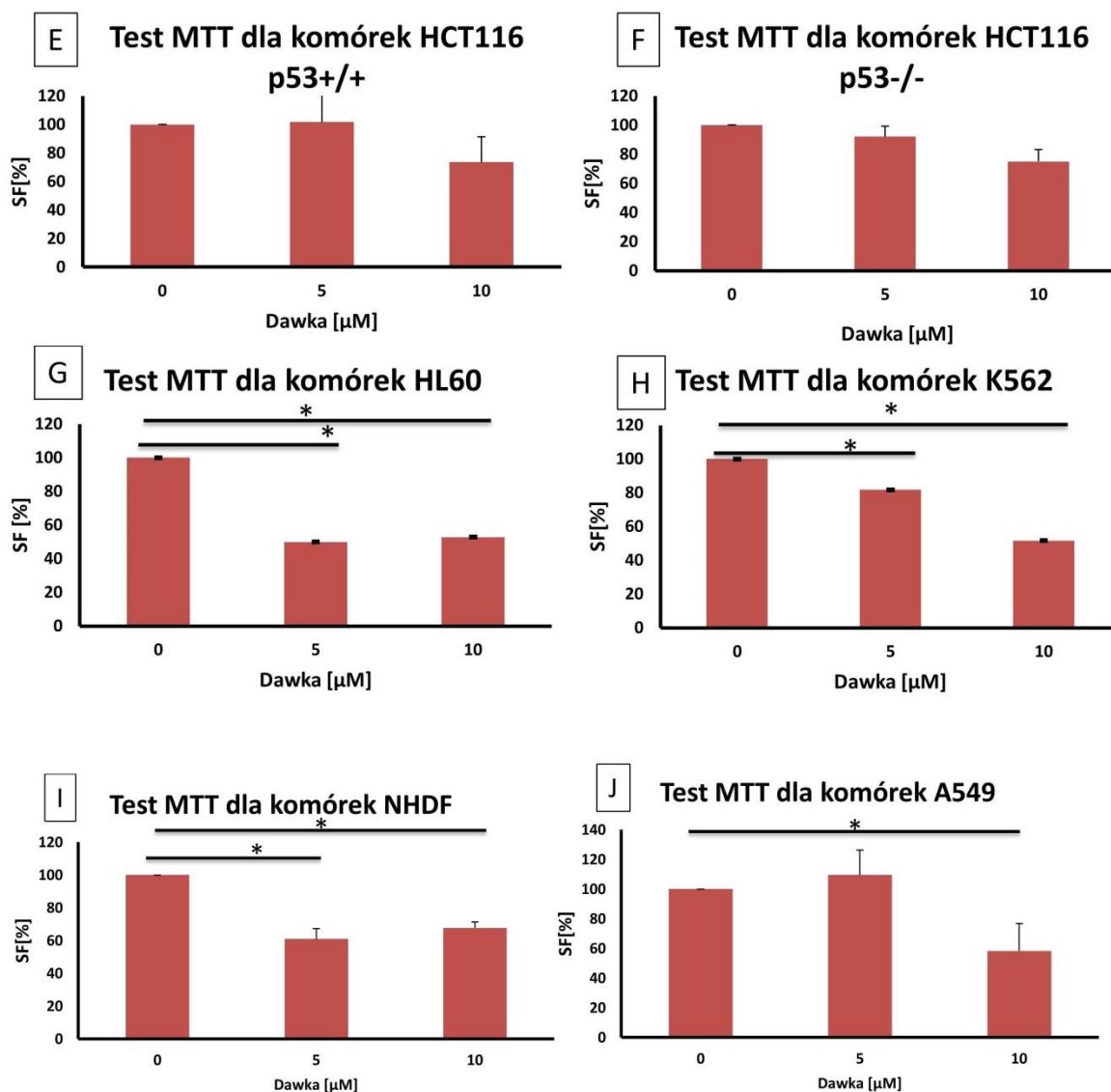
## 4. Wyniki

Z literatury wiadomo, że część komórek wykazuje wrażliwość, a część oporność na dany rodzaj śmierci. Przykładowo komórki HL60 uznawane są za wrażliwe na ferroptozę [107]. Pomiar wykonano na dziesięciu różnych liniach komórkowych, różniących się pochodzeniem tkankowym, stopniem złośliwości nowotworu, statusem zdrowe/nowotworowe, oraz statusem białka p53 (typ dziki lub knock-out).

### 4.1 Żywotność komórkowa i odpowiedź mitochondrialna

Pierwszym testem wykonanym po stymulacji komórek induktorem śmierci był test na aktywność mitochondrialną/żywotność MTT/MTS. Miał on na celu zobrazowanie kondycji komórek po zastosowaniu induktora oraz umożliwić określenie wartości  $IC_{50}$ . Początkowo badano zakres stężeniowy podawanej erastyny od 100 nm do 20  $\mu$ M, a następnie na podstawie wyników i obliczeń  $IC_{50}$  dla różnych linii wybrano dwie dawki, 5 i 10  $\mu$ M. Dla większości komórek dawki te oscylowały w zakresie wartości wyznaczonych  $IC_{50}$ .





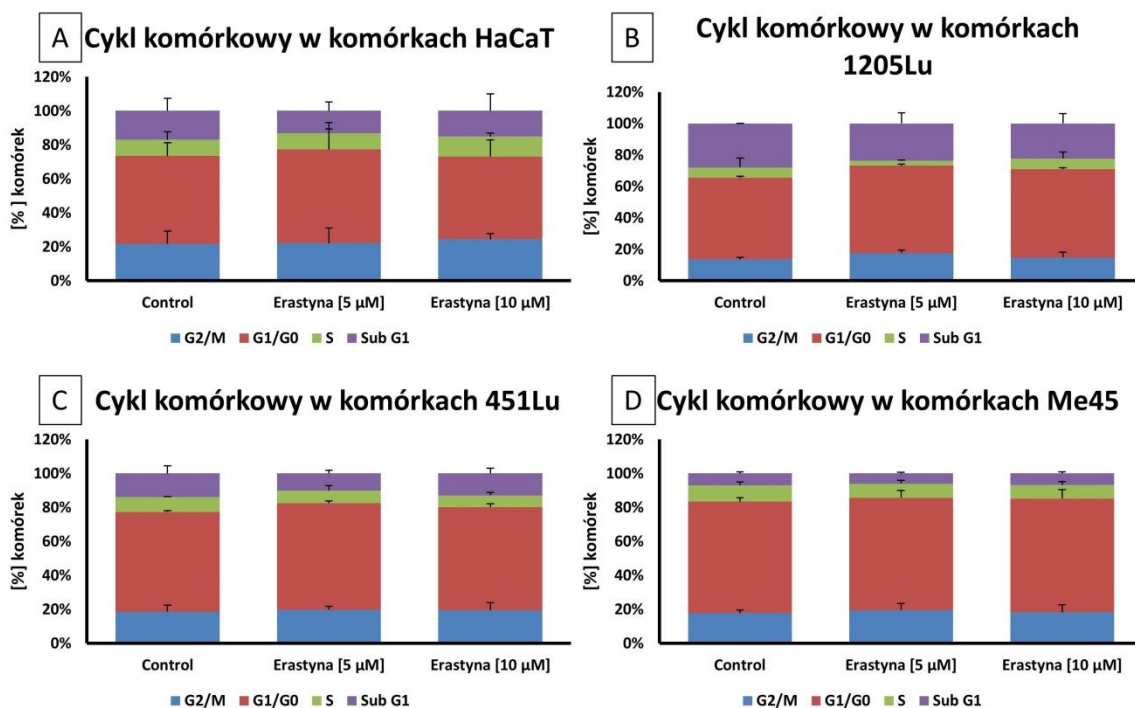
**Rysunek 5** Żywotność komórek 24 godziny po dodaniu induktora ferroptozy, erastyny w dwóch dawkach 5 i 10  $\mu\text{M}$ ; test MTT. Wartości przedstawiono jako średnią  $\pm$  odchylenie standardowe. Istotność statystyczną oznaczono “\*”, przy wartości  $p < 0,05$ .

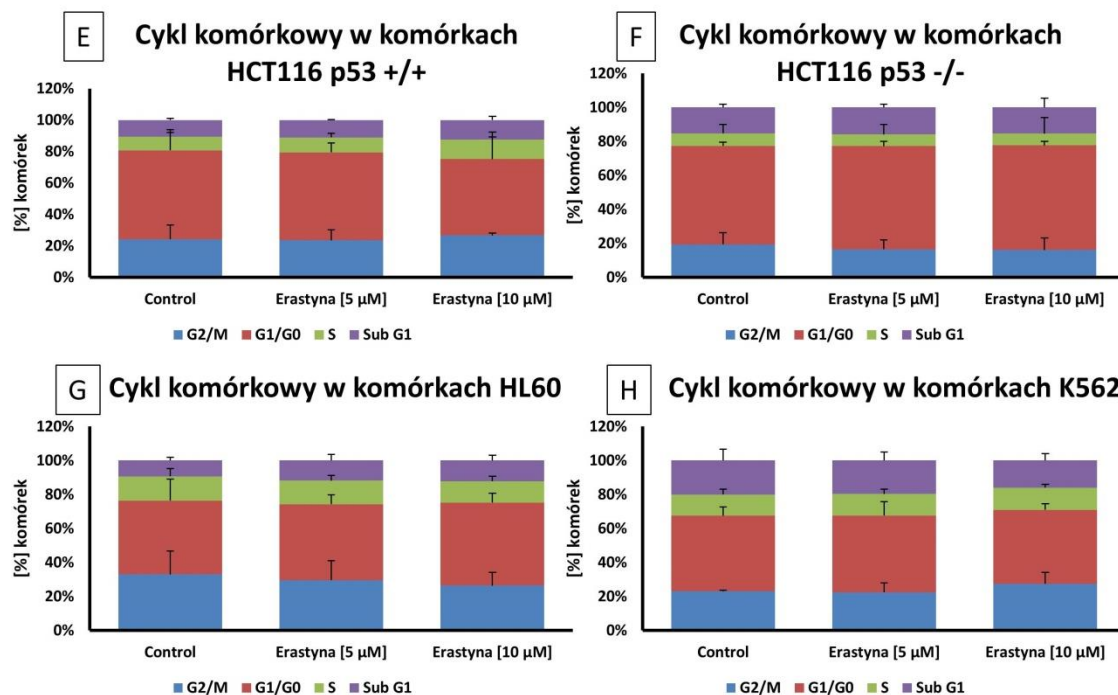
Żywotność potraktowanych komórek określono za pomocą testu MTT, a komórki kontrolne (nietraktowane) opisywano na wykresach, jako populacje traktowane dawką 0  $\mu\text{M}$ . Aktywność mitochondrialna, która przekłada się bezpośrednio na żywotność i proliferację komórek, wykazała, że dodanie induktora ferroptozy w dwóch dawkach, 5  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$  do różnych linii komórkowych daje zmienne i różne odpowiedzi. Obserwowano spadek aktywności mitochondrialnej o 5 %, do nawet 70-80 %. Dodanie induktora do HaCaT (Rys 5A), 451Lu (Rys. 5C) oraz Me45 (Rys. 5D) spowodowało niewielki

spadek żywotności, do około 90-80 %, w HCT116 p53+/+ i HCT116 p53-/- do około 70%. Natomiast w komórkach HL60 (Rys. 5G), NHDF (Rys. 5I) oraz K562 i A549, przy dawce 10  $\mu\text{M}$  do około 60%. Najmniejszą przeżywalnością odpowiedziały komórki 1205Lu, gdzie po potraktowaniu erastyną spadła ona do 20%.

## 4.2 Cykl komórkowy

Na wykresach poniżej (Rys. 6 A-H) przedstawiono zestawienie procentowej ilości komórek w poszczególnych fazach cyklu, w kontroli oraz komórkach poddanych indukcji erastyną.



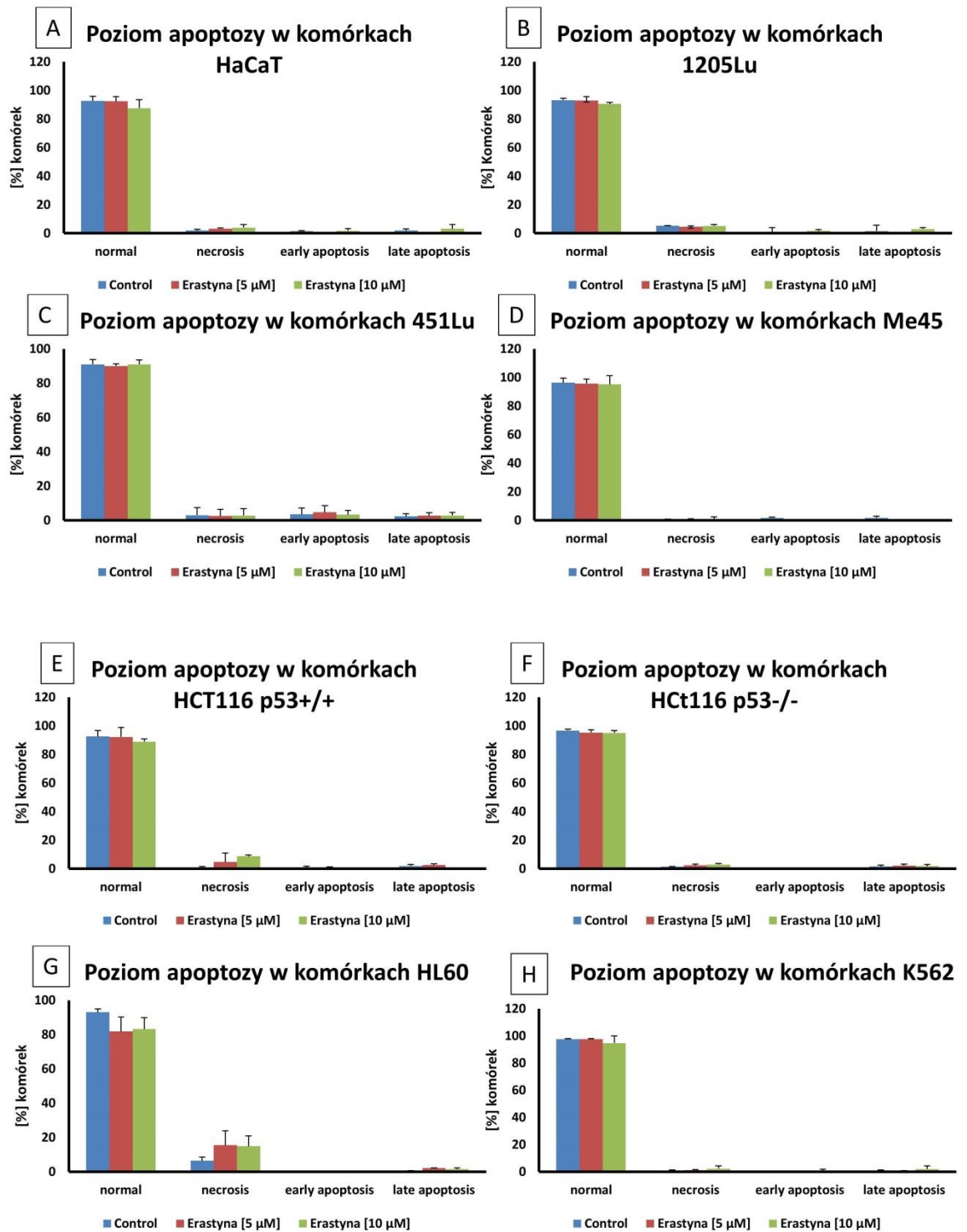


**Rysunek 6** Cytometryczna analiza cyklu komórkowego, 24 godziny po dodaniu induktora ferroptozy, erastyny w dwóch dawkach, 5 i 10  $\mu\text{M}$ . Wartości przedstawiono, jako średnią  $\pm$  odchylenie standardowe.

Nie zaobserwowano zmian w cyklu komórkowym po dodaniu induktora ferroptozy. Jedynie linia czerniaka 1205Lu nienaczenie zablokowała się w fazie G1/G0 (blokada cyklu) po erastynie w dawce 5  $\mu\text{M}$  (Rys. 6 B).

### 4.3 Śmierć apoptotyczna i nekrotyczna

Na podstawie uzyskanych wyników z żywotności pojawiło się pytanie, czy indukując śmierć związaną z akumulacją żelaza, ferroptozę specyficznym induktorem nie aktywowano dodatkowo w traktowanych komórkach ścieżki apoptozy lub nekrozy.



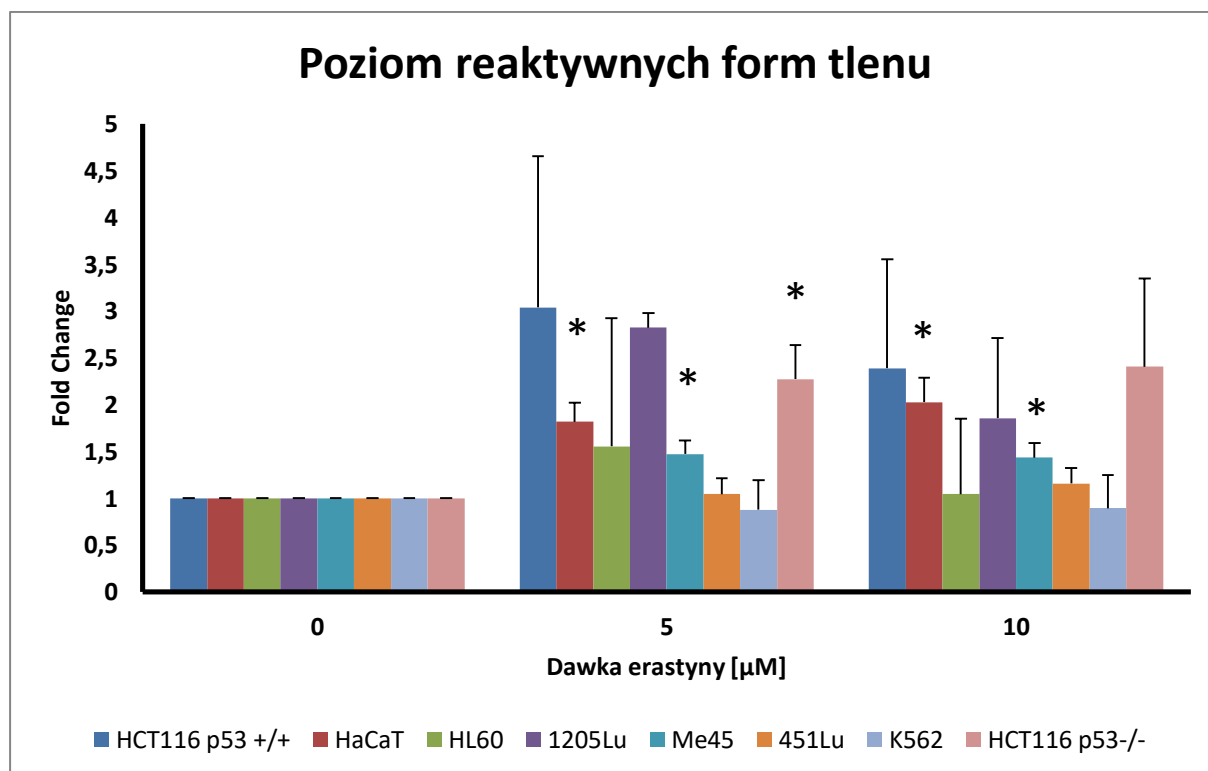
**Rysunek 7** Cytometryczna analiza poziomu apoptozy i nekrozy w komórkach 24 godziny po dodaniu induktora ferroptozy, erastyny w dwóch dawkach, 5 i 10 μM. Wartości przedstawiono, jako średnią ± odchylenie standardowe.

Nie obserwowano apoptozy ani nekrozy w komórkach traktowanych induktorem śmierci ferroptotycznej. Wynik ten świadczy o braku toksyczności erastyny wobec

komórek, w dawkach użytych w badaniach oraz o specyficzności działania induktora.

#### 4.4 Poziom reaktywnych form tlenu

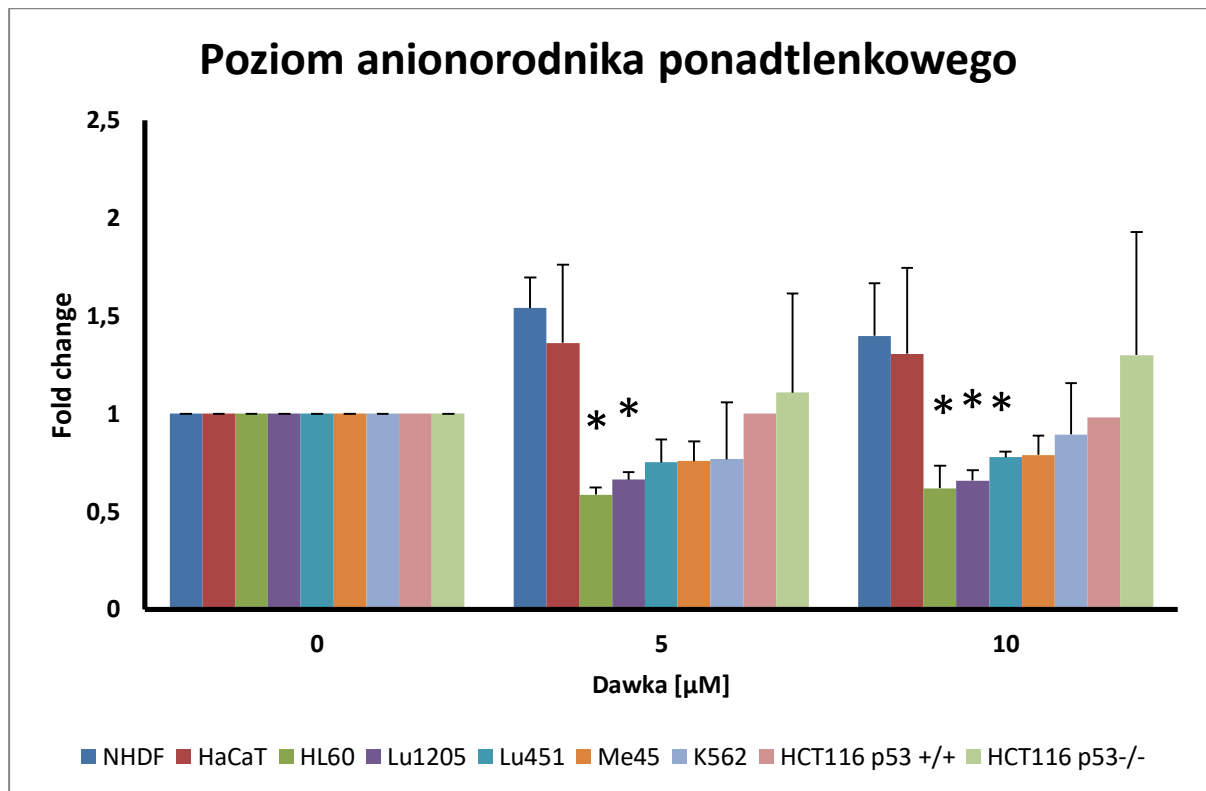
Pomiar poziomu reaktywnych form tlenu miał na celu sprawdzenie powiązania między blokadą antyportera  $xC^-$  związanego z dodaniem induktora, erastyny, a produkcją RFT.



**Rysunek 8** Poziom reaktywnych form tlenu w badanych liniach po indukcji śmierci komórkowej erastyną w dwóch dawkach 5 i 10 μM. Wartości przedstawiono jako średnią ± odchylenie standardowe. Istotność statystyczną oznaczono "\*", przy wartości  $p < 0,05$ .

Wyniki testu CellRox Green po dodaniu do komórek erastyny nie dały jednoznacznego rezultatu (Rys. 8). W niektórych liniach komórkowych obserwowano znaczny wzrost poziomu RFT: HCT116 p53+/+ i HCT116 p53-/-, HaCaT czy 1205Lu, zarówno przy niższej, jak i wyższej dawce erastyny. W przypadku HL60 i Me45 poziom RFT był zbliżony do kontrolnego, podczas gdy dla linii 451Lu i K562 obserwowano spadek (Rys 8). Wzrost poziomu reaktywnych form tlenu ukazuje wrażliwość komórek na stres związany z blokadą antyportera cysteinowo/glutaminowego.

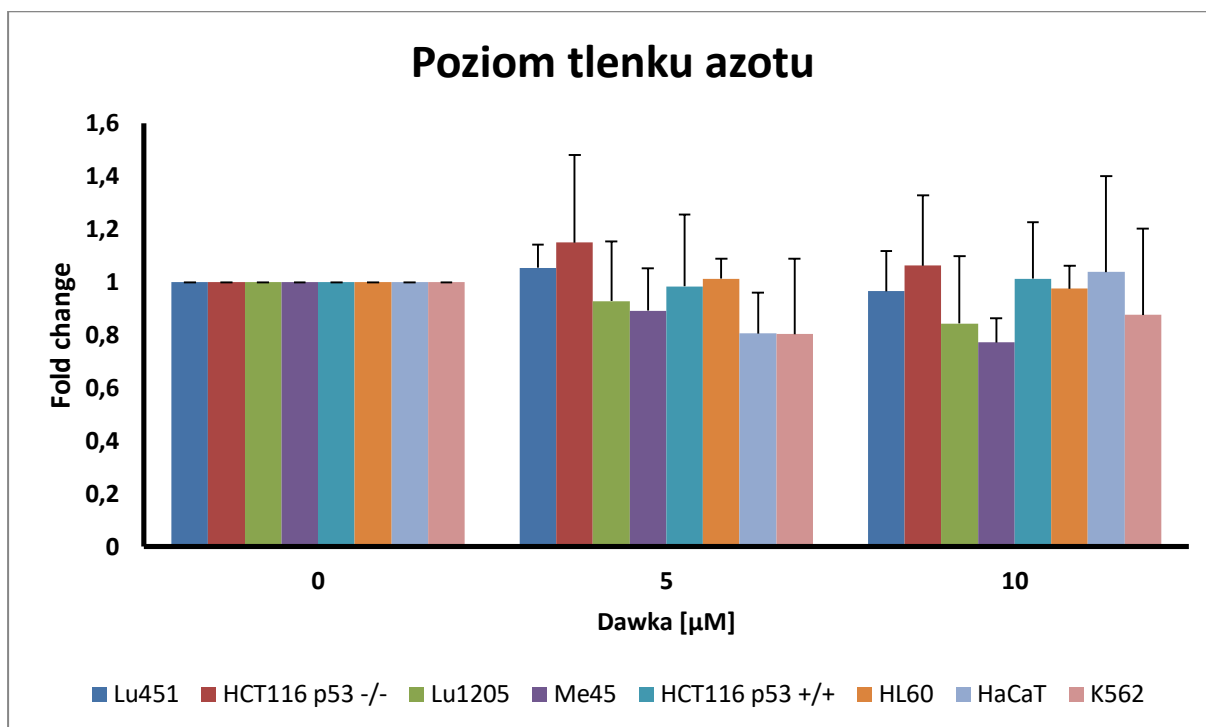
#### 4.4.1 Poziom anionordnika ponadtlenkowego



**Rysunek 9** Poziom anionorodnika ponadtlenkowego 24 godziny po dodaniu induktora ferroptozy, erastyny w dwóch dawkach 5 i 10  $\mu\text{M}$ . Wartości przedstawiono jako średnią  $\pm$  odchylenie standardowe. Istotność statystyczną oznaczono “\*”, przy wartości  $p < 0,05$ .

Dodanie do komórek erastyny spowodowało różną odpowiedź komórek (Rys. 9). Dla części komórek obserwowano znaczny wzrost poziomu anionorodnika: HCT116 p53<sup>-/-</sup>, HaCaT czy NHDF zarówno przy niższej, jak i wyższej dawce, w przypadku HCT116 p53<sup>+/+</sup>, poziom był zbliżony do kontrolnego, a dla pozostałych linii obserwowano spadek (Rys. 9).

#### 4.4.2 Poziom tlenu azotu



**Rysunek 10** Poziom tlenu azotu 24 godziny po dodaniu induktora ferroptozy, erastyny w dwóch dawkach 5 i 10 μM. Wartości przedstawiono jako średnią ± odchylenie standardowe. Istotność statystyczną oznaczono “\*”, przy wartości  $p < 0,05$ .

Dodanie do komórek erastyny nie miało wpływu na zmianę poziom tlenu azotu (Rys. 10). We wszystkich badanych liniach poziom NO był stabilny i podobny do kontroli, jedynie w komórkach HCT116 p53 -/-, zarówno przy niższej, jak i wyższej dawce obserwowano wzrost produkcji NO (Rys. 10).

#### 4.5 Ekspresja genów odpowiedzialnych za przełączanie się typów śmierci

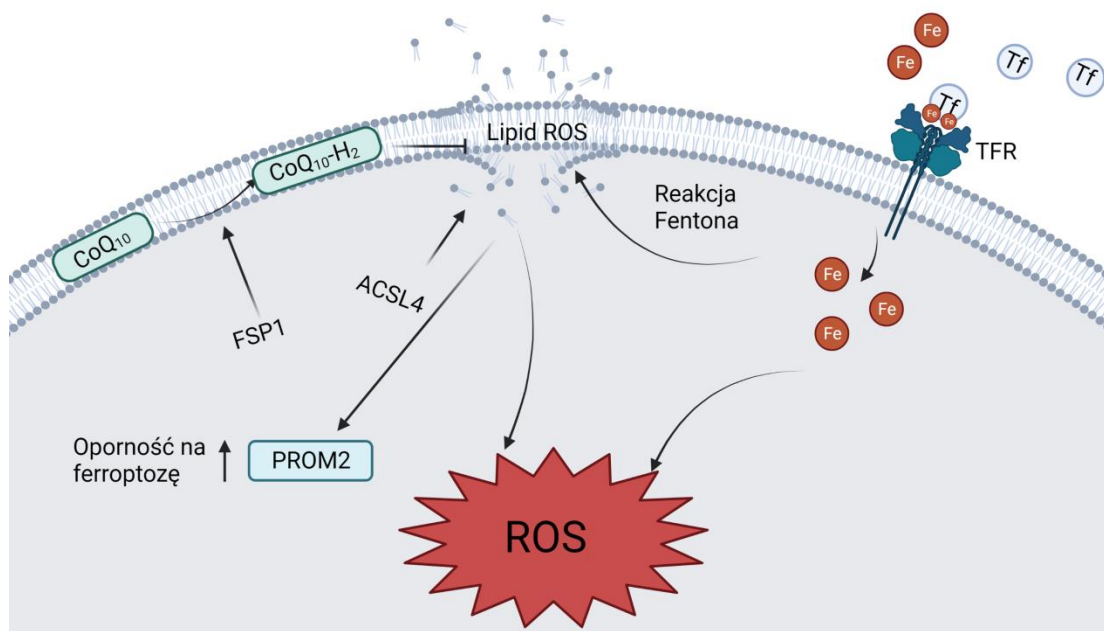
Poziom transkryptu w komórkach nie jest zawsze bezpośrednim odzwierciedleniem poziomu białek kodowanych przez geny.

Łącznie w doktoracie przeanalizowano 10 genów związanych z śmierciami komórkowymi. Uzyskując wstępne wyniki z cytotoksyczności, analizy cytometrycznej RFT oraz poziomu apoptozy/nekrozy wyznaczono geny markerowe dla zbadania poziomów ich ekspresji, tym samym charakteryzując specyficzne ścieżki



śmierci. W pierwszym kroku skupiono się na analizie regulacji procesu oksydacji lipidów (podrozdział 4.5.1; Rys. 11).

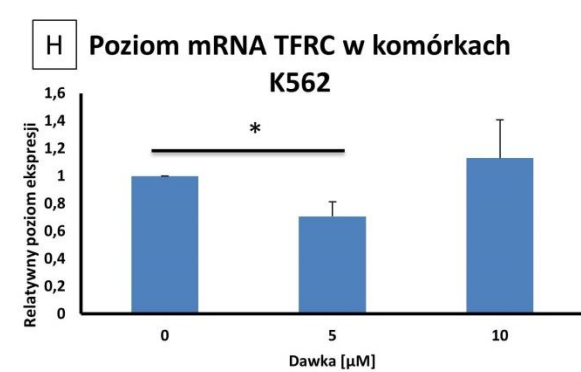
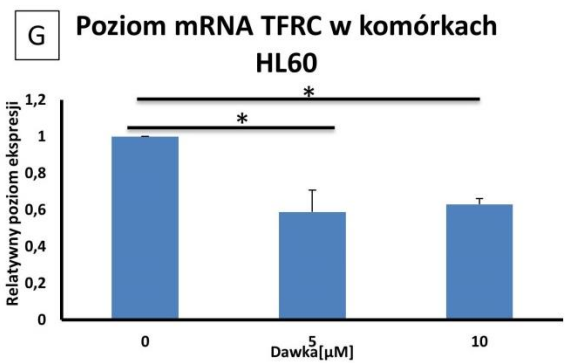
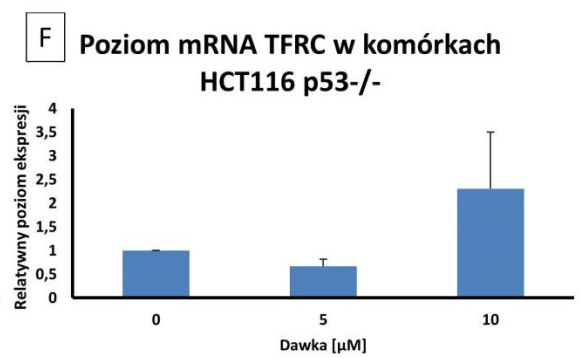
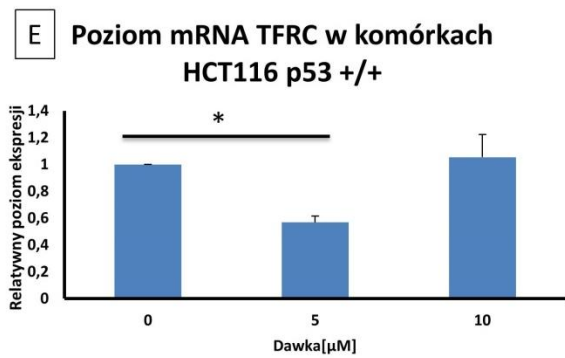
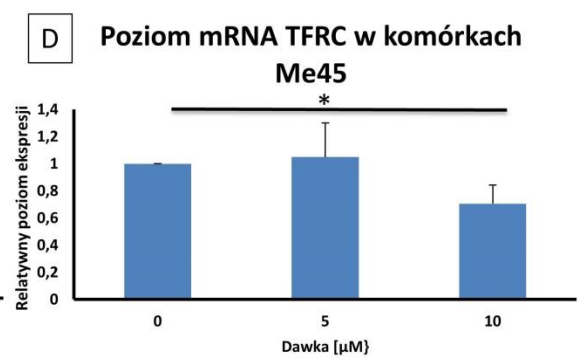
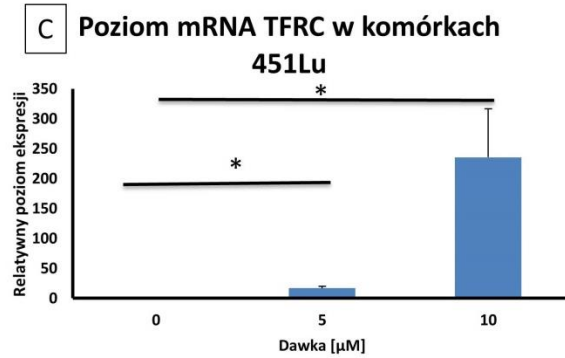
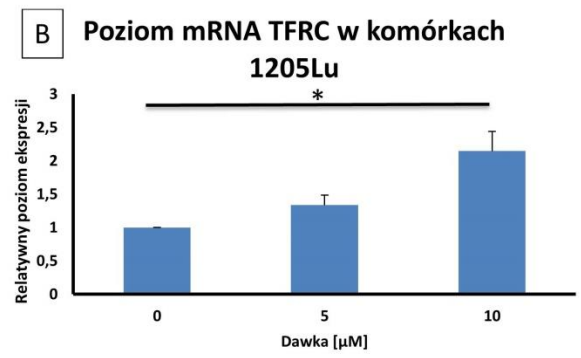
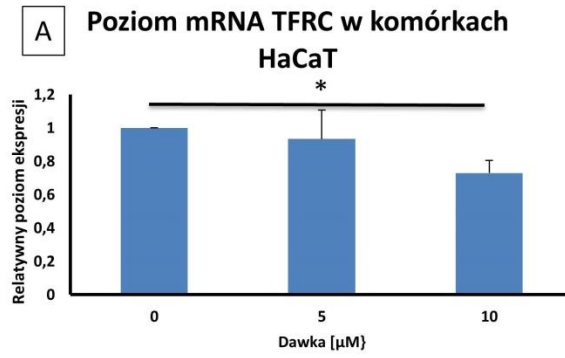
#### 4.5.1 Ferroptotyczny szlak peroksydacji lipidów

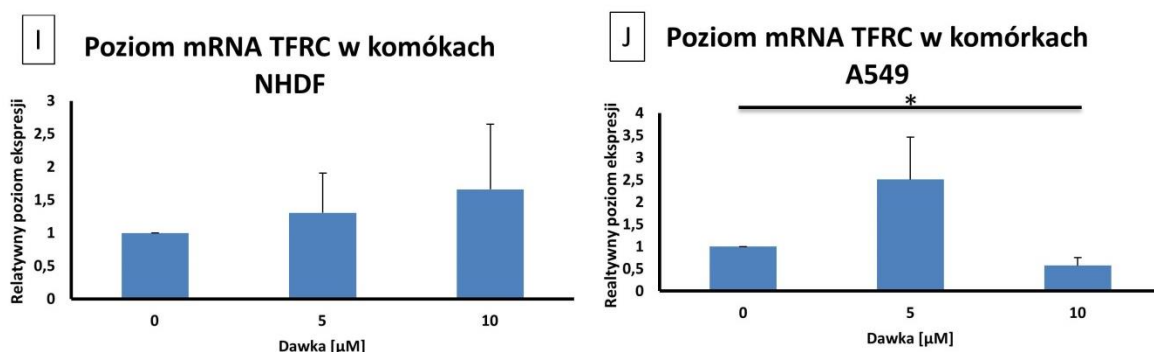


**Rysunek 11** Schemat ferroptotycznego szlaku peroksydacji lipidów. Na podstawie [165,166], utworzono za pomocą BioRender.com

##### 4.5.1.1 TFRC

Białko receptora transferyny (TFRC) odpowiedzialne jest za transport żelaza ze środowiska pozakomórkowego do wnętrza komórek za pośrednictwem transferyny. Jego nadekspresja powoduje nagromadzenie jonów katalizujących powstanie RFT, co w konsekwencji może doprowadzić do ferroptozy (Rys. 11).



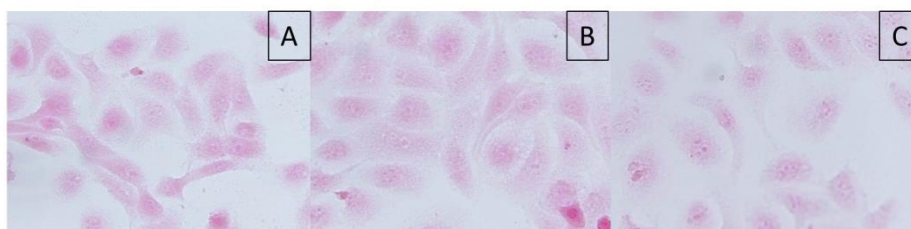


**Rysunek 12** Poziom mRNA *TFRC* w komórkach 24 godziny po dodaniu induktora ferroptozy, erastyny w dwóch dawkach, 5 i 10  $\mu\text{M}$ . Wartości przedstawiono jako średnią  $\pm$  odchylenie standardowe. Istotność statystyczną oznaczono “\*”, przy wartości  $p < 0,05$ .

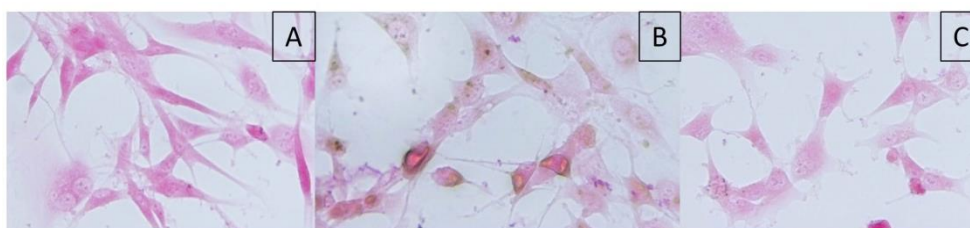
W komórkach prawidłowych skóry, HaCaT, obserwowany był spadek ekspresji *TFRC* podobnie w komórkach nowotworowych Me45 (Rys. 12 A i D), zwłaszcza przy wyższej dawce, co było również istotne statystycznie. W przypadku czerniaka 1205Lu i 451Lu obserwowany był wzrost ekspresji, co korelowało dodatnio z dawką podawanej erastyny (Rys. 12 B i C). W przypadku komórek jelita grubego HCT116 p53+/+ i HCT116 p53-/- obserwowano spadek ekspresji już przy dawce 5  $\mu\text{M}$  oraz wzrost przy dawce 10  $\mu\text{M}$ . Podobny profil ekspresji reprezentowała linia białaczki K562, a w HL60 obserwowano również spadek dla dawki 10  $\mu\text{M}$ . Linia prawidłowych fibroblastów odpowiedziała na indukcję ferroptozy wzrostem ekspresji przy obu dawkach (Rys. 12 I), natomiast linia raka płuc A549 (Rys.12 J) wykazała wzrost tylko przy niższej dawce oraz spadek (istotny statystycznie) dla wyższej dawki. Uzyskane ekspresje dla genu *TRFC* są tkankowo-zależne i charakterystyczne dla testowanych linii.

#### 4.5.1.1.1 Analiza ilości żelaza w komórkach

Sprawdzono również czy poziom żelaza zmienia się w komórkach po indukcji ferroptozy. Poniżej przedstawiono wyniki dla dwóch linii HaCaT oraz 1205Lu.



**Rysunek 13** Barwienie błękitem pruskim żelaza w komórkach HaCaT. Kontrola (A), po dawce erastyny 5  $\mu\text{M}$  (B), po dawce 10  $\mu\text{M}$  (C). Żelazo wybarwione na kolor jasnoniebieski, jądra - czerwony, cytoplazma komórki - różowy.

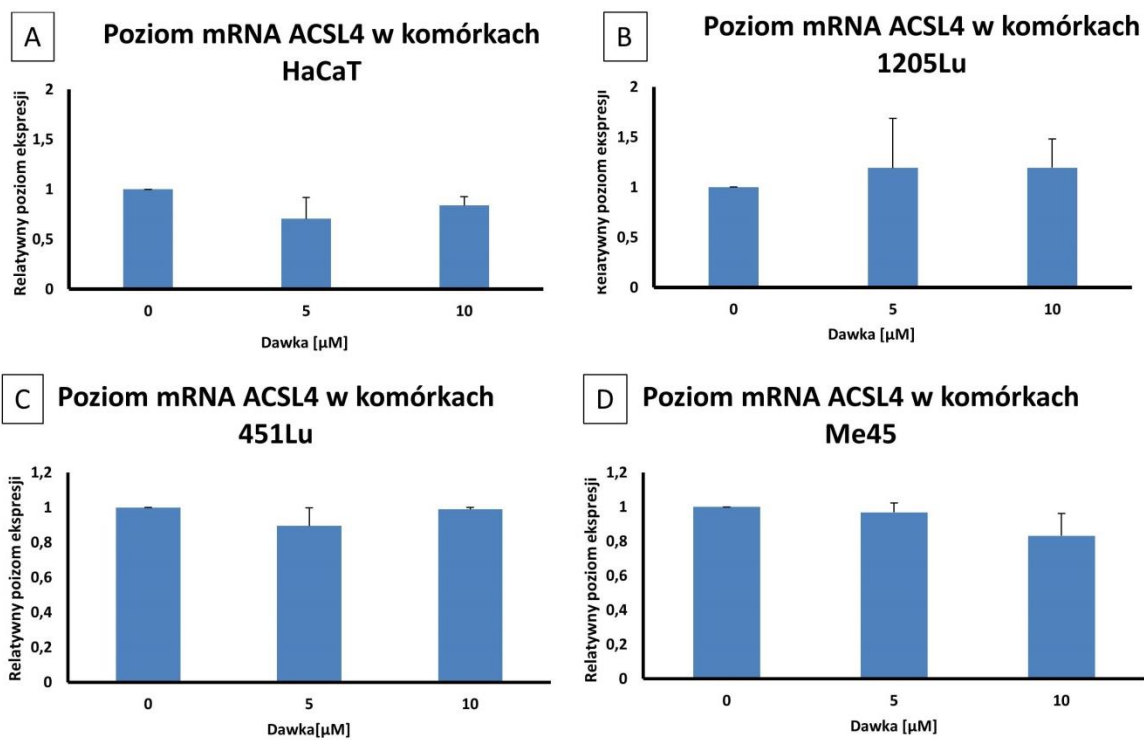


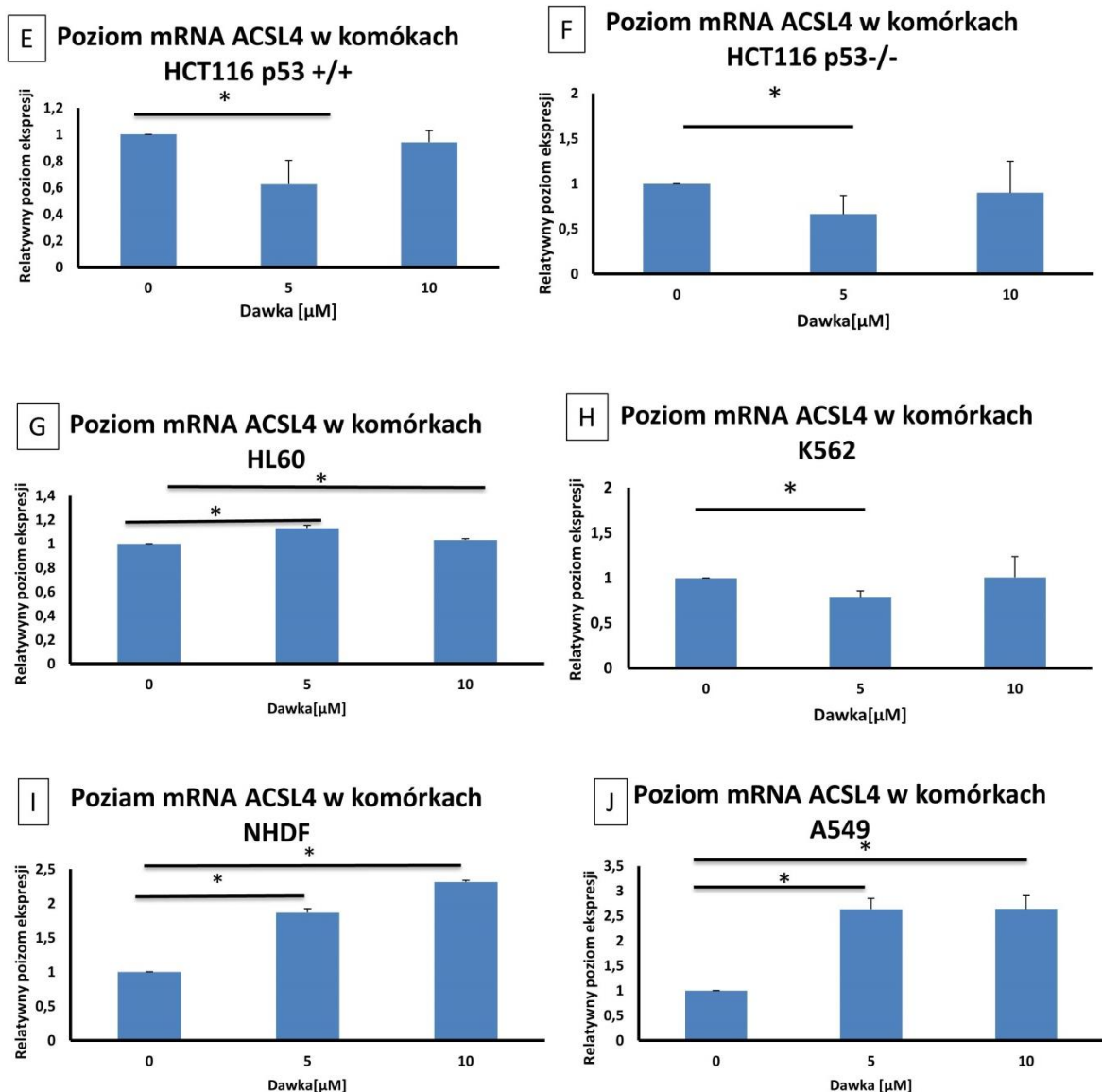
**Rysunek 14** Barwienie błękitem pruskim żelaza w komórkach 1205Lu. Kontrola (A), po dawce erastyny 5  $\mu\text{M}$  (B), po dawce 10  $\mu\text{M}$  (C). Żelazo wybarwione na kolor jasnoniebieski, jądra - czerwony, cytoplazma komórki - różowy.

Błękit pruski jest specyficzny dla żelaza ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Barwienie błękitem pruskim wskazuje na wyższą zawartość żelaza w komórkach nowotworowych (1205Lu), po zastosowaniu induktora w obu dawkach obserwowane są błękitne skupiska w komórkach (wybarwione żelazo). Natomiast skupisk nie obserwowano w komórkach prawidłowych HaCaT. Obserwacje te są spójne z wynikami dla receptora transferyny (TFRC), który odpowiada za transport żelaza do komórek ze środowiska pozakomórkowego za pośrednictwem transferyny. Ekspresja genu kodującego białko TFRC jest kluczowa dla początkowej fazy ferroptozy. W komórkach nowotworowych występuje zwiększona ekspresja tego receptora, przez co w konsekwencji dochodzi do akumulacji żelaza w komórkach. Wyniki uzyskane dla obu linii z reakcji RT-qPCR potwierdzają wzrost ekspresji receptora w komórkach nowotworowych (Rys. 12.B) oraz spadek ekspresji w komórkach prawidłowych (Rys. 12.A). Na podstawie obrazowania kumulacji żelaza w komórkach wynika, że jego poziom w komórkach HaCaT jest bardzo niski (Rys. 13), podczas gdy skupiska żelaza zaobserwowano w komórkach czerniaka, 1205Lu (Rys. 14). Wyniki uzyskane z badania poziomu ekspresji receptora

TFRC, jak i te obserwowane podczas barwienia błękitem pruskim, w przypadku obu linii wykazują dodatnią korelację.

#### 4.5.1.2 ACSL4



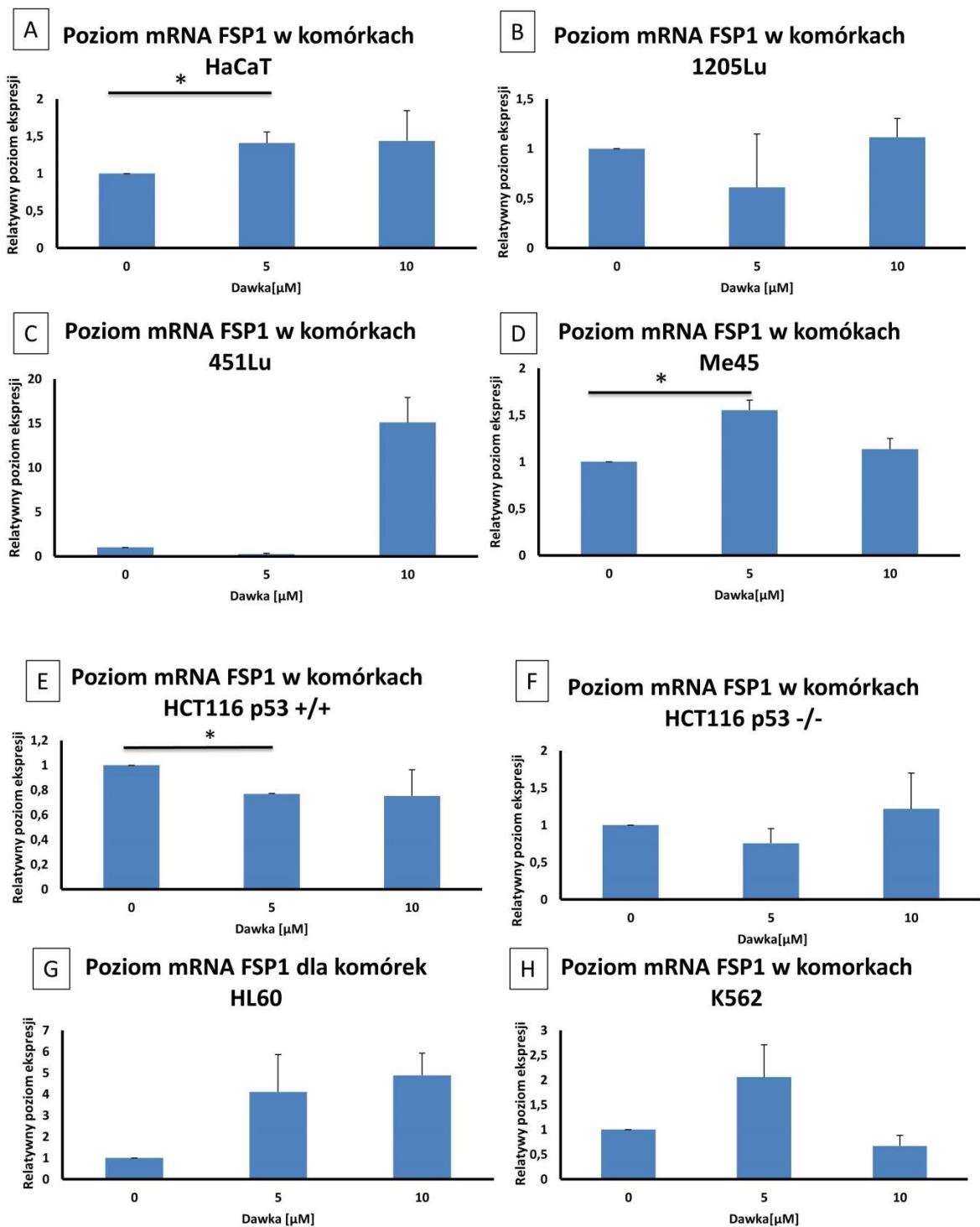


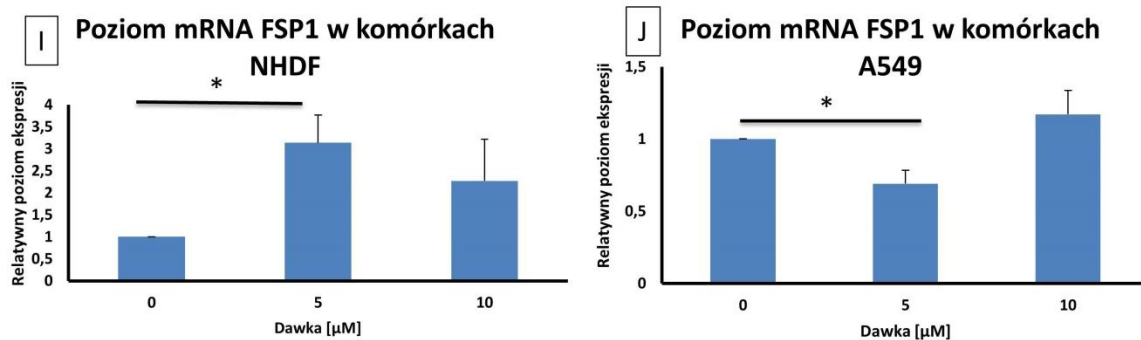
**Rysunek 15** Poziom mRNA *ACSL4* w komórkach 24 godziny po dodaniu induktora ferroptozy, erastyny w dwóch dawkach, 5 i 10  $\mu\text{M}$ . Wartości przedstawiono jako średnią  $\pm$  odchylenie standardowe. Istotność statystyczną oznaczono “\*”, przy wartości  $p < 0,05$ .

Wyższą ekspresję *ACSL4* obserwuje się w komórkach, które wykazują wrażliwość na ferroptozę, natomiast wyciszona ekspresja tego genu występuje w komórkach niewrażliwych na ten rodzaj regulowanej śmierci. W komórkach prawidłowych skóry, HaCaT, obserwowany był spadek ekspresji *ACSL4* podobnie w komórkach nowotworowych 451Lu i Me45 (Rys. 15 A i C, D). W przypadku czerniaka 1205Lu, fibroblastów NHDF, białaczki HL60 i komórek nowotworowych płuc obserwowany był wzrost, co korelowało dodatnio z dawką erastyny (Rys. 15 B, G, I i J). W przypadku komórek raka jelita grubego HCT116 p53+/+ i HCT116 p53-/- obserwowano spadek przy dawce 5  $\mu\text{M}$  oraz poziom

zbliżony kontroli przy dawce 10  $\mu\text{M}$ . Podobny profil ekspresji reprezentowała linia białaczki K562 (Rys. 15 H).

#### 4.5.1.3 FSP1



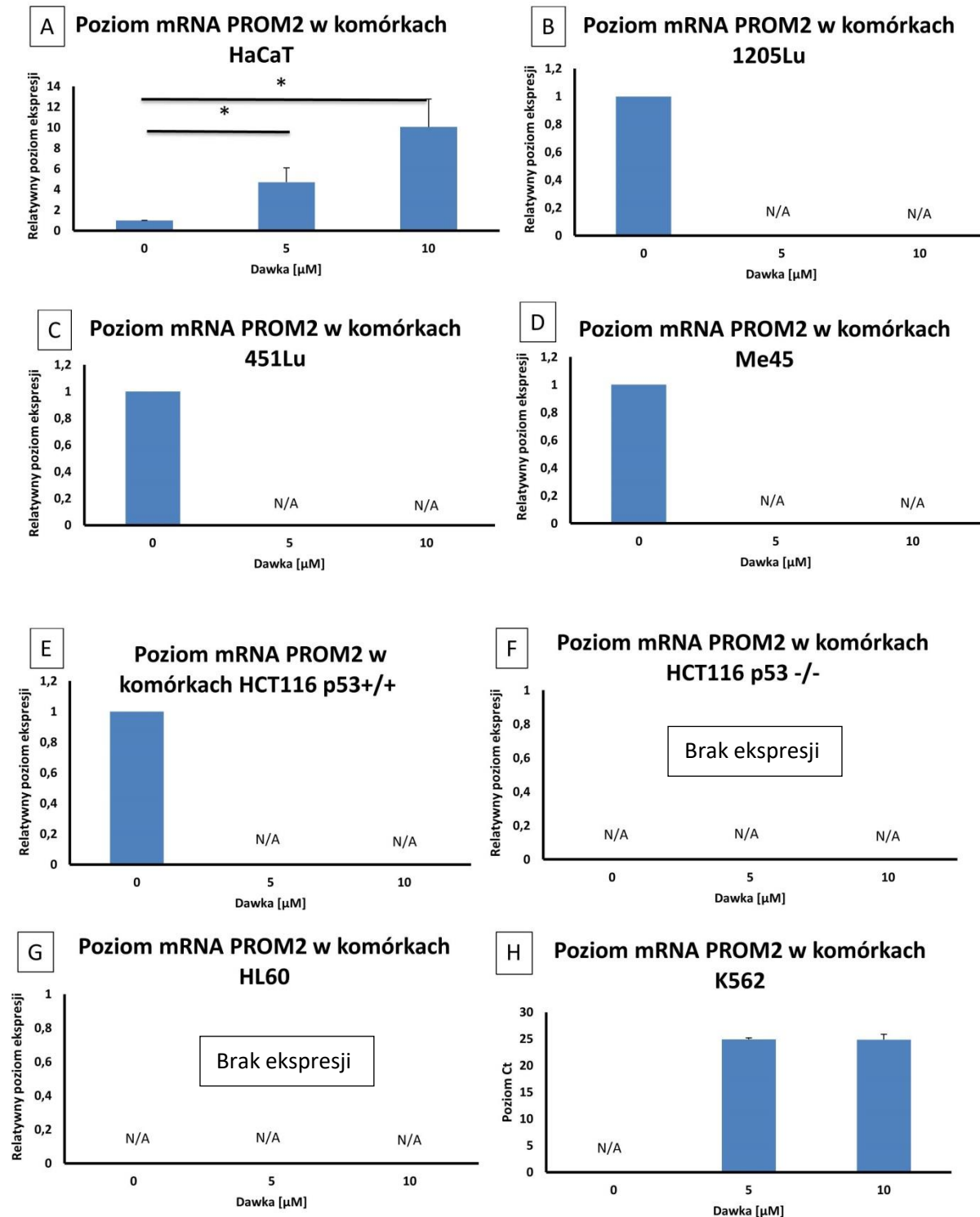


**Rysunek 16** Poziom mRNA *FSP1* w komórkach 24 godziny po dodaniu induktora ferroptozy, erastyny w dwóch dawkach 5 i 10  $\mu\text{M}$ . Wartości przedstawiono jako średnią  $\pm$  odchylenie standardowe. Istotność statystyczną oznaczono “\*”, przy wartości  $p < 0,05$ .

Białko *FSP1* uważane jest za ważny czynnik oporności na ferroptozę, wykazuje zwiększoną ekspresję w komórkach opornych na ten rodzaj śmierci. W komórkach prawidłowych skóry, HaCaT oraz NHDF (Rys. 16 A i I), jak również w komórkach białaczki HL60 i K562 (Rys. 16 G) obserwowany był wzrost ekspresji genu *FSP1* podobnie w komórkach nowotworowych 451Lu i Me45 (Rys. 16 C i D). W przypadku komórek jelita grubego HCT116 p53+/+ obserwowano spadek przy obu dawkach, natomiast dla komórek HCT116 p53-/- przy dawce 5  $\mu\text{M}$  oraz wzrost przy dawce 10  $\mu\text{M}$  (Rys. 16 E i F).

#### 4.5.1.4 PROM2





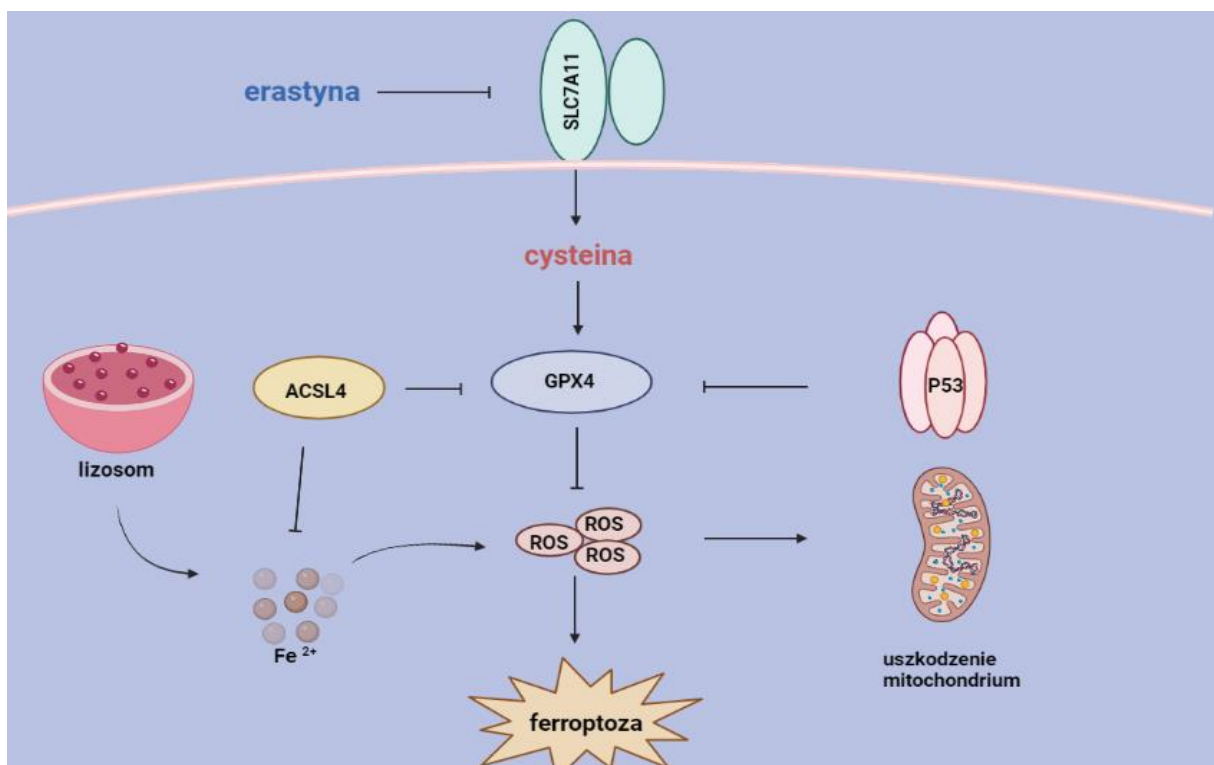
**Rysunek 17** Poziom mRNA *PROM2* w komórkach 24 godziny po dodaniu induktora ferroptozy, erastyny w dwóch dawkach, 5 i 10  $\mu\text{M}$ . Wartości przedstawiono jako średnią  $\pm$  odchylenie standardowe. Istotność statystyczną oznaczono “\*”, przy wartości  $p < 0,05$ .

Ekspresja *PROM2* w komórkach zapobiegła wzrostowi żelaza, jednocześnie chroniąc przed ferroptozą. Jej ekspresję w komórkach uważa się za wyznacznik

oporności na ferroptozę, ponieważ napędza ona tworzenie się ciałek wielopęcherzykowych zawierających ferrytynę i egzosomów, które transportują żelazo na zewnątrz komórki, hamując tym samym ferroptozę [105]. Komórki nie wykazały ekspresji tego genu, poza dwoma liniami: prawidłowymi komórkami skóry HaCaT (Rys. 17 A) i linią białaczki K562 (Rys. 17 H). Wyniki te potwierdzają wcześniejsze przypuszczenia o oporności tych linii na ferroptotyczną śmierć, głównie związaną z peroksydacją lipidów.

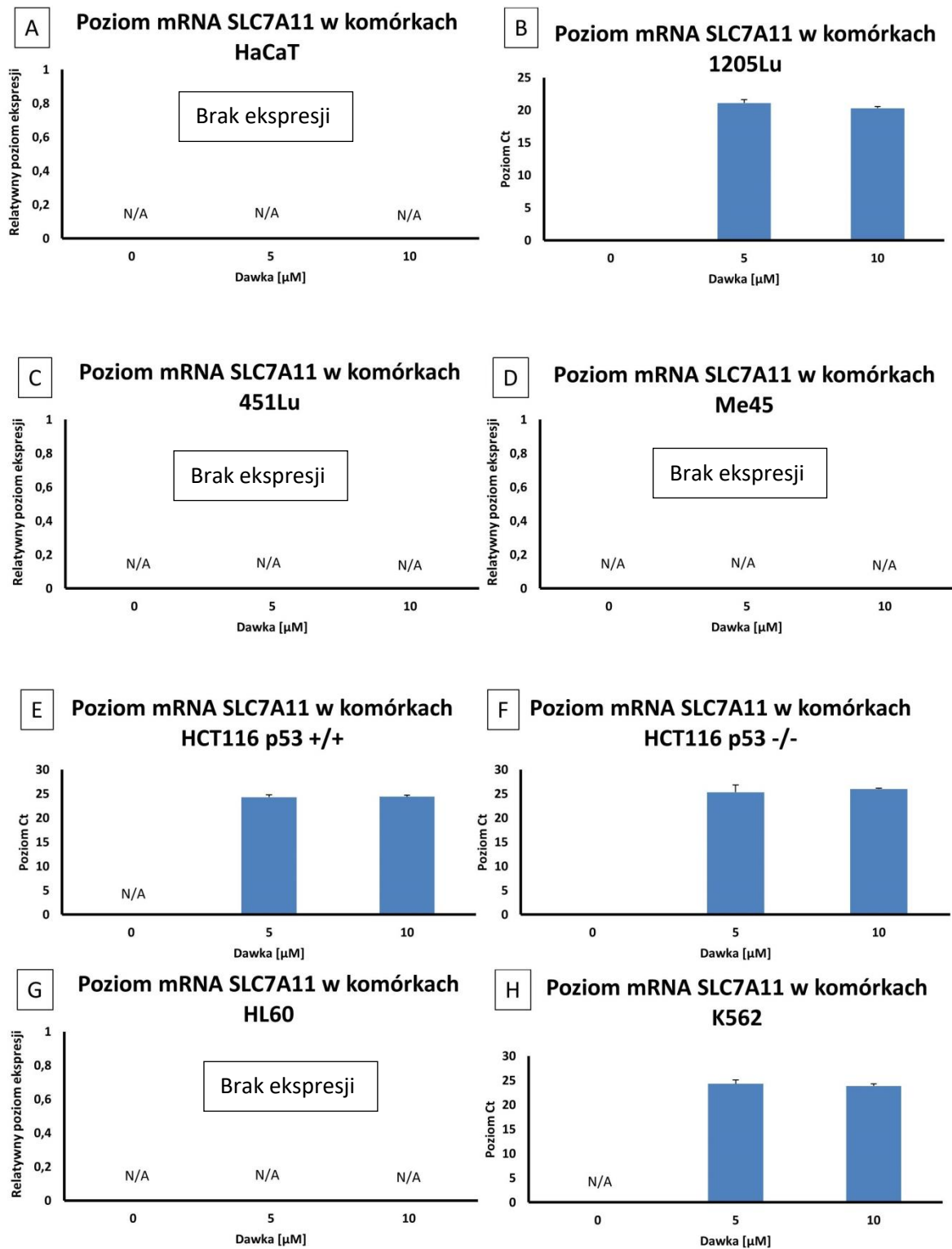
#### 4.5.2 Szlak SLC7A11/GPX4

Szlak SLC7A11/GPX4 jest określany, jako kanoniczna obrona przed ferroptozą ze względu na wspomaganie wewnątrzkomórkowej syntezy glutationu, łagodząc peroksydację lipidów. Hamowanie SLC7A11 powoduje wyczerpanie GSH, a to prowadzi do obniżenia poziomu GPX4, prowadząc do uszkodzenia błony komórkowej/subkomórkowej spowodowanej nagromadzeniem zależnych od żelaza nadtlenków lipidów [170].



**Rysunek 18** Szlak blokady antyportera cysteinowo/glutaminowego w komórce. Utworzono za pomocą BioRender.com

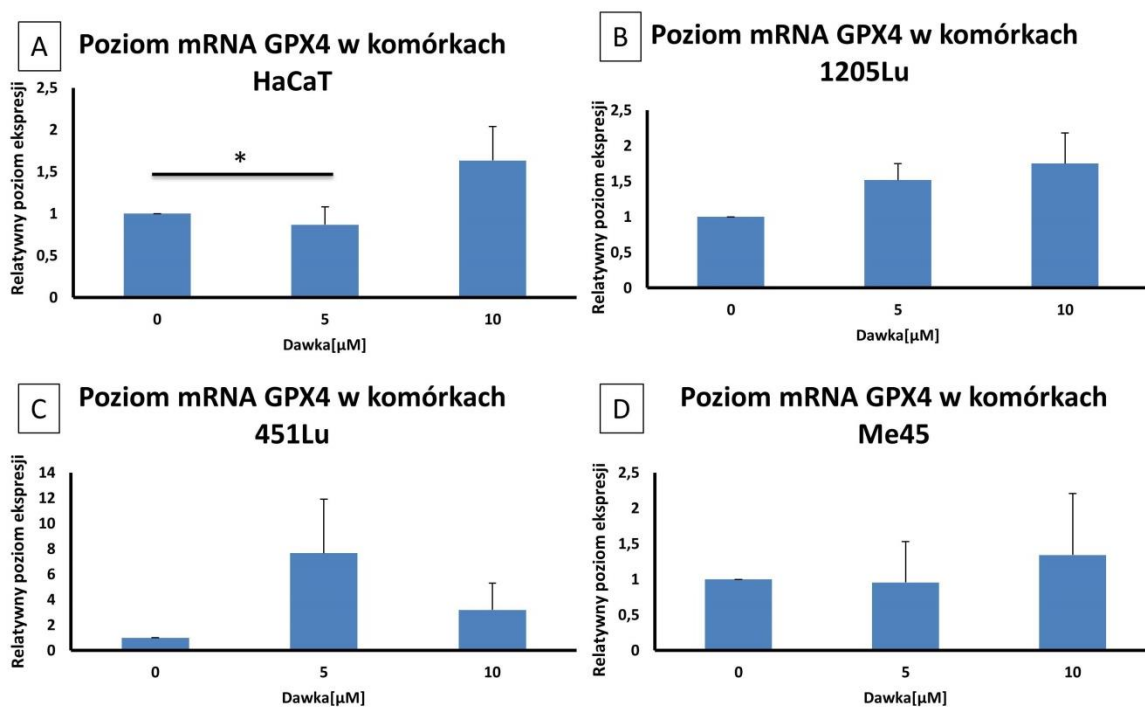
#### 4.5.2.1 SLC7A11

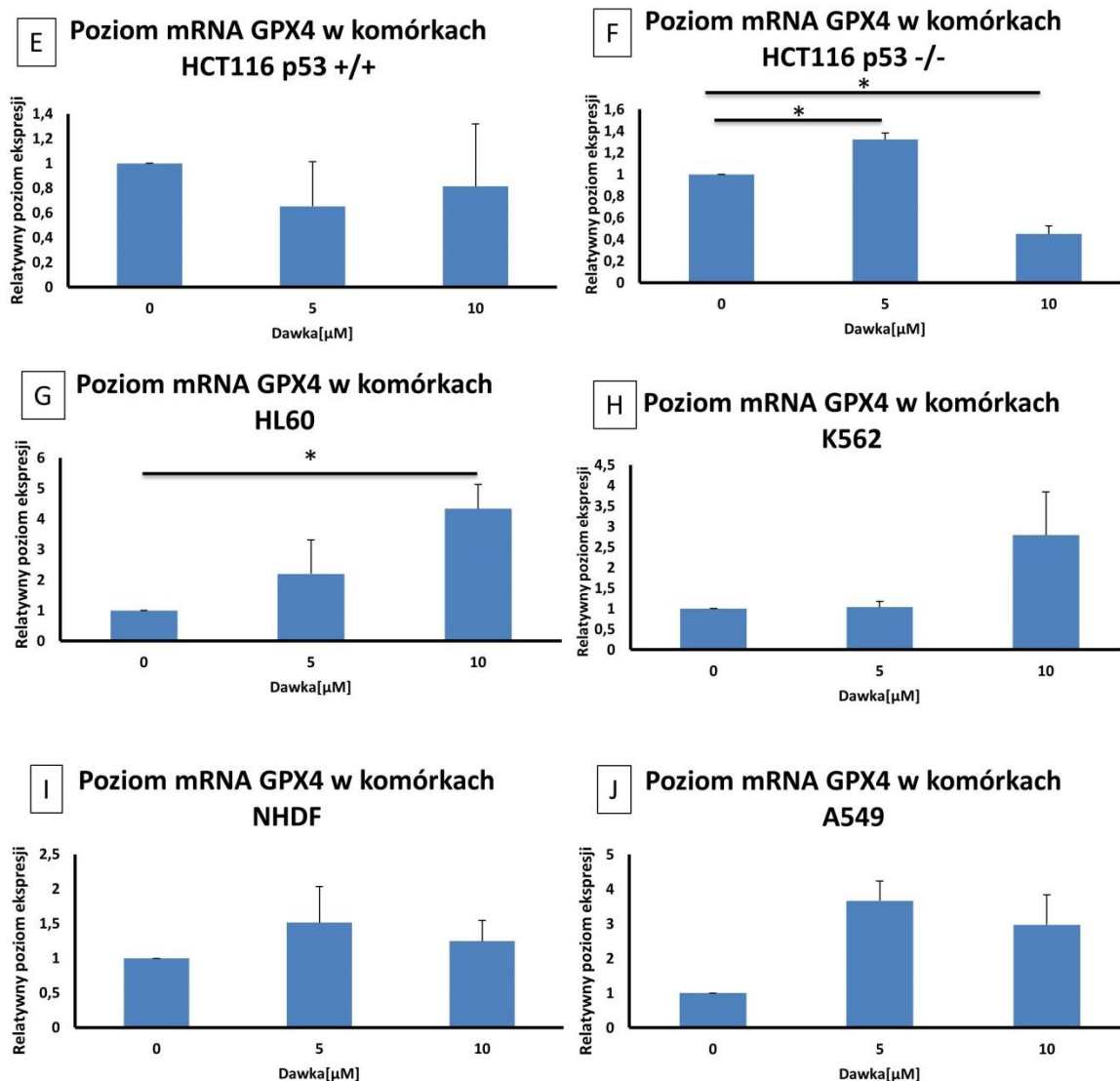


**Rysunek 19** Poziom mRNA *SLC7A11* w komórkach 24 godziny po dodaniu induktora ferroptozy, erastyny w dwóch dawkach, 5 i 10  $\mu$ M. Wartości przedstawiono jako średnią  $\pm$  odchylenie standardowe. Istotność statystyczną oznaczono “\*”, przy wartości  $p < 0,05$ .

Cysteina jest proteinogennym aminokwasem, pełniącym wszechstronną rolę w syntezie białek, modyfikacji potranslacyjnych i utrzymaniu stanu redoks. Służy, jako prekursor ograniczający szybkość tworzenia glutationu, tripeptydu składającego się z trzech aminokwasów – cysteiny, glutaminianu i glicyny najobficiej występującego przeciwutleniacza komórkowego. Zewnątrzkomórkowa cystyna jest importowana do komórki przez SLC7A11, białka błonowego antyportera cysteino/glutaminowego, a następnie przekształcana w cysteinę w reakcji redukcji zużywającej NADPH. Następnie cysteina jest wykorzystywana do syntezy GSH w dwuetapowym procesie. Gen kodujący białko antyportera cysteino/glutaminowego jest na ogół mało ekspresjonowany w komórkach [170,171]. Brak ekspresji lub obniżenie prowadzi do zmniejszenia wychwytu cystyny i zwiększenia wrażliwości na ferrotozę, odwrotnie, regulacja w górę ekspresji *SLC7A11* prowadzi do oporności na ferrotozę [172]. Traktowanie komórek inhibitorem tego antyportera spowodowało w części badanych linii komórkowych wzrost ekspresji genu *SLC7A11* (Rys. 19).

#### 4.5.2.2 GPX4



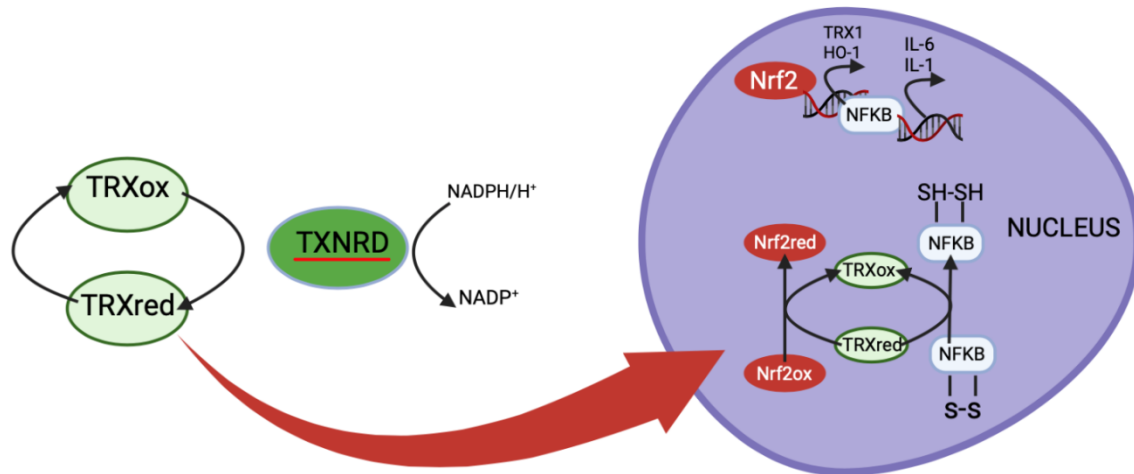


**Rysunek 20** Poziom mRNA *GPX4* w komórkach 24 godziny po dodaniu induktora ferroptozy, erastyny w dwóch dawkach, 5 i 10 μM. Wartości przedstawiono jako średnią ± odchylenie standardowe. Istotność statystyczną oznaczono “\*”, przy wartości  $p < 0,05$ .

Białko kodowane przez gen *GPX4* należy do rodziny peroksydaz glutationowych, których członkowie katalizują reakcję redukcji nadtlenu wodoru, wodoronadtlenków organicznych i wodoronadtlenków lipidów, przez co chronią komórki przed uszkodzeniami oksydacyjnymi. *GPX4* był uważany za marker ferroptozy; wiadomo, że ferroptoza jest wynikiem niepowodzenia systemu antyoksydacyjnego opartego na glutationie. *GPX4*, który jest transkrypcyjnie regulowany w górę, co prowadzi do hamowania ferroptozy [173]. Blokada antyportera przez erastynę, w wyniku czego nastąpiło zubożenie komórki w cysteinę spowodowała wzrost ekspresji tego genu we wszystkich badanych

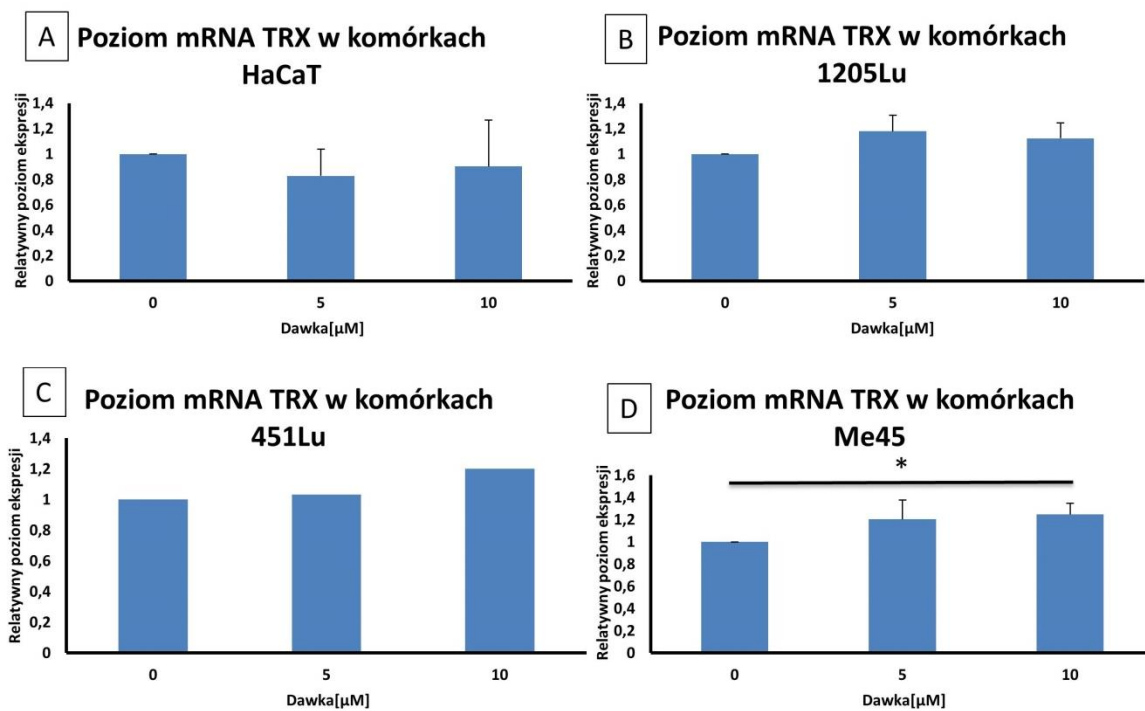
liniach (Rys. 20). Natomiast przy dawce 5  $\mu\text{M}$  obserwowano spadek ekspresji genu w komórkach keratynocytów (Rys. 20 A).

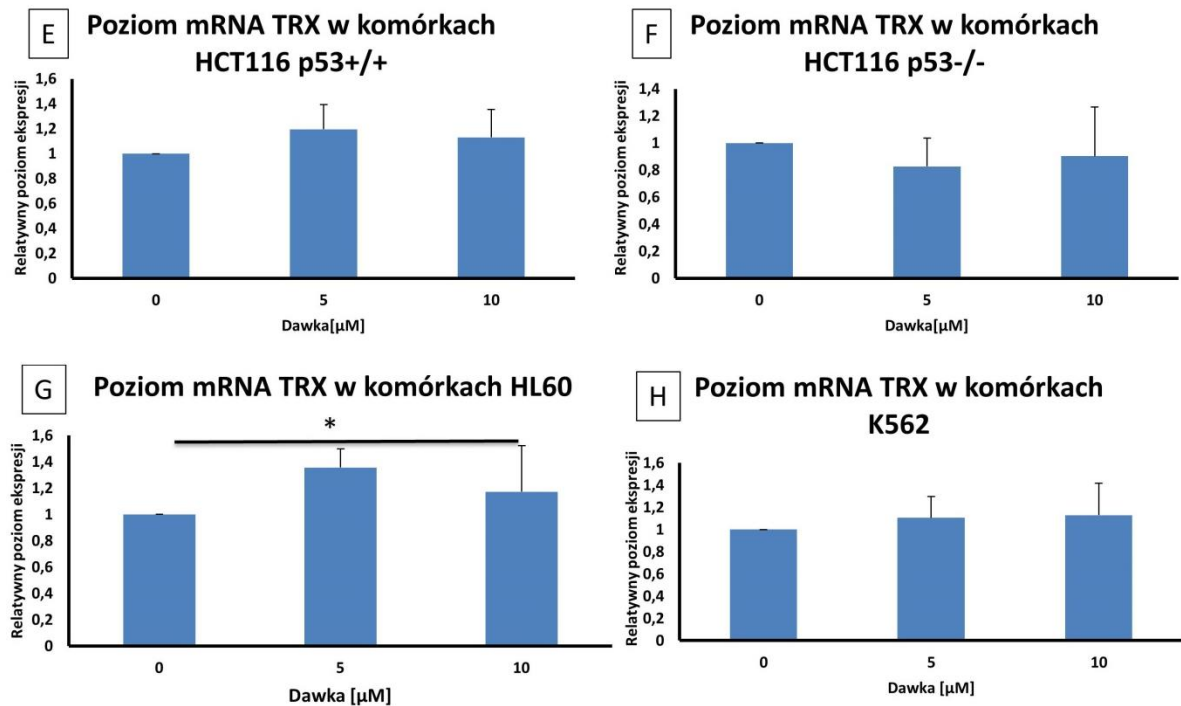
### 4.5.3 Czynniki jądrowe



Rysunek 21 Szlak tarczy tioredoskynowej w komórce.

#### 4.5.3.1 TRX

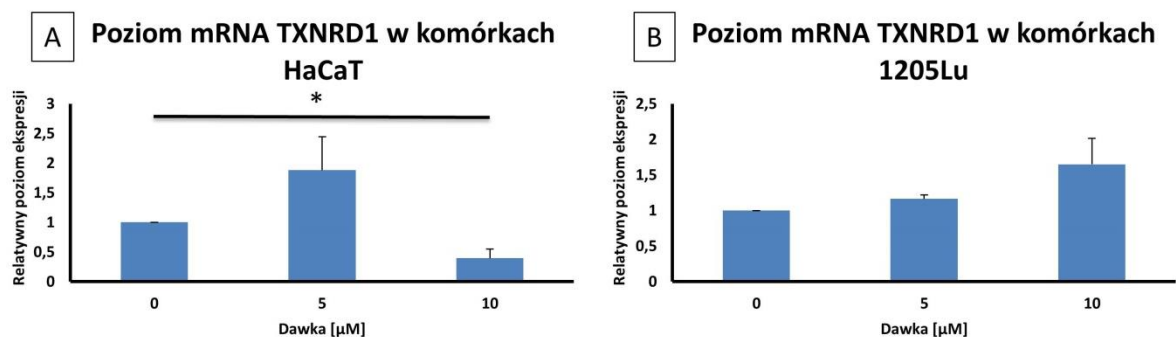




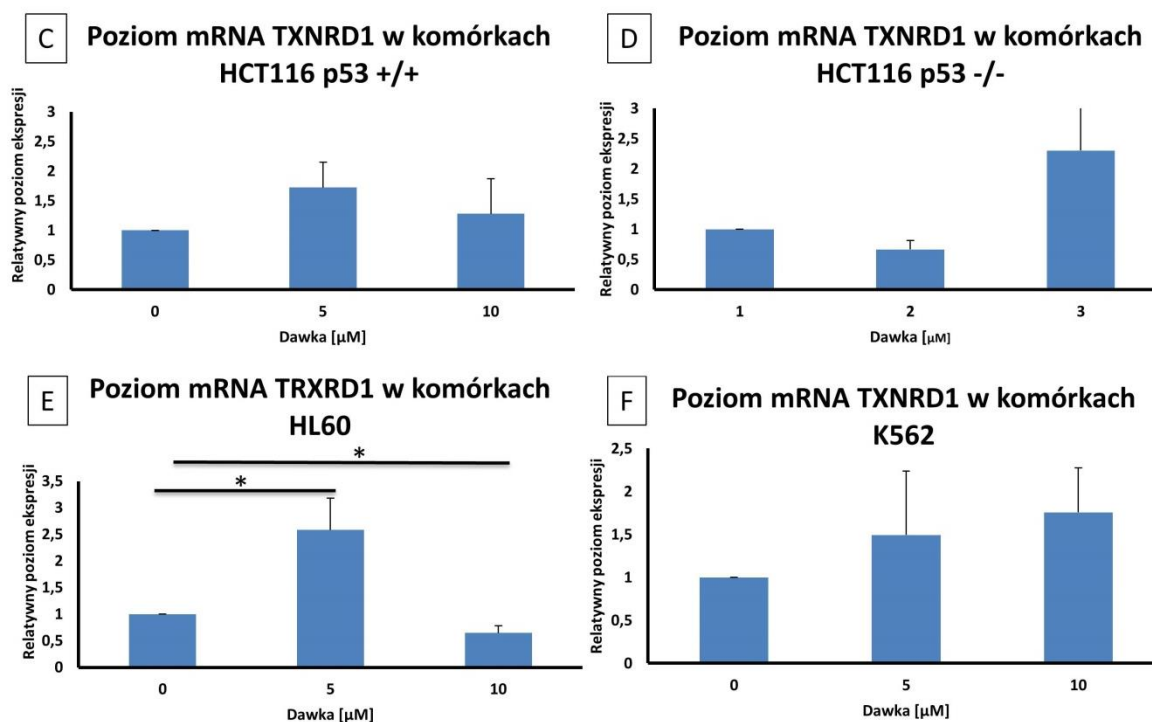
**Rysunek 22** Poziom mRNA *TRX* w komórkach 24 godziny po dodaniu induktora ferroptozy, erastyny w dwóch dawkach, 5 i 10  $\mu\text{M}$ . Wartości przedstawiono jako średnią  $\pm$  odchylenie standardowe. Istotność statystyczną oznaczono “\*”, przy wartości  $p < 0,05$ .

TRX jest kluczowym białkiem, który łączy metabolizm redoks i funkcję białek związanych z żelazem. Wszystkie linie wykazały wzrost ekspresji tego genu po indukcji erastyną, a wzrost ten dodatkowo korelował z dawką (Rys. 22). Zaobserwowano spadek ekspresji w dawce 5  $\mu\text{M}$  dla komórek HaCaT oraz HCT116 p53-/- (Rys. 22 A i F).

#### 4.5.3.2 TRXrd





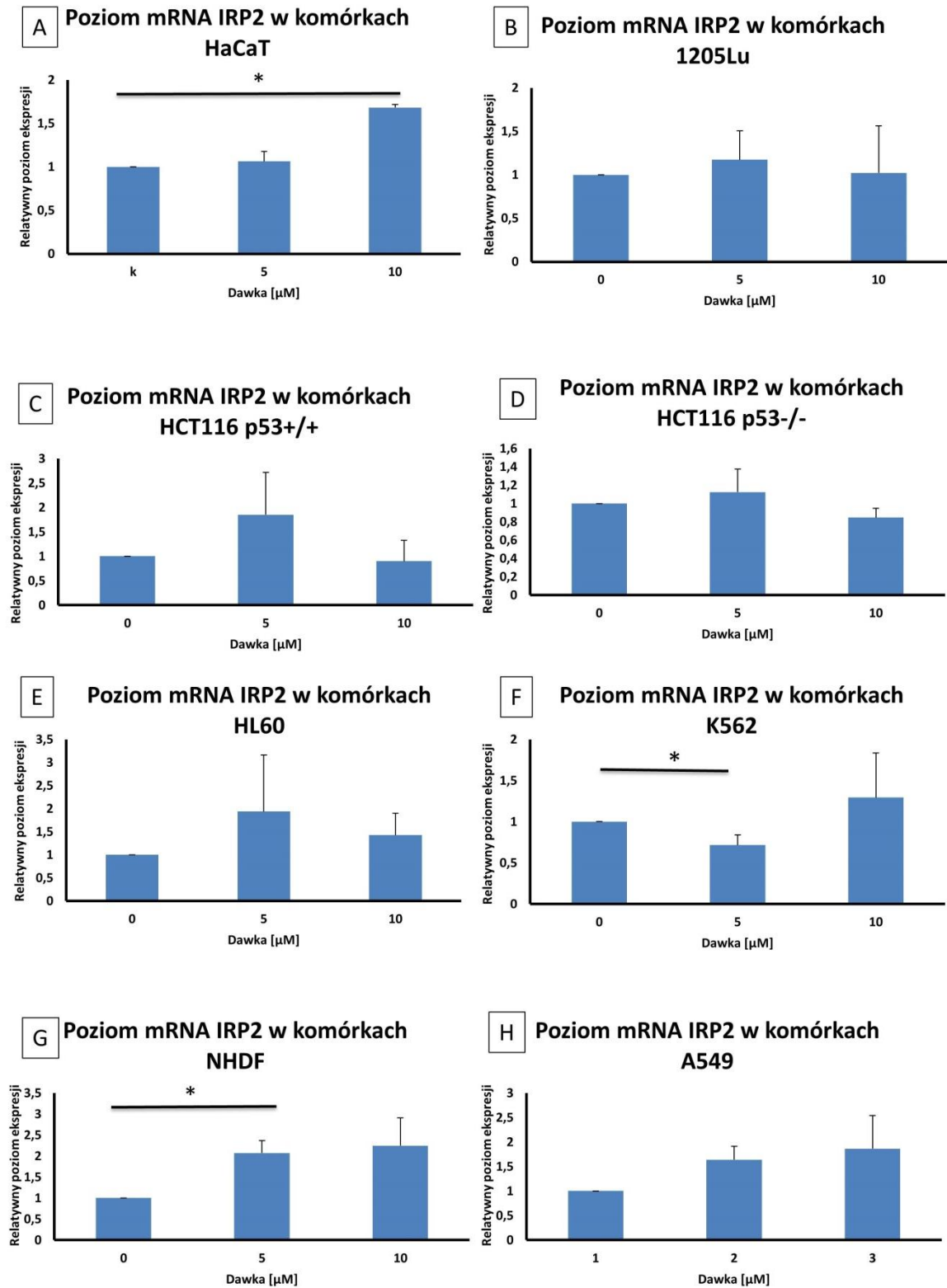


**Rysunek 23** Poziom mRNA *TRXrd* w komórkach 24 godziny po dodaniu induktora ferroptozy, erastyny w dwóch dawkach, 5 i 10  $\mu\text{M}$ . Wartości przedstawiono jako średnią  $\pm$  odchylenie standardowe. Istotność statystyczną oznaczono “\*”, przy wartości  $p < 0,05$ .

TXRrd przyczynia się do zmniejszonej wrażliwości komórek na induktor ferroptozy, erastynę. Jest również niezbędny do redukcji utlenionej formy tioredoksyny (Rys. 21); przez co może dalej pełnić funkcję antyoksydanta. Obserwowany był wzrost ekspresji we wszystkich liniach komórkowych przy obydwu dawkach erastyny; z wyjątkiem linii HaCaT i HL60, przy dawce 10  $\mu\text{M}$  (Rys. 23 A i E) oraz HCT116 p53-/- (Rys. 23 D), przy dawce 5  $\mu\text{M}$ , gdzie obserwowano spadek ekspresji. Wzrost ekspresji sugeruje o zapotrzebowaniu komórek na odnowę puli zredukowanej tioredoksyny, która nie zajdzie bez obecności aktywnej reduktazy.

#### 4.5.3.3 IRP2

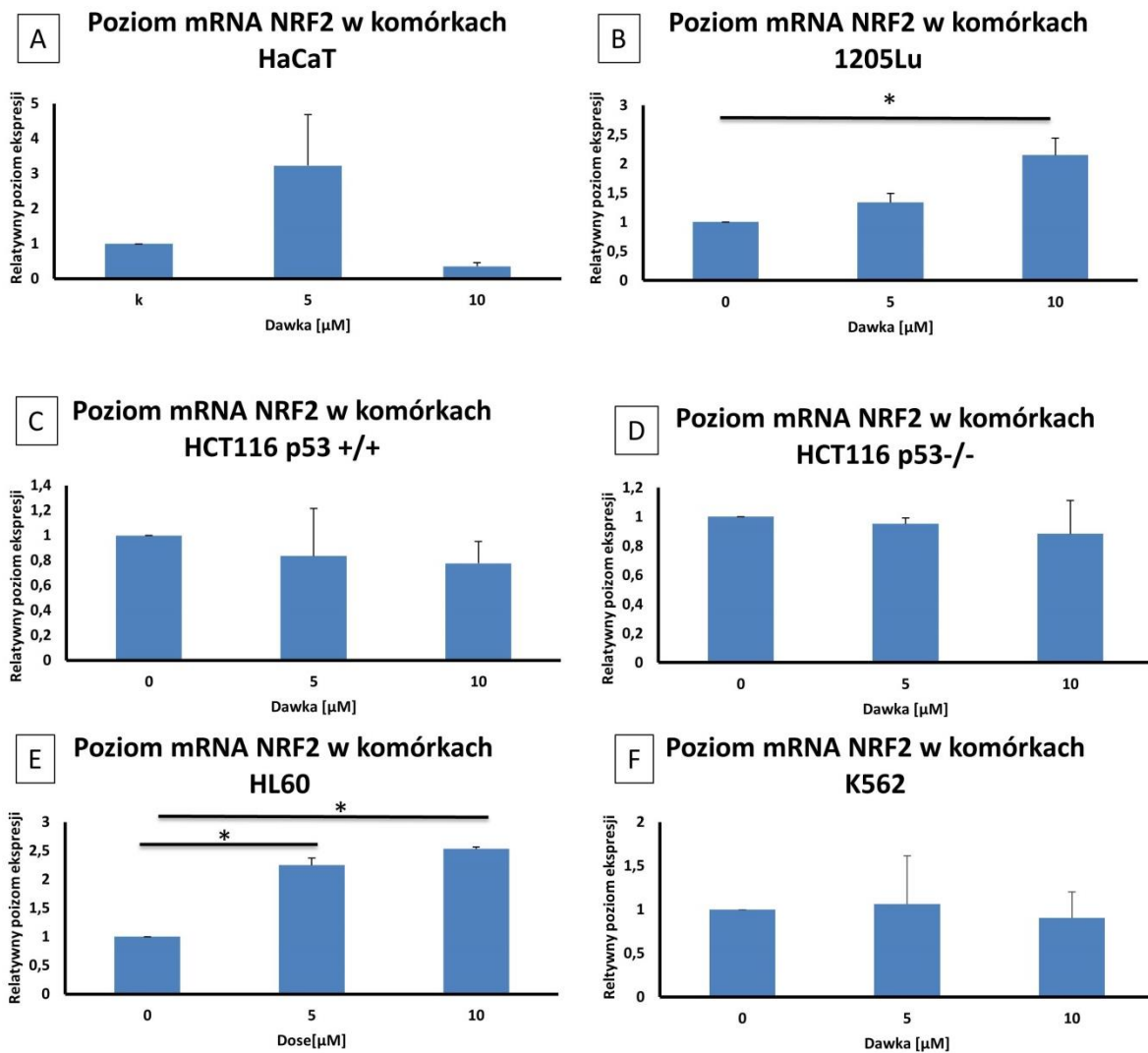


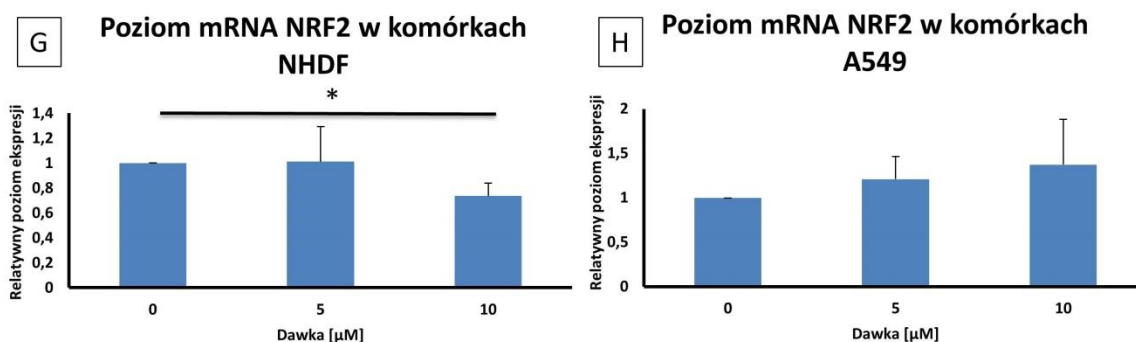


**Rysunek 24** Poziom mRNA *IRP2* w komórkach 24 godziny po dodaniu induktora ferroptozy, erastyny w dwóch dawkach, 5 i 10  $\mu\text{M}$ . Wartości przedstawiono jako średnią  $\pm$  odchylenie standardowe. Istotność statystyczną oznaczono “\*”, przy wartości  $p < 0,05$ .

W złożonych organizmach homeostaza żelaza jest utrzymywana przez białka regulujące poziom żelaza (IRP1 i IRP2) oraz szlak sygnałowy IRE. Wszystkie linie wykazały wzrost ekspresji genu *IRP2* po obu dawkach erastyny (Rys. 24); wyjątek stanowiła linia białaczki K562, gdzie obserwowany był istotnie statystyczny spadek ekspresji genu.

#### 4.5.3.4 NRF2



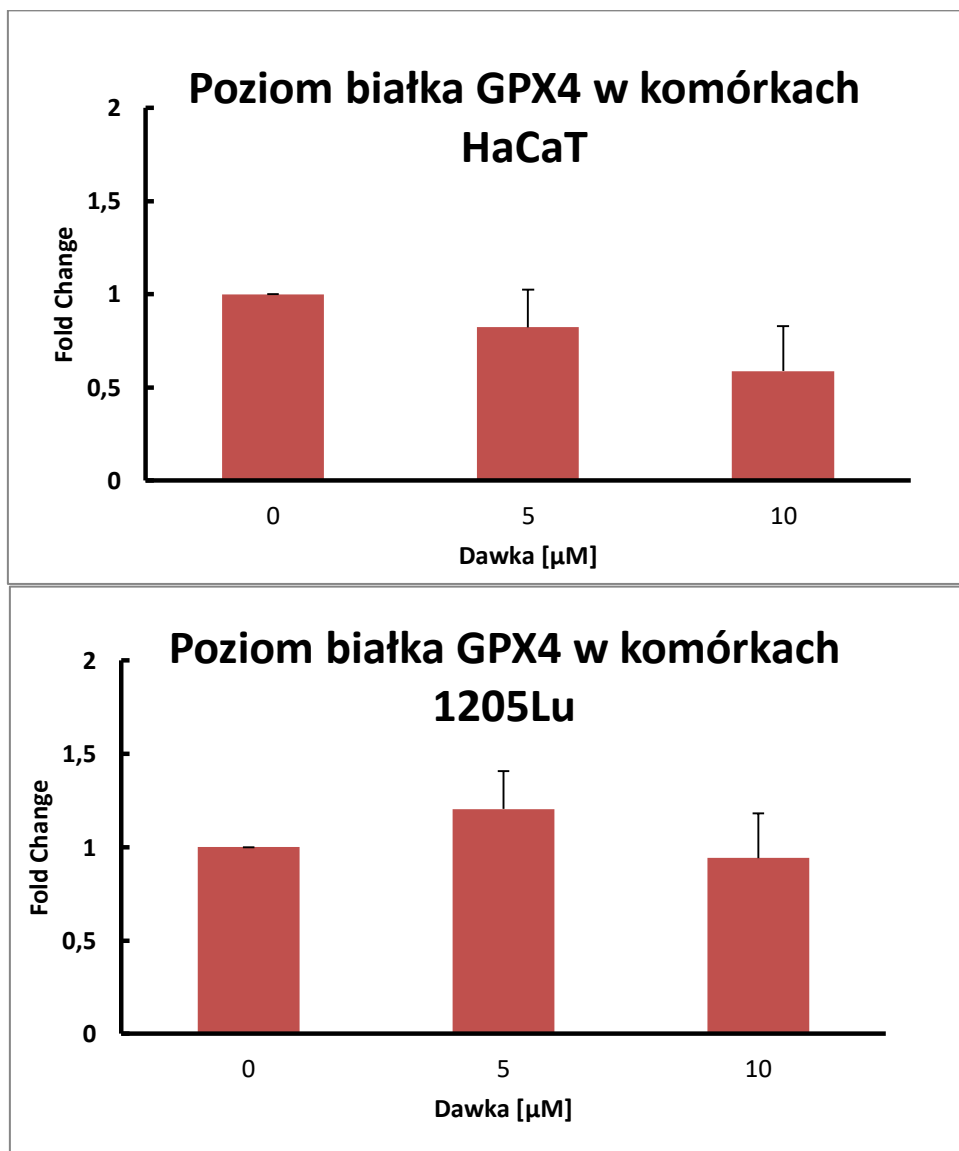


**Rysunek 25** Poziom mRNA *NRF2* w komórkach 24 godziny po dodaniu induktora ferroptozy, erastyny w dwóch dawkach, 5 i 10 μM. Wartości przedstawiono jako średnią ± odchylenie standardowe. Istotność statystyczną oznaczono “\*”, przy wartości  $p < 0,05$ .

Wśród czynników transkrypcyjnych promujących transkrypcję *SLC7A11* jest NRF2, który przede wszystkim pośredniczy w szlakach transkrypcyjnych w odpowiedzi na stres oksydacyjny, regulując odpowiedzi cytoochronne na uszkodzenia [170]. Dodanie erastyny do komórek, spowodowało wzrost ekspresji genu *NRF2* w komórkach 1205Lu, HL60, K562 i A549 (Rys. 25 B, E, F i H) w obu dawkach erastyny oraz wzrost przy dawce 5 μM w liniach HaCaT i NHDF (Rys. 25 A i G), a także spadek w obu dawkach dla komórek raka jelita grubego HCT116 p53+/+ i HCT116p53 -/- (Rys. 25).

#### 4.6 Ekspresja ferropototycznych białek śmierci

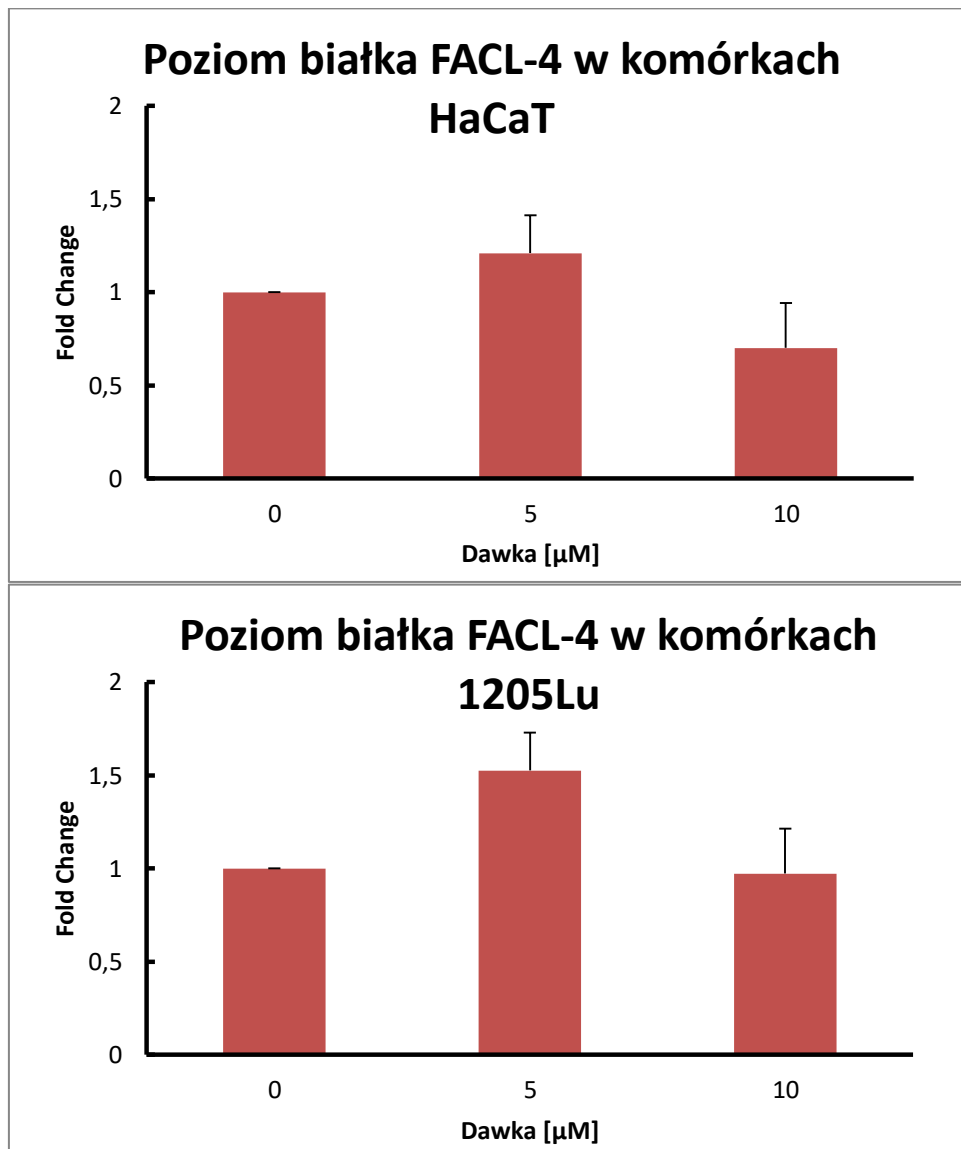
#### 4.6.1 GPX4



**Rysunek 26** Poziom białka GPX4 w komórkach 24 godziny po dodaniu induktora ferroptozy, erastyny w dwóch dawkach, 5 i 10 µM. Wartości przedstawiono jako średnią ± odchylenie standardowe. Istotność statystyczną oznaczono “\*\*”, przy wartości  $p < 0,05$ .

Poziom białka GPX4 w komórkach HaCaT spada wraz z dawką podanej erastyny, a wzrasta dla komórek czerniaka 1205Lu. Dla komórek nowotworowych wynik ten koreluje dodatnio z ekspresją genu kodującego to białko, natomiast w komórkach prawidłowych korelacja ta jest ujemna (Rys. 26).

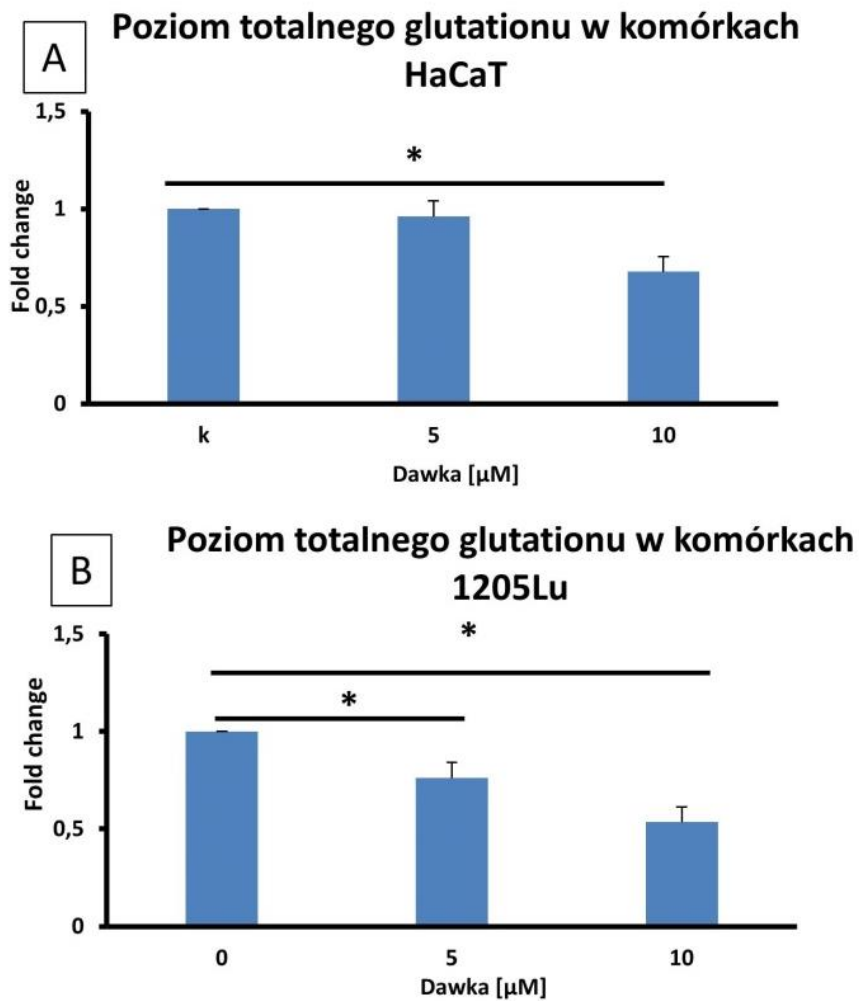
#### 4.6.2 FACL4



**Rysunek 27** Poziom białka FACL4 w komórkach 24 godziny po dodaniu induktora ferroptozy, erastyny w dwóch dawkach, 5 i 10  $\mu\text{M}$ . Wartości przedstawiono jako średnią  $\pm$  odchylenie standardowe. Istotność statystyczną oznaczono “\*”, przy wartości  $p < 0,05$ .

Poziom białka FACL4 w komórkach HaCaT wzrasta przy dawce 5  $\mu\text{M}$  podanej erastyny, a spada przy dawce 10  $\mu\text{M}$ . Wzrost ekspresji białka zaobserwowano w linii komórek czerniaka 1205Lu, w obu dawkach. Dla komórek nowotworowych wynik ten koreluje dodatnio z ekspresją genu kodującego to białko, natomiast w komórkach prawidłowych korelacja jest ujemna (Rys. 27).

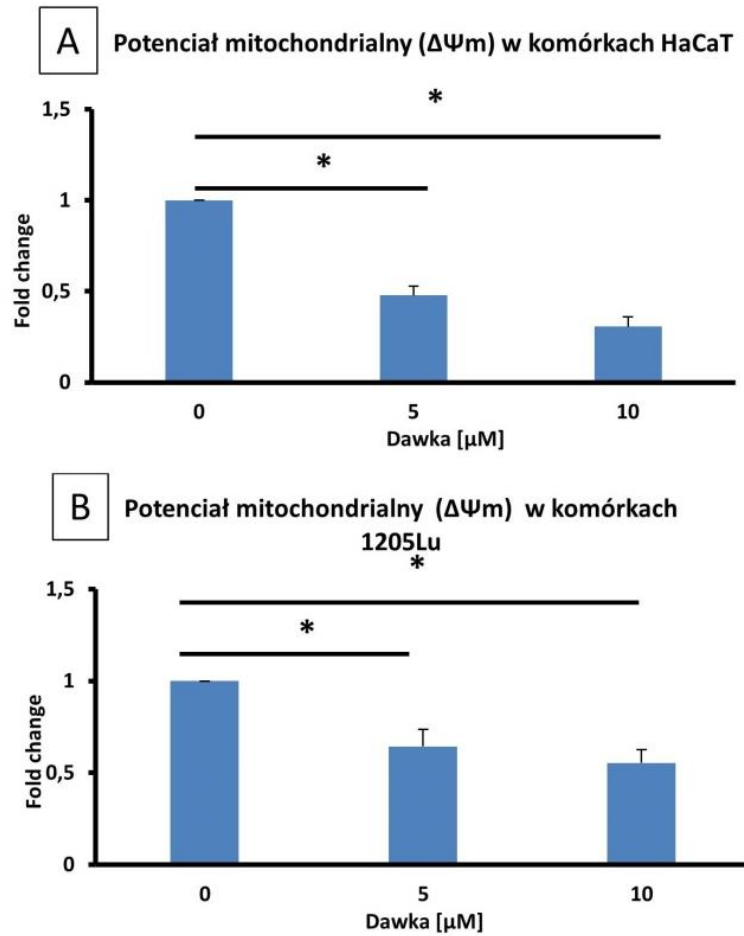
#### 4.7 Poziom totalnego glutationu w komórce (GSH/GSSG)



**Rysunek 28** Poziom totalnego glutationu 24 godziny po dodaniu erastyny w dwóch dawkach, 5 i 10  $\mu\text{M}$ . W komórkach HaCaT (A) i 1205Lu (B). Wartości przedstawiono jako średnią  $\pm$  odchylenie standardowe. Istotność statystyczną oznaczono “\*”, przy wartości  $p < 0,05$ .

Dodanie erastyny do komórek spowodowało spadek poziomu totalnego glutationu (GSH/GSSG) w komórkach przy obu dawkach. Wyniki te są statystycznie istotne i korelują ujemnie z dawką zastosowanej erastyny.

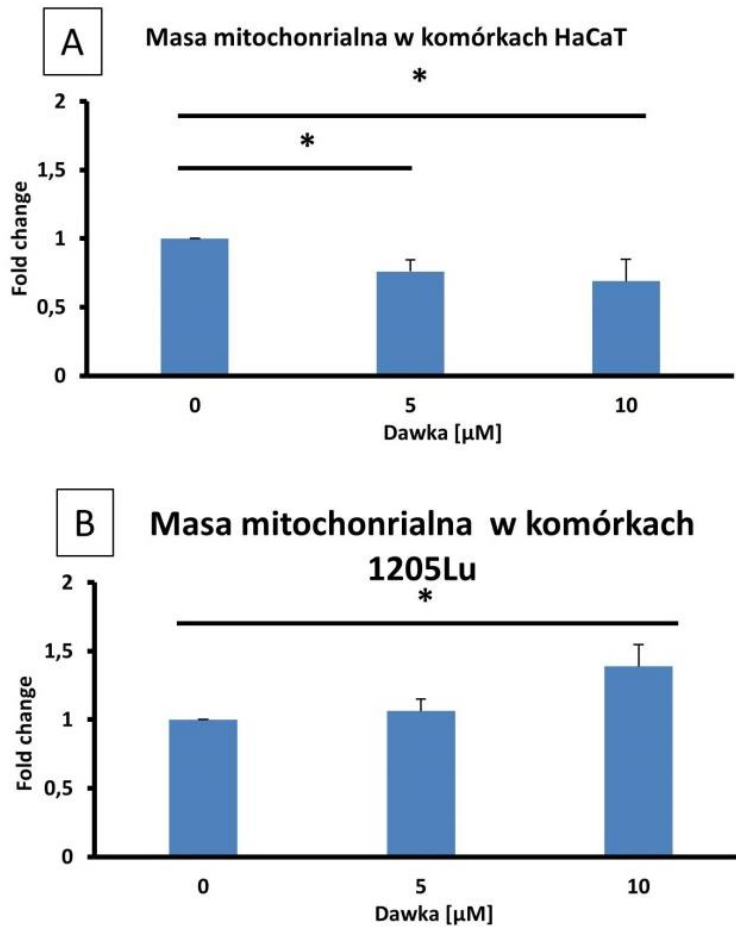
## 4.8 Potencjał mitochondrialny



**Rysunek 29** Poziom potencjału mitochondrialnego, 24 godziny po dodaniu erastyny w dwóch dawkach 5 i 10  $\mu\text{M}$ . W komórkach HaCaT (A) i 1205Lu (B). Wartości przedstawiono jako średnią  $\pm$  odchylenie standardowe. Istotność statystyczną oznaczono “\*”, przy wartości  $p < 0,05$ .

Indukcja ferroptozy, erastyną w obu liniach spowodowała spadek potencjału mitochondrialnego wraz z dawką. Wynik ten silnie koreluje ujemnie. Jest to związane z podaniem erastyny, która wpływa na mitochondria powodując utratę integralności błony mitochondrialnej, a co za tym idzie blokuje też białak błonowe, takie jak NOX2 czy VDAC2/3 [174].

## 4.9 Masa mitochondrialna

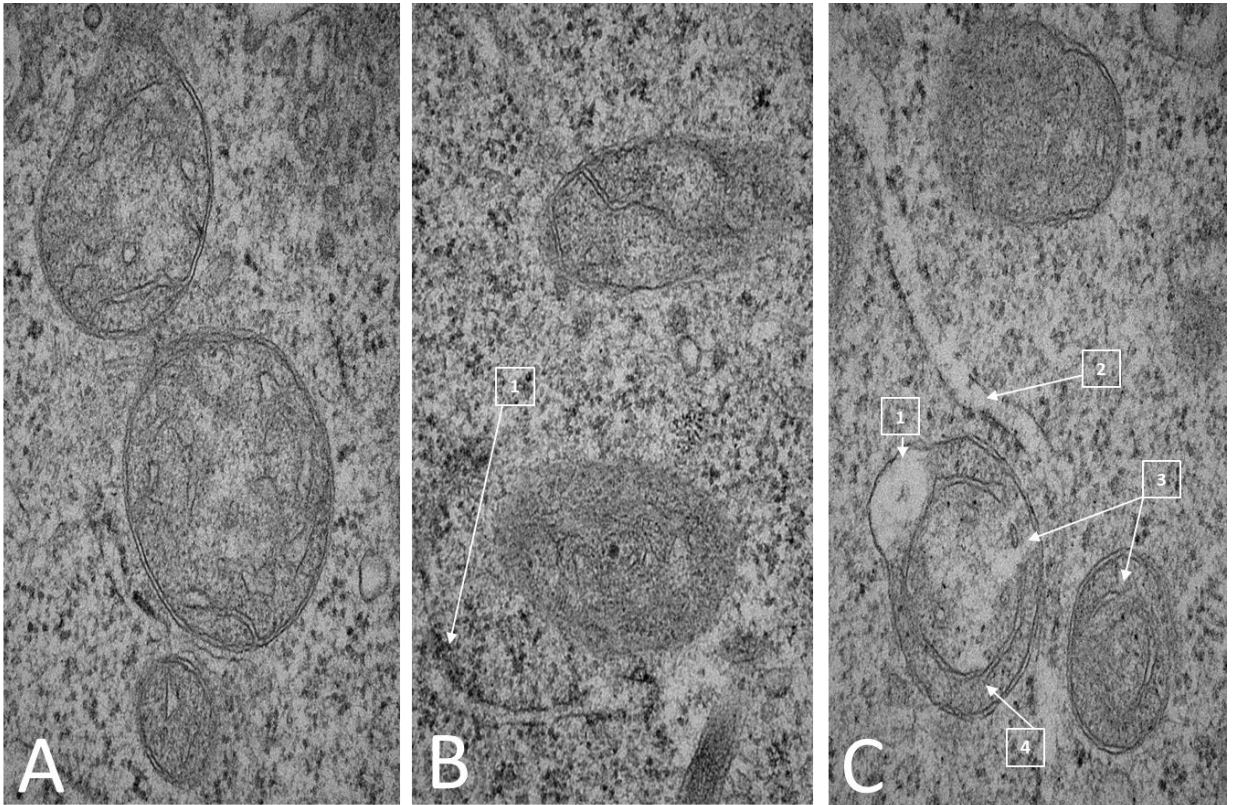


**Rysunek 30** Poziom masy mitochondrialnej, 24 godziny po dodaniu erastyny w dwóch dawkach, 5 i 10  $\mu\text{M}$ . W komórkach HaCaT (A) i 1205Lu (B). Wartości przedstawiono jako średnią  $\pm$  odchylenie standardowe. Istotność statystyczną oznaczono “\*”, przy wartości  $p < 0,05$ .

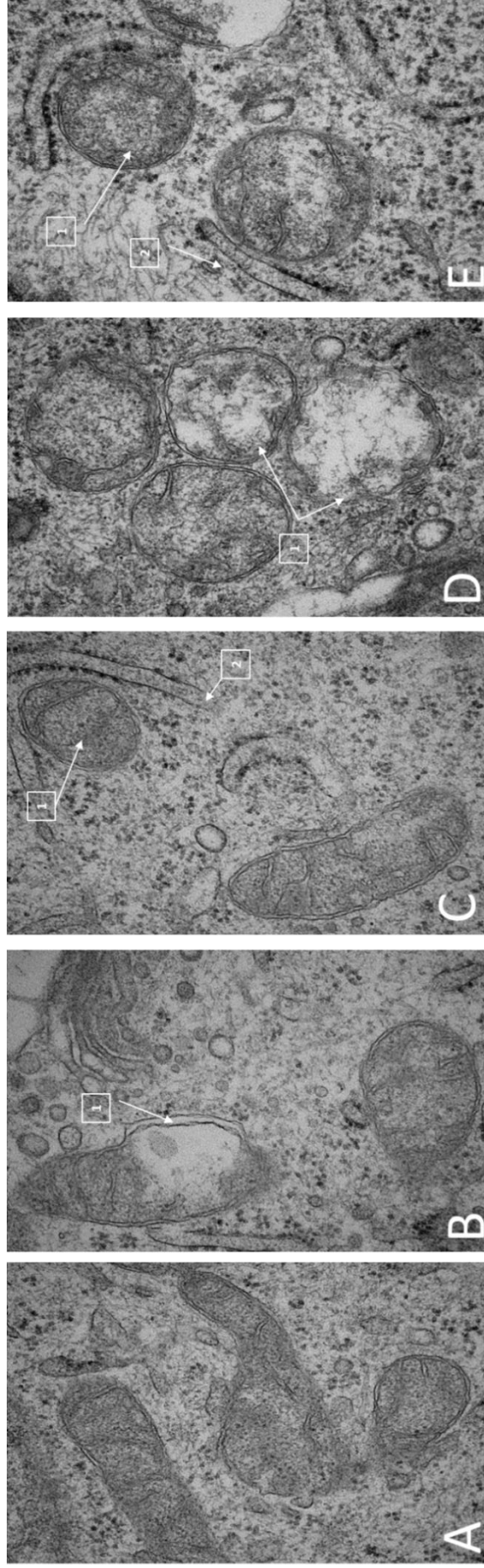
Indukcja ferroptozy, erastyną w komórkach HaCaT spowodowała spadek masy mitochondrialnej wraz z dawką, natomiast w komórkach czerniaka obserwowano wzrost wraz z dawką. Wynik ten silnie koreluje ujemnie dla keratynocytów, natomiast dla czerniaka korelacja jest dodatnia. Wzrost masy mitochondrialnej w czerniaku może być również spowodowany charakterystyką linii 1205Lu, z jej morfologii wynika, że ma ona większe mitochondria (Rys. 32).



#### 4.10 Analiza obrazów mikroskopowych



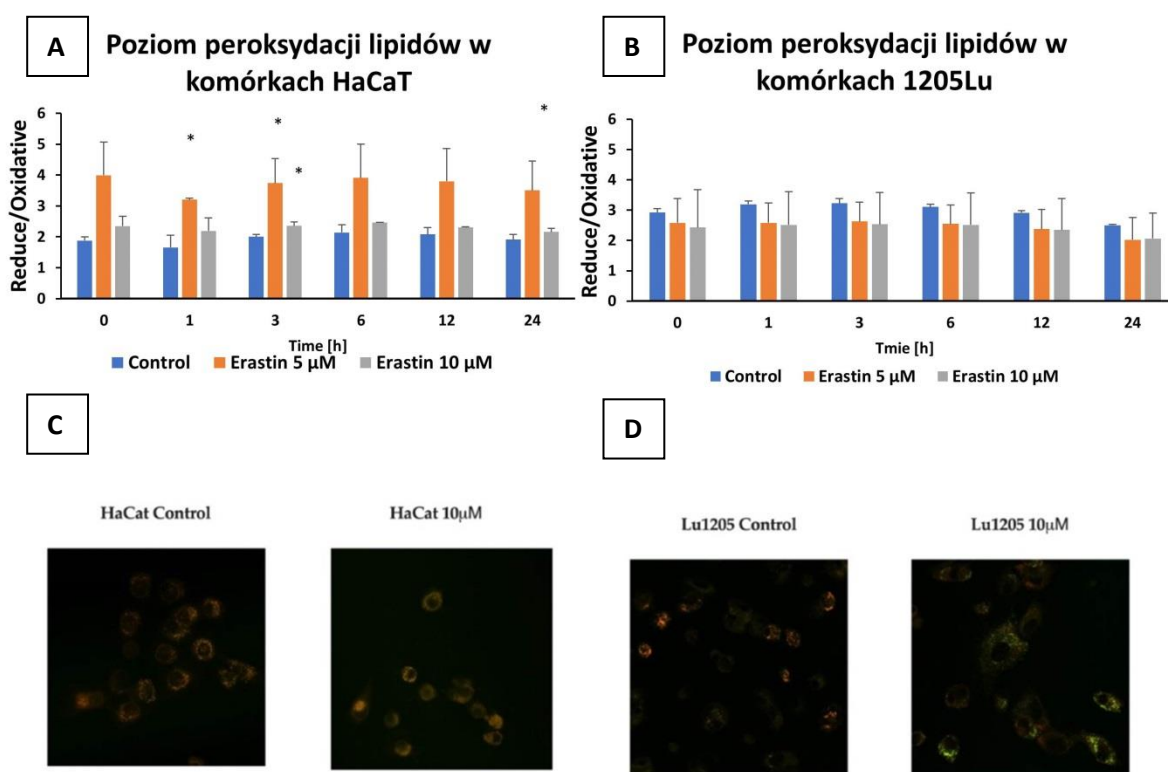
**Rysunek 31** Morfologia TEM i uszkodzenia w komórkach HaCaT 24 godziny po podaniu erastyny. Kontrola (A), 5  $\mu\text{M}$  erastyny (B), 10  $\mu\text{M}$  erastyny (C). Wakuolizacja C.1, degradacja krist C.3 i mitofagia B.1, C.2.



**Rysunek 32** Morfologia TEM i uszkodzenia w 1205Lu 24 godziny po podaniu erastyny. Kontrola (A), 5  $\mu$ M erastyny (B i C), 10  $\mu$ M erastyny (D i E). Wakuolizacja B.1, C.2, D.1, D.2, D.1, degradacja cristae C.1 i mitofagia C.2, E.2.

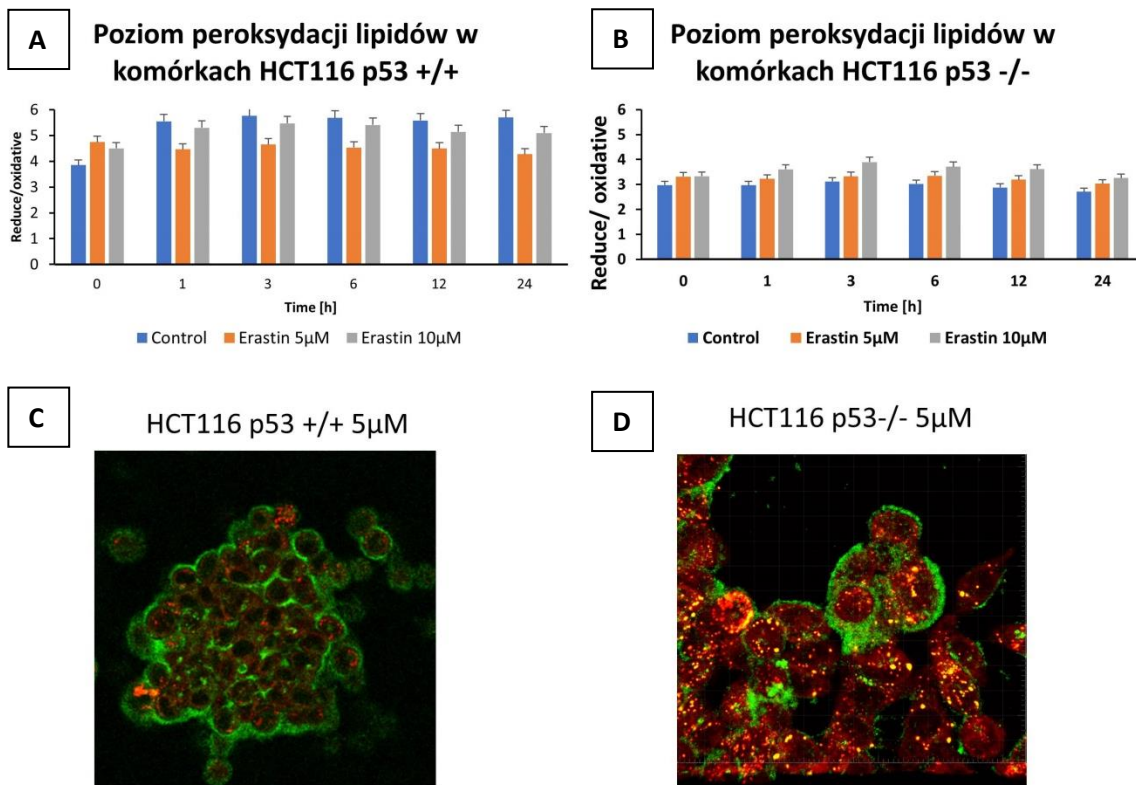
W przypadku komórek prawidłowych HaCaT, przy dawce 10  $\mu\text{M}$  (Rys. 31 C) obserwowano znaczące zmiany w integralności błon mitochondrialnych. Z kolei w przypadku linii nowotworowych zaobserwowano typowe zmiany w morfologii mitochondriów już przy niższej dawce erastyny, 5  $\mu\text{M}$  (Rys. 32 B i C). Uszkodzenia nasiliły się przy zwiększeniu dawki erastyny do 10  $\mu\text{M}$  (Rys. 32 D i E).

#### 4.11 Poziom oksydacji lipidów



**Rysunek 33** Peroksydacja lipidów w komórkach HaCaT (A i C) oraz 1205Lu (B i D) przy dawce 5  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$  erastyny w czasie (A i B), wizualizacja 24 godziny po podaniu (C i D).

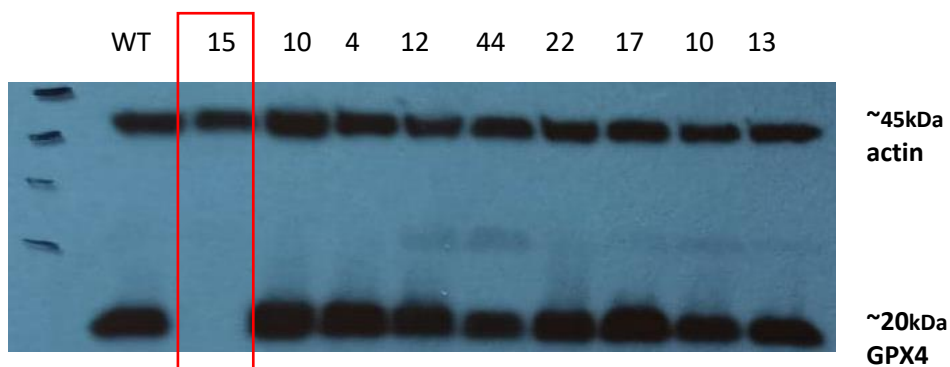
Komórki prawidłowe nie wykazały peroksydacji lipidów po dodaniu induktora. Obserwowano wzrost puli zredukowanych lipidów w komórkach (sygnał czerwony na zdjęciach (Rys. 33). Natomiast w komórkach czerniaka 1205Lu obserwowano wzrost oksydacji już przy niższej dawce erastyny (Rys. 33 B).



**Rysunek 34** Peroksydacja lipidów w komórkach HCT116 p53+/+(A i C) oraz HCT116 p53-/- (B i D) przy dawce 5 µM i 10 µM erastyny w czasie (A i B), wizualizacja 24 godziny po podaniu (C i D).

Komórki nowotworowe jelita grubego odpowiedziały peroksydacją lipidów po dodaniu induktora, w dawce 5 µM. Obserwowano wzrost oksydacji lipidów w komórkach, o czym świadczy duża ilość zielonego sygnału na zdjęciach z mikroskopii konfokalnej (Rys. 34 C i D).

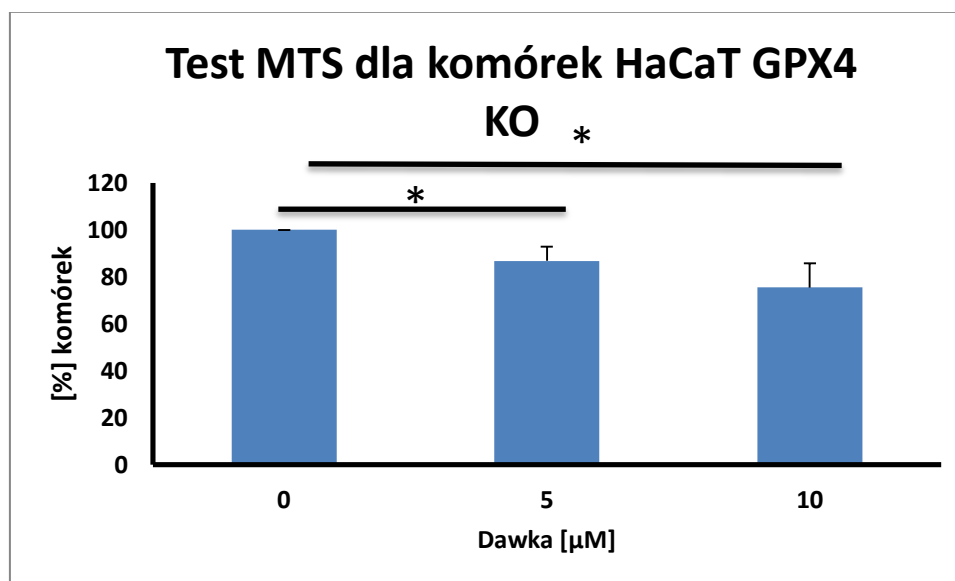
#### 4.12 Edycja genomu metodą CRISPR



**Rysunek 35** Detekcja białek GPX4 i referencyjnej aktyny techniką western blot.

Wyniki pomiaru białek metodą western blot potwierdziły, że uzyskano linię nie produkującą funkcjonalne białko GPX4. Edycja genomu techniką CRISPR/Cas9 spowodowała skuteczne wycięcie wybranej sekwencji, co skutkowało zanikiem produkcji funkcjonalnego białka (Rys. 35 - klon 15; czerwona ramka). Dalsze badania prowadzone były na wyprowadzonej linii - klonach nr 15, zwanym dalej HaCaT GPX4 KO.

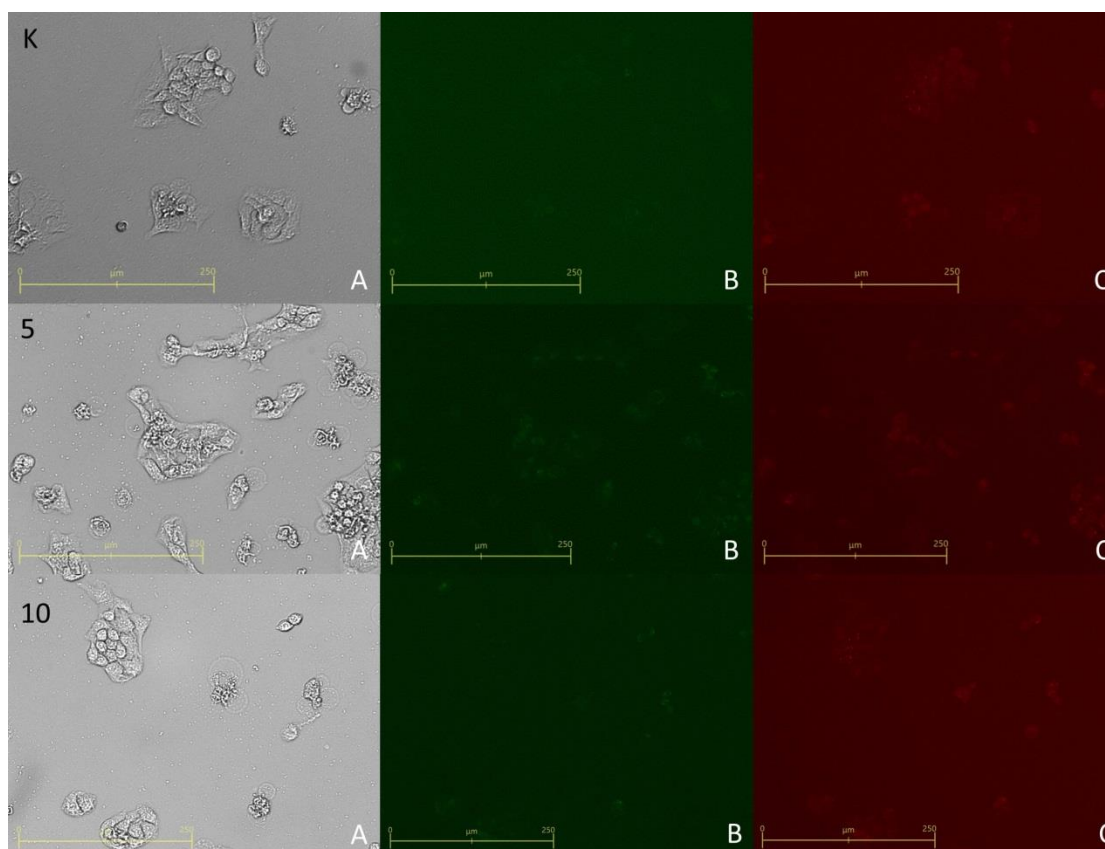
#### 4.12.1 Test MTT



**Rysunek 36** Żywotność komórek 48 godziny po podaniu induktora ferroptozy, erastyny w dwóch dawkach, 5 i 10  $\mu\text{M}$ ; test MTS do komórek HaCaT GPX4 KO. Wartości przedstawiono jako średnią  $\pm$  odchylenie standardowe. Istotność statystyczną oznaczono “\*”, przy wartości  $p < 0,05$ .

Żywotność potraktowanych komórek określono za pomocą testu MTS, a komórki kontrolne (nietraktowane) oznaczano na wykresach, jako 0  $\mu\text{M}$ . Analiza aktywności mitochondrialnej, przekładająca się bezpośrednio na żywotność i proliferację komórek wykazała, że dodanie induktora ferroptozy w dwóch dawkach, 5  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$  spowodowała spadek żywotności w komórkach HaCaT GPX KO do 80% dla niższej dawki i 70% dla dawki wyższej. Wyniki te są zbliżone do tych otrzymanych na komórkach dzikich, HaCaT (Rys. 5 A).

#### 4.12.2 Oksydacja lipidów

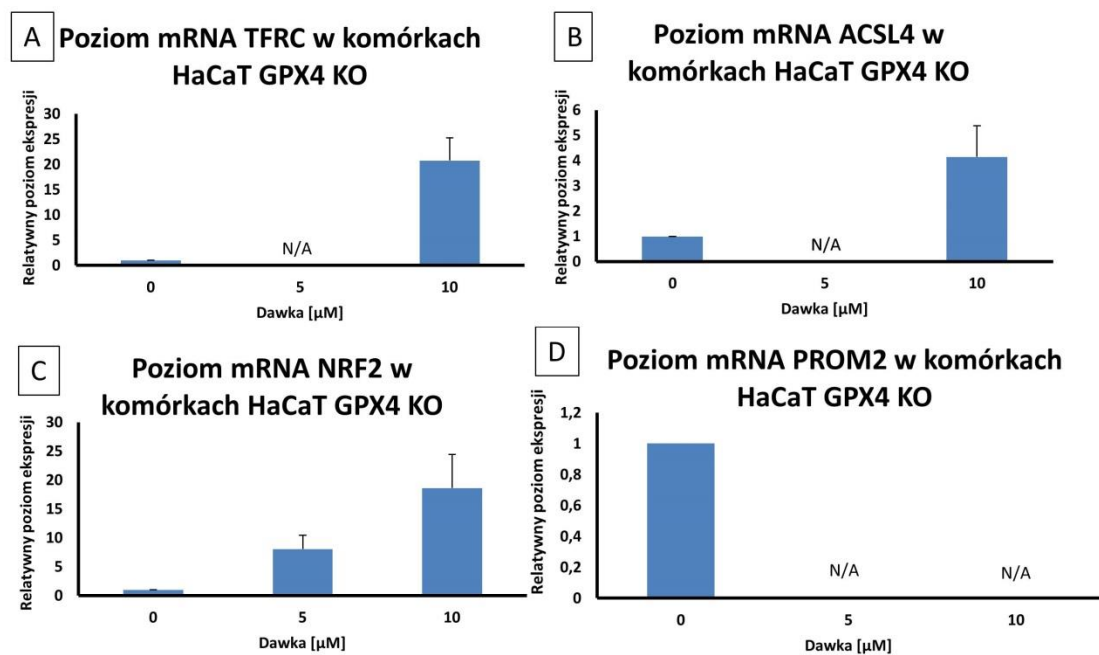


**Rysunek 37** Peroksydacja lipidów w komórkach HaCaT GPX4 KO, kontrola (K) przy dawce 5  $\mu\text{M}$  (5) i 10  $\mu\text{M}$  erastyny (10) 48 godziny po podaniu. Zdjęcia rejestrowano w kanale widzialnym (A), GFP (dla białek oksydowanych, B) oraz RFP (dla białek zredukowanych, C).

Analizując poziomy peroksydacji lipidów można zauważyć, że komórki HaCaT GPX4KO w kotroli wykazują niewielką ilość oksdowanych lipidów (Rys. 37K.B), podobnie przy dawce 10  $\mu\text{M}$  erastyny (Rys. 37 10.B). Natomiast przy dawce 5  $\mu\text{M}$  poziom oksydowanych lipidów wzrasta (Rys. 37 5.B). Poziom zredukowanych lipidów wydaje się być podobny we każdym przypadku.



### 4.12.3 Ekspresja genów markerowych



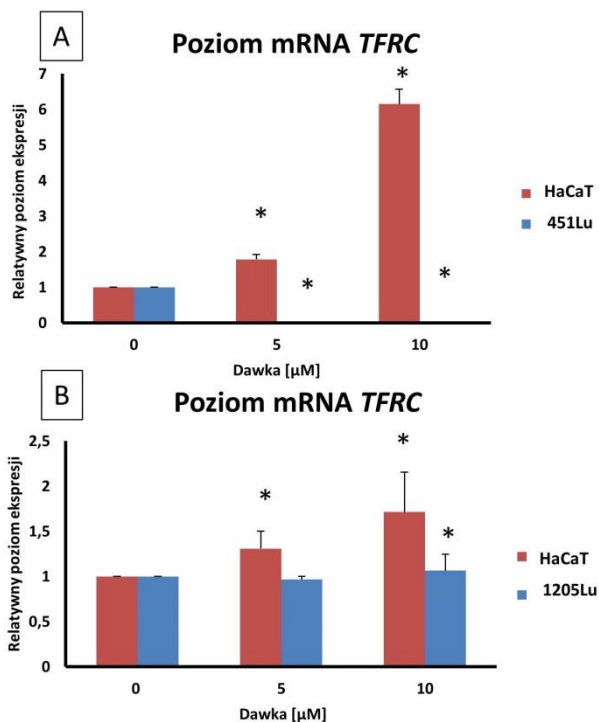
**Rysunek 38** Poziom mRNA genów markerowych w komórkach HaCaT GPX4 KO po podaniu erastyny w dwóch dawkach 5 i 10  $\mu$ M. *TFRC* (A), *ACSL4* (B), *NRF2* (C) i *PROM2* (D).

Mutanty GPX4 KO przy dawce 5  $\mu$ M nie wykazują ekspresji genów markerowych, takich jak *TFRC*, *ACSL4* czy *PROM2*. Wyniki te są odwrócone do tych uzyskanych na linii dzikiej HaCaT, co może sugerować że wyłączenie kluczowego białka antyoksydacyjnego w komórkach spowodowało wrażliwość keratynocytów na ferroptozę powodując wzrost ekspresji genów odpowiedzialnych za ten rodzaj śmierci (Rys. 38). Przeprowadzono reakcję RT-qPCR dla genu *GPX4* w mutantach, jednakże nie przedstawiono wyników, ze względu na brak produktu amplifikacji co potwierdza wycięcie zaprojektowanej sekwencji knock-out (Rys. 38).

### 4.13 Efekt sąsiedztwa (Bystander Effect)

Poza eksperymentami *in vitro* na pojedynczych liniach komórkowych, hodowanych w klasycznej monowarstwie 2D oraz po sprawdzeniu, czy wyciszenie genu *GPX4* miało miejsce, zaplanowano i przeprowadzono

eksperymenty w przestrzennej ko-kultury różnych linii komórkowych naraz. Miało to na celu wstępne zdefiniowanie sygnalizacji międzykomórkowej w populacjach rozdzielonych membraną - możliwość wymiany białek regulatorowych i przekazywanie sygnałów między komórkami w takim układzie jest możliwe. Zbadano odpowiedź w komórkach nie poddanych bezpośrednio działaniu erastyny (zaobserwowano efekt sąsiedztwa w komórkach ko-kulturowanych).

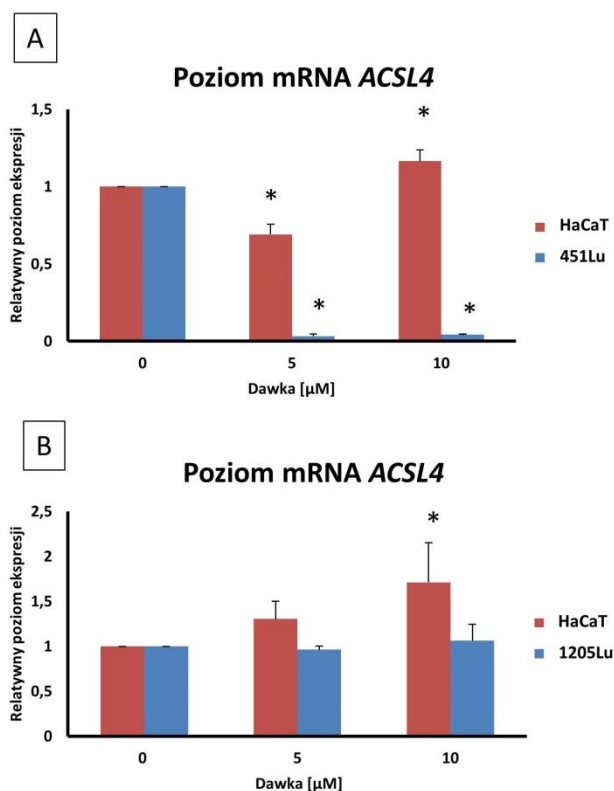


**Rysunek 39** Zmiany ekspresji genu receptora transferyny *TFRC*, sprzyjającego ferroptozie, w komórkach HaCaT ko-inkubowanych z komórkami 451Lu (A) oraz komórkach HaCaT ko-inkubowanych z komórkami 1205Lu (B), 72 h po dodaniu induktora ferroptozy, erastyny.

Keratynocyty HaCaT, ko-inkubowane z melanomą 451Lu (w czwartym stadium zaawansowania nowotworu) wykazywały wzrost ekspresji *TFRC*, przy dawce erastyny 5  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$  (Rys. 36.A). Natomiast w przypadku komórek 451Lu, ekspresja genu została wyciszona (Rys. 36.A).

Komórki HaCaT ko-inkubowane z melanomą w pierwszym stadium zaawansowania (1205Lu), wykazały niewielki wzrost ekspresji genu *TFRC* (Rys. 36.B). Natomiast komórki czerniaka, po zastosowaniu induktora ferroptozy w badanych dawkach, wykazały ekspresję zbliżoną do poziomu kontrolnego (Rys. 36).



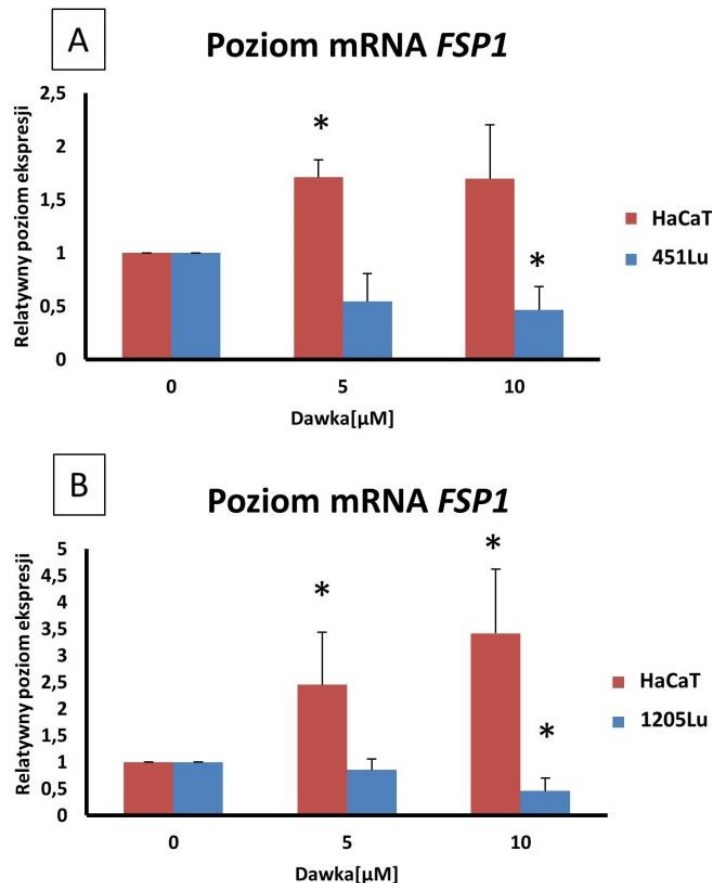


**Rysunek 40** Zmiany ekspresji genu *ACSL4*, będącej markerem ferroptozy w komórkach HaCaT ko-inkubowanych z komórkami 451Lu (A) oraz komórkami HaCaT ko-inkubowanych z komórkami 1205Lu (B), 72 godziny po dodaniu induktora ferroptozy, erastyny.

Komórki prawidłowych keratynocytów (HaCaT), które były ko-inkubowane z melanomą w czwartym stadium zaawansowania nowotworu (451Lu) wykazują spadek poziomu relatywnej ekspresji *ACSL4* przy niższej dawce 5  $\mu$ M, natomiast przy dawce 10  $\mu$ M obserwowany jest wzrost (Rys. 37A). Może to świadczyć o większej oporności na ferroptozę komórek prawidłowych przy niższej dawce erastyny, jednakże przy dawce 10  $\mu$ M stają się one bardziej wrażliwe na indukcję śmierci. Poziom ekspresji *ACSL4* w komórkach nowotworowych 451Lu przy dawce zarówno 5  $\mu$ M, jak i 10  $\mu$ M spada do poziomu zerowego. Całkowite wyciszenie ekspresji tego genu może świadczyć o tym, że komórki czerniaka 451Lu są odporne na ferroptozę.

Ko-inkubowane z melanomą w pierwszym stadium (1205Lu) komórki prawidłowych keratynocytów (HaCaT), wykazują wzrost relatywnej ekspresji genu *ACSL4* korelujący z dawką erastyny (Rys. 37.B). Świadczy to prawdopodobnie o przekazaniu przez komórki czerniaka bodźców powodujących włączenie śmierci komórkowej związanej z akumulacją produktów peroksydacji

lipidów w ko-inkubowanych komórkach prawidłowych HaCaT. Poziom ekspresji *ACSL4* w komórkach 1205Lu przy dawce 5  $\mu\text{M}$  wykazuje niewielki spadek ekspresji, natomiast przy dawce 10  $\mu\text{M}$  obserwowany jest nieznaczny wzrost. Oznacza to, że komórki melanomy 1205Lu wykazują większą wrażliwość na ferroptozę.



**Rysunek 41.** Zmiany ekspresji genu *FSP1*, będącego białkiem supresorowym ferroptozy w komórkach HaCaT ko-inkubowanych z komórkami 451Lu (A) oraz komórkach HaCaT ko-inkubowanych z komórkami 1205Lu (B), 72 godziny po dodaniu induktora ferroptozy, erastyny.

W prawidłowych komórkach skóry HaCaT, ko-inkubowanych z komórkami melanomy w czwartym stadium zaawansowania nowotworu 451Lu zauważono prawie dwukrotny wzrost ekspresji tego genu przy dawce erastyny 5  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$  (Rys. 38.A). Wzrost ten oznacza, że białko supresorowe *FSP1* wykazuje działanie hamujące peroksydację lipidów i ferroptozę, świadcząc o oporność keratynocytów na ten rodzaj śmierci. W przypadku komórek 451Lu ekspresji genu *FSP1* przy obu zastosowanych dawkach znacznie spada.

Komórki prawidłowych keratynocytów HaCaT, ko-inkubowanych z melanomą w pierwszym stadium zaawansowania nowotworu 1205Lu (Rys. 38.B), podobnie jak w przypadku ko-inkubacji z 451Lu, wykazują znaczny wzrost poziomu ekspresji genu *FSP1*. Natomiast komórki melanomy 1205Lu w porównaniu do poziomu ekspresji tego genu w próbie kontrolnej, wykazały jego spadek przy obu dawkach erastyny (Rys. 38.B).

#### 4.14 Tablica decyzyjna

**Tabela 4** Tablica decyzyjna dla wyników z wybranych lini komórkowych skóry.

	HaCaT		1205Lu		451Lu		Me45	
Żywotność MTT	do 80%		do 30%		do 90%		do 95%	
apoptoza/nekroza	brak		brak		brak		brak	
RFT	↑		↑		↓		↑	
peroksydacja lipidów	↓		↑					
anionorodnik ponadtlenny	↑		↓		↓			
NO	bez zmian		bez zmian		bez zmian		↓	
Masa mitochondrialna	↓		↑					
Potencjał mitochondrialny	↓		↓					
Totalny glutation	↓		↓					
	5 μM	10 μM	5 μM	10 μM	5 μM	10 μM	5 μM	10 μM
ACSL4	↓	↓	↑	↑	↓	↓	↓	↓
TFRC	↓	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↓
FSP1	↑	↑	↓	↑	↓	↑	↑	↑
PROM2	↑	↑	brak ekspresji	brak ekspresji	brak ekspresji	brak ekspresji	brak ekspresji	brak ekspresji
GPX4	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↑
TXNRD1	↑	↓	↑	↑				
NRF2	↑	↓	↑	↑				
TRX	↓	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑
IRP2	↑	↑	↑	↑				
SLC7A11	brak ekspresji	brak ekspresji	↑	↑	brak ekspresji	brak ekspresji	brak ekspresji	brak ekspresji
	odpowiedź dla opornych		↑	indukcja				
	odpowiedź dla wrażliwych		↓	wyciszenie				

Powyżej przedstawiono tablicę decyzyjną zawierającą zebrane wyniki dla przebadanych komórek linii skórnych, w zakresie procesów fizjologicznych związanych ze śmiercią komórkową. Kolorem czerwonym zaznaczono odpowiedź komórek związaną z ferroptozo-opornością, natomiast zielonym odpowiedź komórek ferroptozo-wrażliwych.

**Tabela 5** Tablica decyzyjna dla wyników z wybranych linii nowotworów okrężnicy, HCT116 p53+/+ i HCT116 p53-/- oraz linii białaczek K562 i HL60.

	HCT116 p53 +/+		HCT116 p53 -/-		K562		HL60	
Żywotność MTT	do 70%		do 70%		do 80%		do 60%	
apoptoza/nekroza	brak		brak		brak		brak	
RFT	↑		↑		↓		↑	
peroksydacja lipidów	↑		↓		↓		↑	
anionorodnik ponadtlenny	bez zmian		↑		↓		↓	
NO	bez zmian		↑		↓		bez zmian	
Masa mitochondrialna								
Potencjał mitochondrialny								
Totalny glutation								
	5 μM	10 μM	5 μM	10 μM	5 μM	10 μM	5 μM	10 μM
ACSL4	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↑
TFRC	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↓
FSP1	↓	↓	↓	↑	↑	↓	↑	↑
PROM2	brak ekspresji	brak ekspresji	brak ekspresji	brak ekspresji	↑	↑	brak ekspresji	brak ekspresji
GPX4	↓	↓	↑	↓	↑	↑	↑	↑
TXNRD1	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↓
NRF2	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↑	↑
TRX	↑	↑	↓	↓	↑	↑	↑	↑
IRP2	↑	↓	↑	↓	↓	↑	↑	↑
SLC7A11	↑	↑	↑	↑	↑	↑	brak ekspresji	brak ekspresji
	odpowiedź dla opornych		↑	indukcja				
	odpowiedź dla wrażliwych		↓	wyciszenie				

Powyżej przedstawiono tablicę decyzyjną zawierającą zebrane wyniki dla przebadanych komórek linii nowotworów okrężnicy i białaczek w zakresie procesów fizjologicznych związanych ze śmiercią komórkową i statusem białka p53.

**Tabela 6** Tablica decyzyjna dla wyników z wybranych linii nowotworu płuc A549 i prawidłowych fibroblastów skóry NHDF.

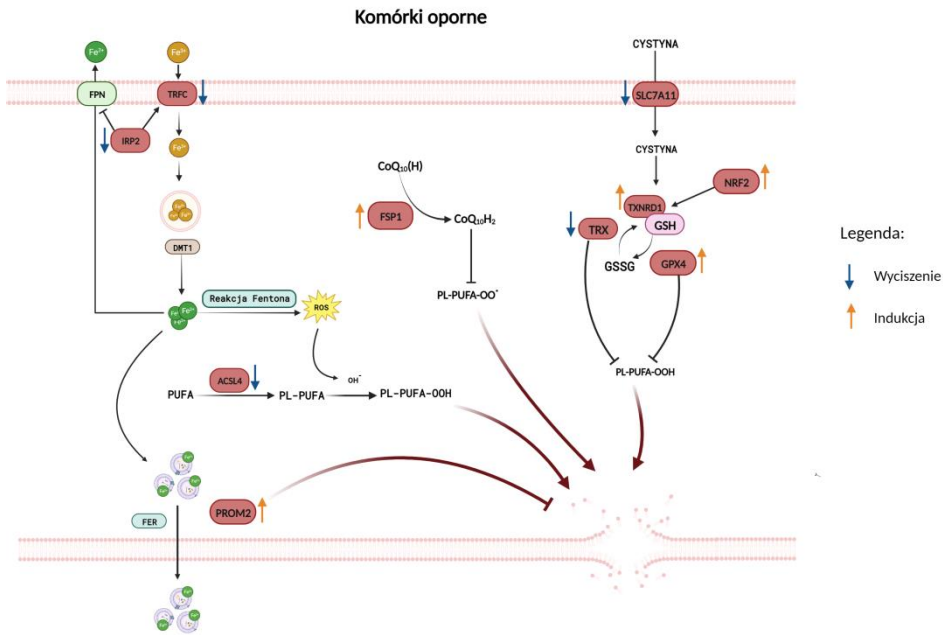
	A549		NHDF	
Żywotność MTT	przy 10 do 60%		do 60%	
apoptoza/nekroza	brak		brak	
RFT	↑		↓	
peroksydacja lipidów				
anionorodnik ponadtlenkowy				
NO				
Masa mitochondrialna				
Potencjał mitochondrialny				
Totalny glutation				
	5 μM	10 μM	5 μM	10 μM
ACSL4	↑	↑	↑	↑
TFRC	↑	↓	↑	↑
FSP1	↓	↑	↑	↑
PROM2				
GPX4	↑	↑	↑	↑
TXNRD1				
NRF2	↑	↓	↑	↑
TRX				
IRP2	↑	↑	↑	↑
SLC7A11				
	odpowiedź dla opornych		↑	indukcja
	odpowiedź dla wrażliwych		↓	wyciszenie

Powyżej przedstawiono tablicę decyzyjną zawierającą zebrane wyniki dla przebadanych komórek linii nowotworu płuc i prawidłowych fibroblastów skóry, w zakresie procesów fizjologicznych związanych ze śmiercią komórkową.

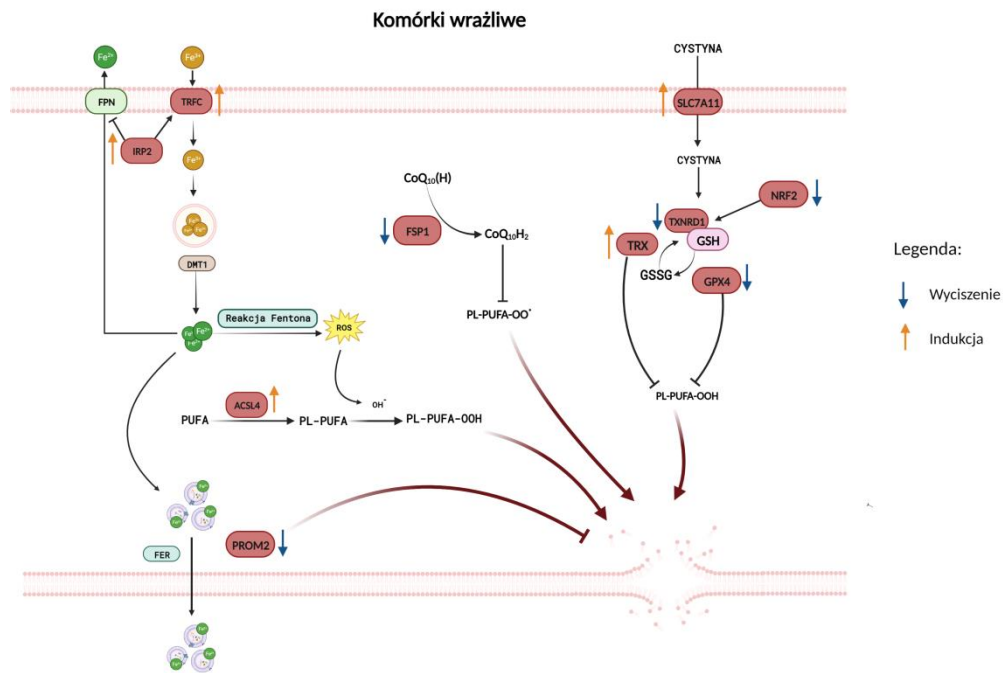
**Tabela 7** Tablica decyzyjna dla komórek ko-inkubowanych (efekt sąsiedztwa).

	HaCaT/451Lu				HaCaT/1205Lu			
	5μM	10μM	5μM	10μM	5μM	10μM	5μM	10μM
ACSL4	↓	↑	↓	↓	↑	↑	bez zmian	bez zmian
TFRC	↑	↑	↓	↓	↑	↑	↓	↑
FSP1	↑	↑	↓	↓	↑	↑	↓	↓
	odpowiedź dla opornych		↑	indukcja				
	odpowiedź dla wrażliwych		↓	wyciszenie				

Tablica decyzyjna (Tabela 7) dla komórek po koinkubacji (efekt sąsiedztwa) przedstawia wyniki dla komórek po indukcji erastyną komórek nowotworowych (451Lu i 1205Lu). Analiza wyników wskazuje na uwrażliwienie komórek prawidłowych, o czym świadczą ekspresjonowane geny markerowe dla wrażliwości komórek: *ACSL4* i *TFRC*. Komórki HaCaT, zarówno po koinkubacji z 1205Lu i jak i 451Lu wykazały wzrost ekspresji tych genów, co jest przeciwną odpowiedzią względem wyników uzyskanych po hodowli tradycyjnej (Tablica 4). W przypadku komórek nowotworowych, w szczególności 1205Lu obserwowany jest spadek ekspresji genów markerowych wrażliwości komórek.



**Rysunek 42** Schemat zmian aktywności wybranych genów charakterystycznych dla ferroptozy w komórkach opornych.



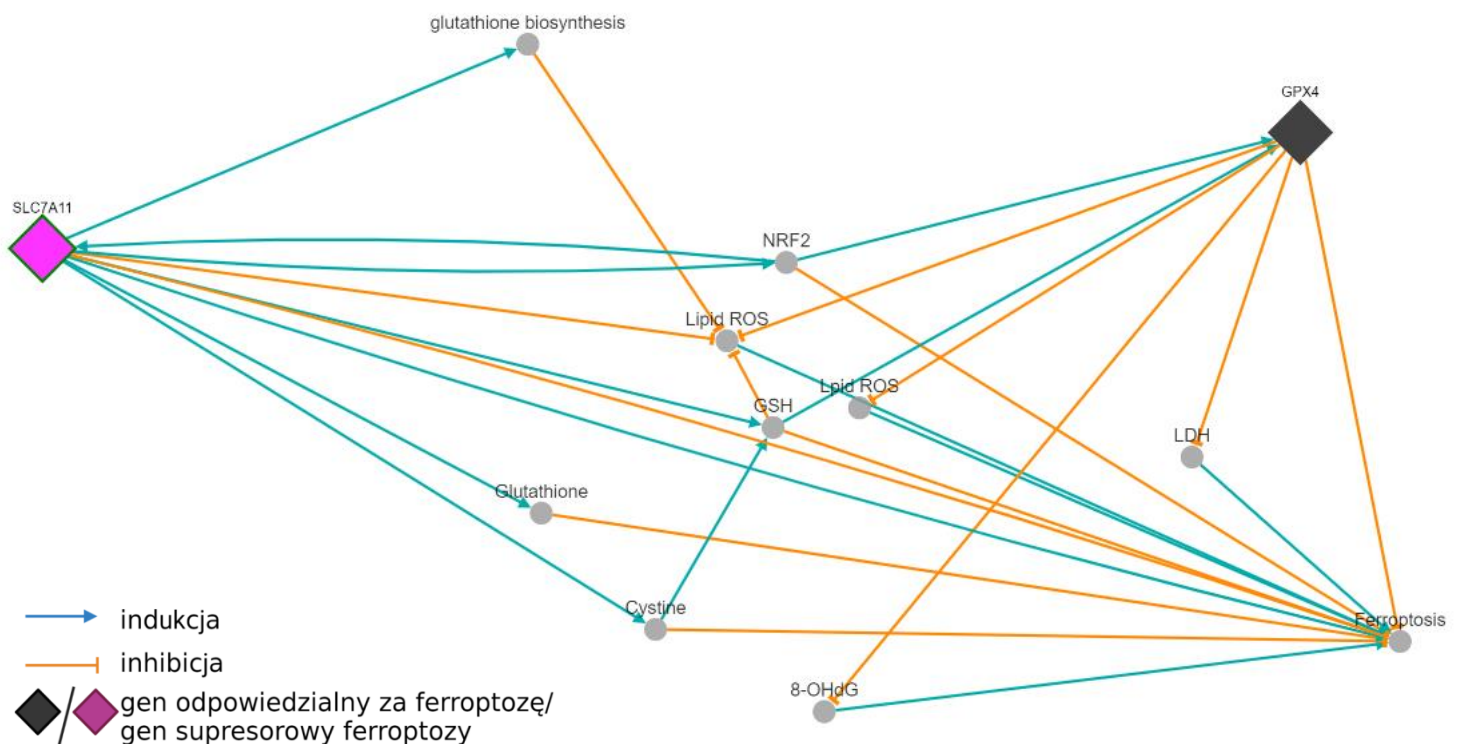
**Rysunek 43** Schemat zmian aktywności wybranych genów charakterystycznych dla ferroptozy w komórkach wrażliwych.

Analizując wyniki uzyskane w badaniach, tablicach decyzyjnych, jak i dane literaturowe oraz dane z baz danych, utworzone zostały schematy zmian aktywności charakterystycznych genów, białek oraz markerów fizjologicznych (np. poziomy RFT, peroksydacji lipidów) w modelach komórkowych ferroptozo-wrażliwych i ferroptozo-opornych. Na podstawie Tabel 4-6 oraz danych literaturowych można wskazać, że komórki odporne charakteryzują się zwiększoną ekspresją genów *PROM2*, *GPX4* oraz *FSP1*, jak również brakiem ekspresji *SLC7A11* (Rys. 42), co czyni te geny markerami oporności [57,105]. Natomiast w przypadku linii wrażliwych, markerami są *ACSL4*, *TFRC*, *SLC7A11* *TRX* czy *IRP2*, (Rys. 43), ekspresjonowane w górę oraz brak ekspresji *PROM2* [26,107].

## 4.15 Analiza sieci zależności regulacyjnych między genami markerowymi

Poniżej przedstawiono wyniki uzyskane z bazy danych FerrDb dla wybranych powiązań między markerami ferroptozy, które zostały częściowo przebadane w pracy.

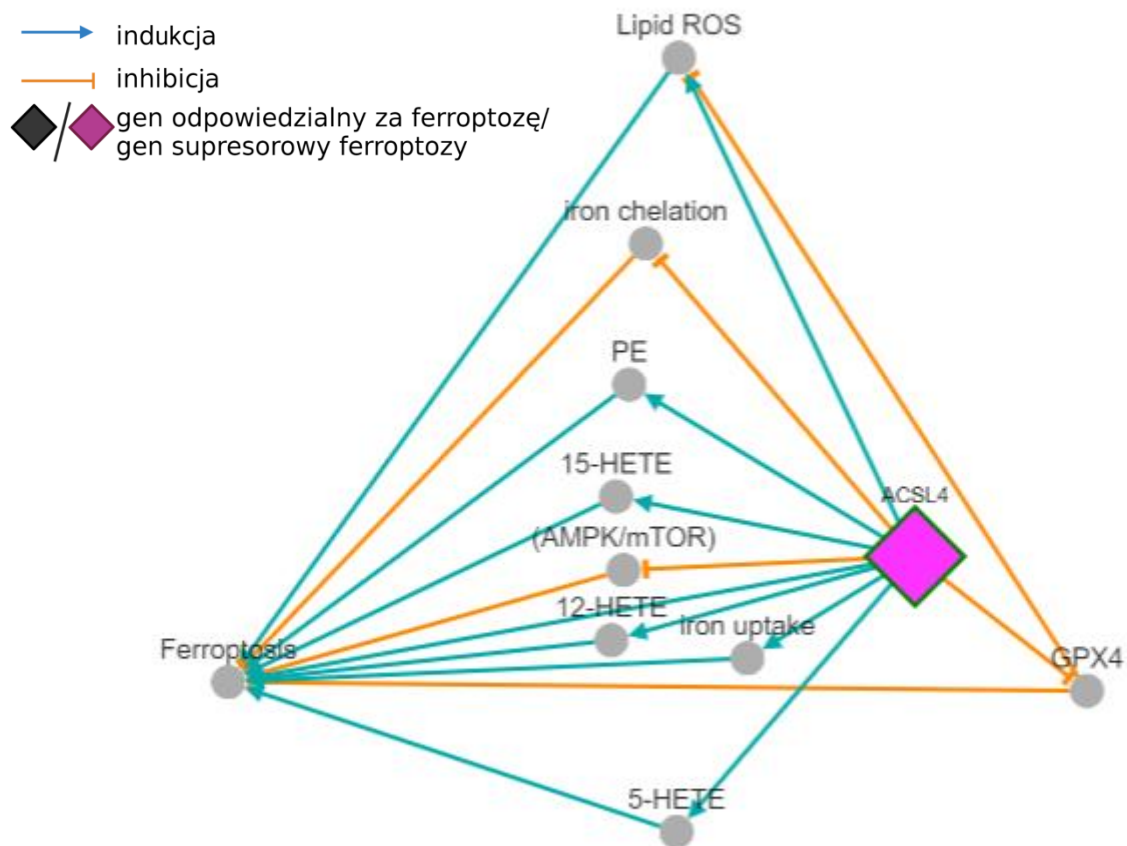
<http://www.zhounan.org/ferrdb/current/operations/regulationnetwork.html>



**Rysunek 44** Sieć zależności regulacyjnych pomiędzy genami *SLC7A11* i *GPX4*,

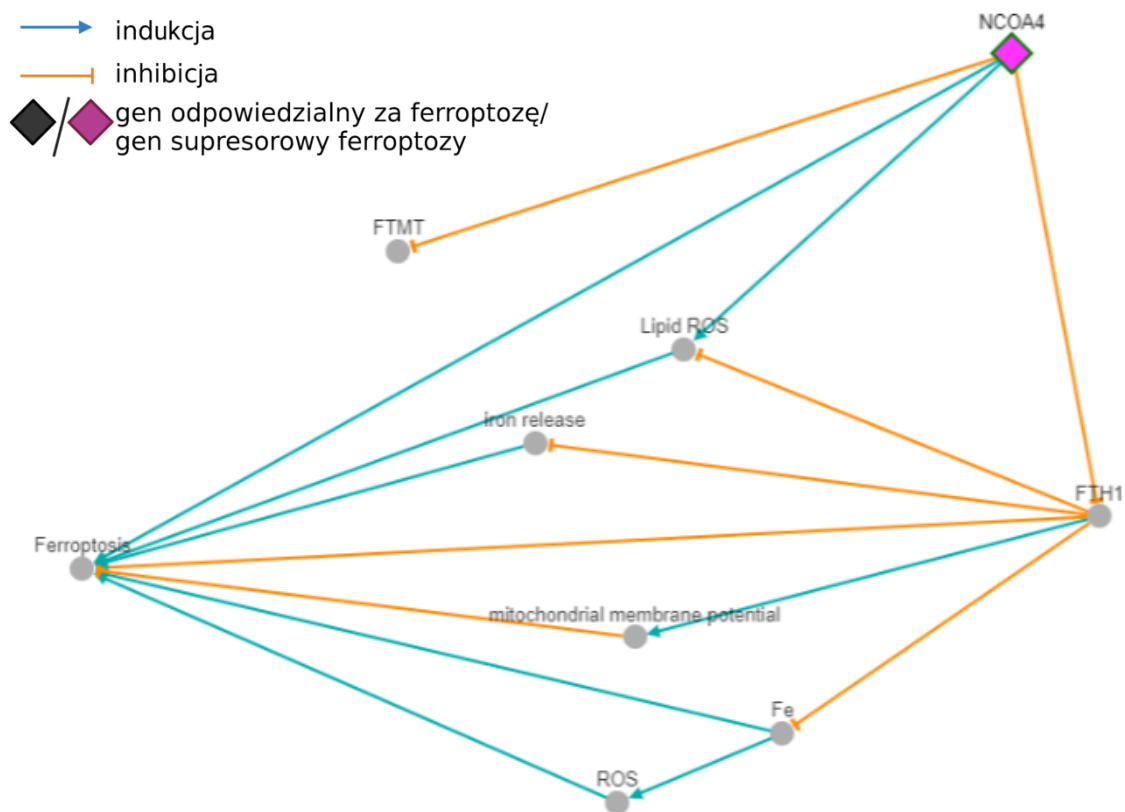
Wyniki uzyskane z bazy danych FerrDB pokazują interakcje poszczególnych genów w komórce. Można zauważyć, jaki wpływ wywierają dane geny przy złożonej ekspresji, co regulują oraz, jak same są regulowane. *SLC7A11* jest genem supresorowym ferroptozy oraz peroksydacji lipidów, natomiast może odpowiadać za promowanie biosyntezy glutationu, poprzez dostarczanie cystyny do komórki. Podobnie w przypadku *GPX4*, gen jest regulowany przez ilość glutationu oraz przez czynnik jądrowy NRF2, a sam jest odpowiedzialny za inhibicję, m. in. ferroptozy czy oksydowanych lipidów.





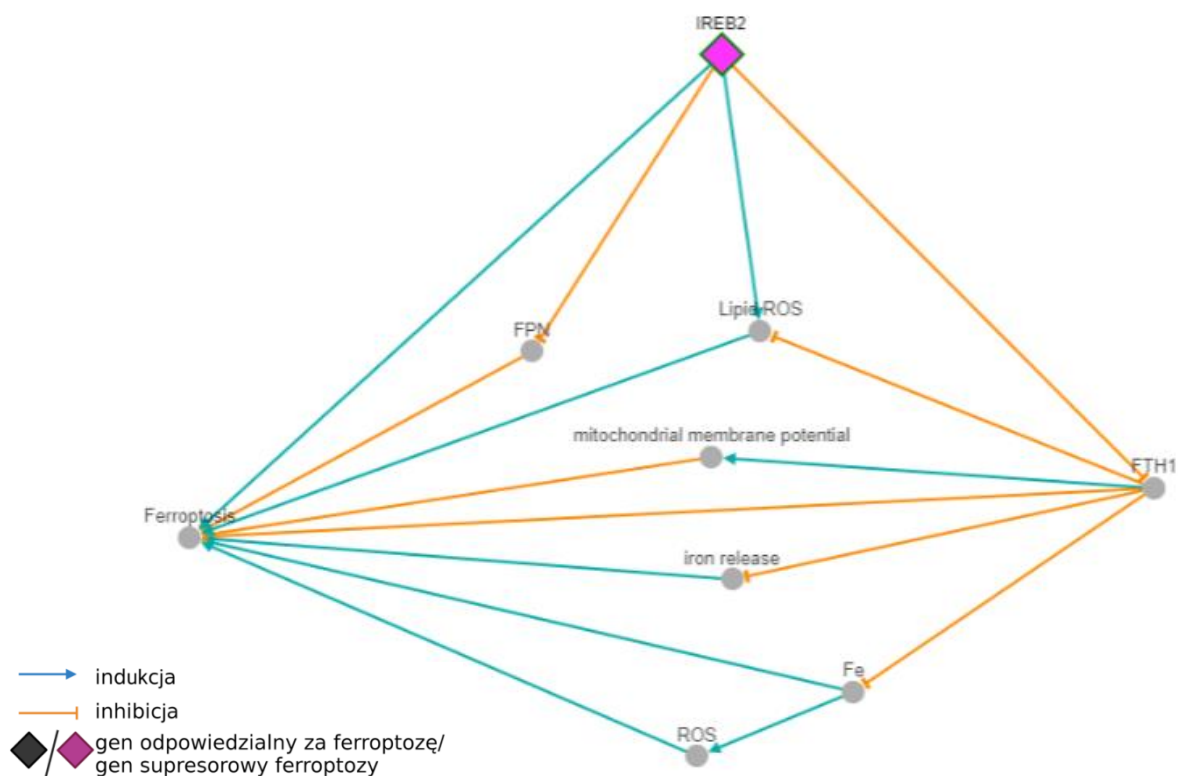
**Rysunek 45** Sieć zależności regulacyjnych pomiędzy genem *ACSL4*, a ferroptozą.

*ACSL4* jest jednym z genów odpowiedzialnych za ferroptozę oraz peroksydację lipidów, natomiast może odpowiadać za hamowanie helatorów żelaza, czy GPX4 poprzez dostarczanie cystyny do komórki. Analiza danych uzyskanych z bazy ukazuje wpływ na indukcję ferroptozy, co potwierdza, zgodnie z literaturą i uzyskanymi wynikami jego znaczącą rolę genu odpowiedzialnego za ferroptozę. Zależności te potwierdzają jego rolę, jako markera wrażliwości na ten rodzaj śmierci.



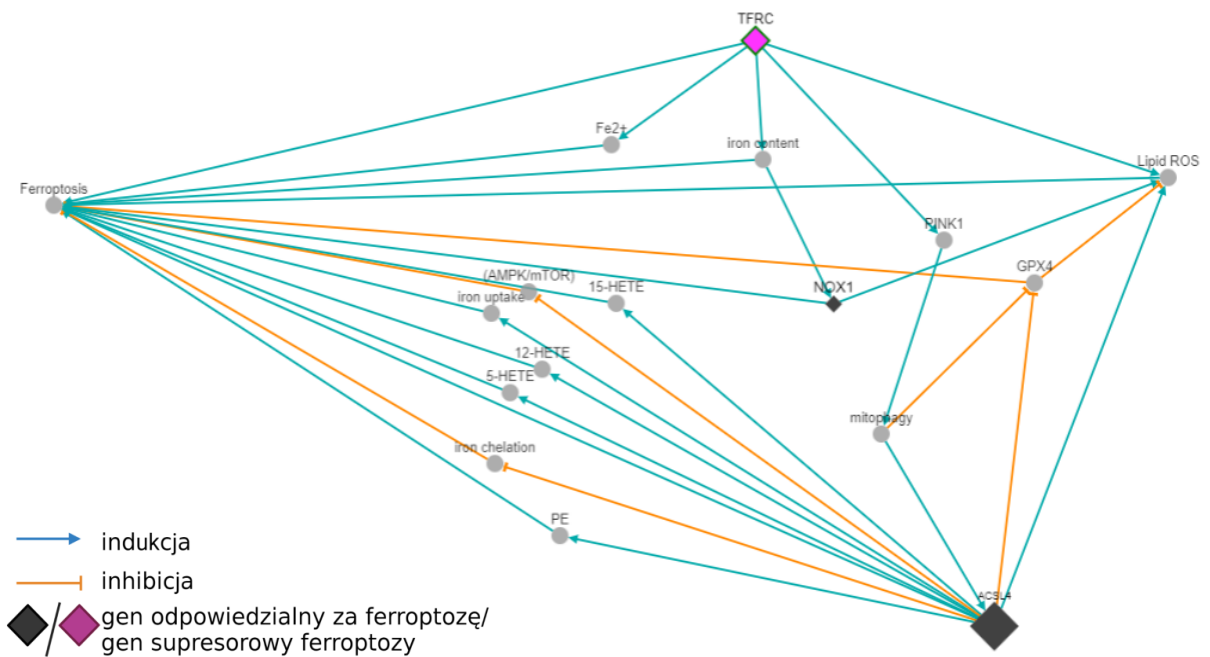
**Rysunek 46** Sieć zależności regulacyjnych pomiędzy genem NCOA4, a ferroptozą.

NCOA4 odpowiedzialny jest za ferrytynofagię, hamuje ferrytynę mitochondrialną (FTMT) i jest odpowiedzialny za szlak ferroptozy, a także i peroksydację lipidów. Pośrednio odpowiada też za indukcję akumulacji żelaza w komórce hamując FTH1 (ang. *Ferritin heavy chain*), odpowiedzialnego za magazynowanie żelaza, doprowadzając tym samym do zwiększenia puli żelaza w komórce, co prowadzi do zwiększenia RFT i w konsekwencji śmierci komórki.



**Rysunek 47** Sieć zależności regulacyjnych pomiędzy IREB2, a ferroptozą.

IREB2 odpowiada za utrzymanie homeostazy żelaza i jest supresorem ferroptozy, i peroksydacji lipidów. Podobnie jak NCOA4, pośrednio odpowiada też za indukcję akumulacji żelaza w komórce hamując FTH1, brak wystarczającego przechwyty i magazynowania żelaza, co prowadzi do śmierci komórki na drodze ferroptozy.



**Rysunek 48** Sieć zależności regulacyjnych pomiędzy ACSL4 i TFRC.

Białko TFRC jest supresorem odpowiedzialnym w ferroptozie za wzrost ilości żelaza, co prowadzi do oksydacji lipidów; za wzrost ekspresji PINK1, co prowadzi do mitofagii. Nie ma bezpośredniego połączenia z ACSL4, pośrednio powodując wzrost ekspresji *PINK1*, a to skutkuje mitofagią i powoduje supresję *ACSL4*. Indukcja *ACSL4* przyczynia się do inhibicji GPX4, wyłączając tym samym tarczę glutationową, w skutek czego następuje niekontrolowana oksydacja lipidów prowadząca do śmierci.

## 4.16 Korelacje

**Tabela 8** Zestawienie korelacji pomiędzy dawką erastyny, a poszczególnymi genami oraz pomiędzy poszczególnymi genami.

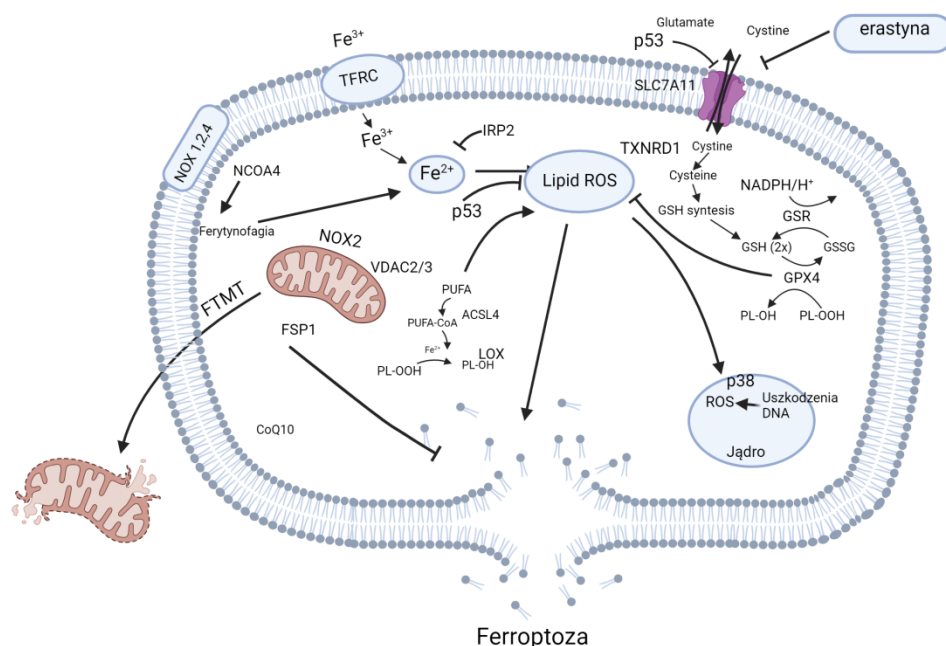
	TRX/dawka	TRX/GPX4	GPX4/dawka	ACSL4/dawka	TFRC/dawka	RFT/dawka	RFT/O•	RFT/NO	NO/dawka	O•/dawka	GPX4/RFT	ACSL4/RFT
HaCaT	-0,558687656	0,092410406	0,774200683	-0,755928946	-0,981980506	0,946371	0,94283	-0,17516	0,152323	0,784592	0,52819	-0,9269
1205Lu	0,5	0,672010272	0,977333169	0,720576692	0,981980506	0,468902	-0,84219	-0,42332	-0,9987	-0,87114	0,645264	0,950304
451Lu	0,933248265	-0,038301686	0,323223486	0,654653671	0,902516804	0,967369	-0,64103	-0,60296	-0,38115	-0,81458	0,072905	0,253371
Me45	0,935048915	0,55094866	0,811023698	-0,5	-0,755928946	0,829129	-0,99881	-0,81096	-0,9995	-0,80083	0,345388	-0,64155
HCT116 p53 +/-	0,65525861	-0,988859006	-0,535512482	-0,143214084	0,155542754	0,666284	-0,10776	-0,36632	0,449794	-0,81315	-0,98657	-0,83343
HCT116 p53 -/-	-0,558687656	-0,29853321	-0,624771055	0,127256953	0,792405816	0,905602	0,827942	0,761799	0,415129	0,987643	-0,23463	-0,74906
NHDF			0,480251092	0,981980506	0,993399268							
A549			0,713184906	0,867405614	-0,240192231							
HL60	0,484879355	0,338668314	0,987111678	0,237334079	-0,751243635	0,074941	-0,62111	0,718646	-0,63957	-0,82806	-0,08561	0,986482
K562	0,940840803	0,657601831	0,87397577	0	0,327326835	-0,79267	0,905213	0,970268	-0,62155	-0,45846	-0,3965	0,609651

Powyższa tabela przedstawia korelacje pomiędzy ekspresją poszczególnych genów, a dawką erastyny, poziomem RFT, jak również pomiędzy genami. Zgodnie z Tabelą 3 interpretację korelacji podzielono kolorystycznie (heat map). Kolorem czerwonym oznaczona jest silna dodatnia korelacja pomiędzy czynnikami, jasnoróżowym do białego słaba dodatnia, natomiast ciemno zielonym silna ujemna, a jasno zielonym słaba ujemna korelacja.

W zależności od linii ilość dodatnich korelacji się różni. Największą ilość dodatnich korelacji zarówno tych silnych, jak i słabych obserwowano w linii 1205Lu (8/12 zbadanych zależności), HCT116 p53-/-, K562 (7/12 zbadanych zależności) oraz w liniach 451Lu i HL60, gdzie połowa parametrów miała dodatnią korelacją. Dla pozostałych linii większą część korelacji była ujemna. Analiza zależności parametrów wykazała największą ilość dodatnich korelacji (w 5 lub więcej liniach) obserwowano w odpowiedzi ekspresja GPX4, a dawka erastyny (8 na 10 linii) reaktywne formy tlenu od dawki (6 na 10) oraz TRX dawka (6 na 10 linii komórkowych).

## 5. Dyskusja

Komórki wykazywać mogą różną wrażliwość na dany rodzaj śmierci, jedne mogą być bardziej wrażliwe, a drugie odporne na stymulację/inhibicję ścieżki sygnałowej. Zależność ta ma kluczowe znaczenie w leczeniu chorób, w tym nowotworów. Umiejętność regulacji, poprzez włączenie konkretnego typu śmierci w komórce daje wiele nowych możliwości. Komórki różnych linii traktowane induktorem ferroptozy, erastyną, wykazały różną wrażliwość na indukcję śmierci. Komórki HaCaT, 451Lu, Me45, oraz HCT116 p53+/+ oraz HCT116 p53-/- nie wykazały się znaczącym spadkiem przeżywalności po zastosowaniu induktora. Największy spadek, bo o 80% zaobserwowany był w komórkach 1205Lu, co może świadczyć o zubożeniu puli naturalnych antyoksydantów, m.in. glutationu wskutek braku cysteiny, która niezbędna jest do jego syntezy (erastyna blokuje wymiennik błonowy dla cystyny) [175]. Mechanizmy odporności na ferroptozę integrują metabolizm, biologię RFT i regulacyjną rolę jonów żelaza.



**Rysunek 49** Schemat wzajemnego oddziaływania przebadanych w pracy czynników dla ścieżki śmierci, ferroptozy.

Zastosowanie induktora nie wpłynęło znacząco na zmiany w cyklu komórkowym w przebadanych liniach, jedynie w komórkach czerniaka, 1205Lu

obserwowano blokadę cyklu w fazie G0/G1, po erastynie w dawce 5  $\mu$ M (Rys. 6 B). Erastyna jest stosowana, jako induktor ferroptozy, a otrzymane wyniki potwierdziły jej specyficzność działania dla tej ścieżki śmierci. Erastyna nie wykazała znacznej cytotoksyczności czy aktywacji ścieżki apoptozy lub nekrozy w badanych liniach komórkowych *in vitro*.

Zmierzone poziomy reaktywnych form tlenu pokazały wzrost dla niektórych linii komórkowych, w tym w HCT116 p53+/+ i HCT116 p53-/-, HaCaT czy 1205Lu, zarówno przy niższej, jak i wyższej dawce erastyny (Rys. 7). Poziomy RFT zbliżone do poziomów netraktowanych populacji kontrolnych, zaobserwowano w liniach HL60 i Me45. Spadek poziomu RFT względem kontroli zaobserwowano w liniach 451Lu i K562 (Rys. 7). Na podstawie otrzymanych wyników wzrostu poziomu RFT można wnioskować o tym, że wrażliwość komórek na stres związany jest z blokadą antyportera  $Xc^-$  przez podaną erastynę. Na fluktuacje RFT nie miał wpływu tlenek azotu, ponieważ cytometryczne pomiary wykazały zbliżone wartości poziomu NO, zarówno po potraktowaniu, jak i w kontrolach (Rys. 10). Z kolei w liniach HCT116 p53-/-, HaCaT czy NHDF poziom anionorodnika nadadtlenkowego wzrasta (Rys. 9), może być on jednym z reaktywnych form tlenu w ścieżce ferroptozy. Dla pozostałych linii komórkowych poziom tego RFT nie był wyższy od kontroli, dla niektórych był niższy (Rys. 9).

Analiza genów markerowych dla ścieżki ferroptozy wykazała, że linie komórkowe o różnej wrażliwości na induktor, erastynę cechuje różny profil ekspresji. Ekspresja genu kodującego białko TFRC jest kluczowa dla początkowej fazy ferroptozy. W komórkach nowotworowych występuje zwiększona ekspresja tego receptora, przez co w konsekwencji dochodzi do akumulacji żelaza w komórkach (Rys. 14). Ekspresja genu *TFRC* odpowiedzialnego za transport żelaza do wnętrza komórki wzrosła w komórkach czerniaka 1205Lu i 451Lu (Rys. 12 B i C), spadek obserwowano w liniach keratynocytów HaCaT i Me45 (Rys. 12 A i D), zwłaszcza przy wyższej dawce erastyny. W przypadku komórek jelita grubego HCT116 p53+/+ i HCT116 p53-/- obserwowano spadek przy dawce 5  $\mu$ M oraz wzrost przy dawce 10  $\mu$ M (Rys 12 E i F). Podobny profil ekspresji reprezentowała linia białaczki K562, a w HL60

obserwowano również spadek dla dawki 10  $\mu$ M (Rys. 12 G i H). Linia prawidłowych fibroblastów NHDF odpowiedziała na indukcję ferroptozy wzrostem ekspresji *TFRC* przy obu dawkach erastyny (Rys. 12 I), natomiast linia raka płuc A549 wykazała wzrost tylko przy niższej dawce oraz spadek (istotny statystycznie) dla wyższej dawki induktora (Rys.12 J).

Wykonane barwienie błękitem pruskim wskazuje na wyższą zawartość żelaza w komórkach nowotworowych, 1205Lu (Rys. 14), po zastosowaniu induktora w obu dawkach obserwowane są błękitne skupiska w komórkach (wybarwione żelazo). Natomiast nie obserwowano ich w komórkach prawidłowych HaCaT (Rys. 13). Obserwacje te są spójne z wynikami dla receptora transferyny (TFRC), który odpowiada za transport żelaza do komórek ze środowiska pozakomórkowego za pośrednictwem transferyny. Wyniki uzyskane dla obu linii z reakcji RT-qPCR potwierdzają wzrost ekspresji *TFRC* w komórkach nowotworowych (Rys. 12.B) oraz spadek w komórkach prawidłowych (Rys. 12.A), a co za tym idzie, obserwowany jest brak żelaza w komórkach HaCaT (Rys. 13), podczas gdy pojawia się żelazo w czerniaku, 1205Lu (Rys. 14). Wyniki uzyskane z badania poziomu ekspresji, jak i te obserwowane podczas barwienia błękitem pruski w przypadku obu linii wykazują korelację dodatnią.

Wyższą ekspresję *ACSL4* obserwuje się w komórkach, które wykazują wrażliwość na ferroptozę, natomiast wyciszona ekspresja tego genu występuje w komórkach niewrażliwych na ten rodzaj regulowanej śmierci komórkowej. Uzyskane wyniki sugerują oporność komórek HaCaT (Rys. 15 A) oraz komórek nowotworowych 451Lu i Me45 (Rys. 15 C i D) oraz wrażliwość linii 1205Lu, HL60, NHDF i A549, gdzie obserwowany był wzrost dodatnio korelujący z dawką erastyny (Rys. 15 B, G, I i J). Zmniejszenie ekspresji *ACSL4* niweluje gromadzenie się substratów nadtlenków lipidów w komórkach chroniąc przed ferroptozą [176].

Białko supresora ferroptozy (FSP1) uważane jest za ważny czynnik oporności na ferroptozę i wykazuje zwiększoną ekspresję w komórkach opornych na ten rodzaj śmierci [56,57]. Funkcjonuje, jako samodzielny system równoległy do szlaku GPX4, który współpracuje z nim i glutationem w celu zahamowania peroksydacji lipidów i ferroptozy. W komórkach prawidłowych skóry, HaCaT



i NHDF (Rys. 16 A i I), jak również w komórkach białaczki HL60 i K562 (Rys. 16 G) obserwowany był wzrost ekspresji *FSP1*, podobnie w komórkach nowotworowych 451Lu i Me45 (Rys. 16 C i D). W przypadku komórek jelita grubego HCT116 p53+/+ obserwowano spadek ekspresji supresora przy obu dawkach erastyny. Natomiast dla komórek HCT116 p53-/-, przy dawce 5  $\mu$ M wzrost, a przy dawce 10  $\mu$ M spadek ekspresji *FSP1*. Poziom ekspresji supresora w komórkach 1205Lu (Rys. 16 B) zbliżony był do poziomu kontroli.

Wzrost ekspresji genu *PROM2* w komórkach odpowiada za zapobieganie znacznemu przyrostowi wewnątrzkomórkowego żelaza, jednocześnie pozwala to chronić przed uruchomieniem ścieżki ferroptozy. Sam wzrost ekspresji tego genu uważa się za wyznacznik oporności na ten rodzaj śmierci, ponieważ napędza ona tworzenie się ciałek wielo-pęcherzykowych zawierających ferrytynę i egzosomów, które transportują żelazo na zewnątrz komórki, hamując ferroptozę [105]. Otrzymane wyniki potwierdzają wcześniejsze założenia, co do wrażliwości i oporności tkankowej komórek na indukcję lub hamowanie ferroptozy. Zaobserwowano wzrost ekspresji genu *PROM2* w komórkach HaCaT (Rys. 17 A) oraz K562 (Rys. 17 H).

Cysteina ze względu na swoją rolę w syntezie białek, modyfikacji potranslacyjnych i utrzymaniu stanu redoks jest niezbędnym składnikiem w komórce. Służy, jako prekursor ograniczający szybkość tworzenia glutationu, tripeptydu składającego się z trzech aminokwasów – cysteiny, glutaminianu i glicyny – i najobficiej występującego przeciwutleniacza komórkowego. Zewnątrzkomórkowa cystyna jest importowana do komórki przez *SLC7A11*, białko błonowe antyportera cysteino/glutaminowego, a następnie przekształcana w cysteinę w reakcji redukcji zużywającej NADPH. Następnie cysteina jest wykorzystywana do syntezy GSH w dwuetapowym procesie. Gen kodujący białko antyportera cysteino/glutaminowego jest na ogół mało ekspresjonowany w komórkach [170,171]. Brak ekspresji lub obniżenie prowadzi do zmniejszenia wychwytu cystyny i zwiększenia wrażliwości na ferroptozę. Odwrotnie, regulacja w górę ekspresji *SLC7A11* prowadzi do oporności na ferroptozę [172]. Traktowanie komórek inhibitorem tego transportera spowodowało w części linii wzrost ekspresji genu (Rys. 19), co sugerowało odpowiedź komórkową na

zwiększone zapotrzebowanie komórek na cystynę, niezbędną do produkcji glutationu i regeneracji tarczy glutationowej.

Kodowane przez GPX4 białko należy do rodziny peroksydaz glutationowych, których członkowie katalizują redukcję nadtlenu wodoru, wodoronadtlenków organicznych i wodoronadtlenków lipidów, przez co chronią komórki przed uszkodzeniami oksydacyjnymi. GPX4 jest uważany za marker ferroptozy, wiadomo, że ferroptoza jest następstwem niewydolności systemu antyoksydacyjnego, który opiera się na syntezie i regeneracji glutationu (z formy utlenowanego dimeru do zredukowanych monomerów). Blokada antyportera cysteino/glutaminowego SLC7A11 przez erastynę, w wyniku, czego następuje zubożenie komórki w cysteinę niezbędną do produkcji GSH, spowodowała wzrost ekspresji genu *GPX4* we wszystkich badanych liniach (Rys. 20). Sugeruje to uruchomienie ścieżki ferroptozy po erastynie. Jednak w liniach opornych, jak w przypadku keratynocytów HaCaT, przy dawce 5  $\mu$ M obserwowany był spadek ekspresji markera ferroptozy, w konsekwencji następuje jej wytłumienie (Rys. 20).

TRX jest kluczowym białkiem, który łączy metabolizm redoks i funkcję białek związanych z żelazem. Wszystkie linie wykazały wzrost ekspresji tego genu po indukcji erastyną, a wzrost ten dodatnio korelował z dawką (Rys. 22). Zaobserwowano spadek ekspresji w dawce 5  $\mu$ M dla komórek HaCaT oraz HCT116 p53<sup>-/-</sup> (Rys. 22 A i F).

TXRrd przyczynia się do zmniejszonej wrażliwości komórek na induktor ferroptozy, erastynę. Jest również potrzebny, aby zredukować formę utlenioną tioredoksyny do zredukowanej (Rys. 21), aby mogła pełnić dalej funkcję antyoksydanta. Obserwowany był wzrost ekspresji we wszystkich liniach w obu dawkach z wyjątkiem linii keratynocytów i HL60 dla dawki 10  $\mu$ M (Rys. 23 A i E) oraz HCT116 p53<sup>-/-</sup> (Rys. 23 D) dla dawki 5  $\mu$ M, gdzie obserwowano spadek. Wzrost ekspresji sugeruje zapotrzebowanie komórki na odnowę puli zredukowanej tioredoksyny, która nie będzie miała miejsca bez obecności reduktazy.

W złożonych organizmach homeostaza żelaza jest utrzymywana przez białka regulujące żelazo (IRP1 i IRP2) oraz szlak sygnałowy IRE. Wszystkie linie

wykazały wzrost ekspresji *IRP2* w obu dawkach (Rys. 24), wyjątek stanowiła linia białaczki K562, gdzie obserwowany był istotnie statystyczny spadek ekspresji.

Innym czynnikiem transkrypcyjnym promującym transkrypcję *SLC7A11* jest NRF2, który przede wszystkim pośredniczy w programach transkrypcyjnych w odpowiedzi na stres oksydacyjny [170]. Dodanie erastyny do komórek, spowodowało wzrost ekspresji *NRF2* w komórkach 1205Lu, HL60, K562 i A549 (Rys. 25 B, E, F i H) w obu dawkach oraz wzrost przy dawce 5  $\mu$ M w liniach HaCaT oraz NHDF (Rys. 25 A i G) oraz spadek w obu dawkach dla komórek raka jelita grubego HCT116 p53+/+ i HCT116 p53-/-.

Poziom białka GPX4 w komórkach HaCaT spada wraz z dawką podanej erastyny, a wzrasta dla komórek czerniaka 1205Lu. Dla komórek nowotworowych wynik ten koreluje dodatnio z ekspresją genu kodującego to białko, natomiast w komórkach prawidłowych korelacja ta jest ujemna (Rys. 26).

Poziom białka *FACL4* w komórkach HaCaT wzrasta przy dawce 5  $\mu$ M podanej erastyntny, a spada przy dawce 10  $\mu$ M. Wzrost ekspresji białka zaobserwowano w linii komórek czerniaka 1205Lu, w obu dawkach. Dla komórek nowotworowych wynik ten koreluje dodatnio z ekspresją genu kodującego to białko, natomiast w komórkach prawidłowych korelacja jest ujemna (Rys. 27).

Dodanie erastyny do komórek spowodowało spadek poziomu totalnego glutationu (GSH/GSSG) w komórkach HaCaT i 1205Lu przy obu dawkach (Rys. 28). Wyniki te są statystycznie istotne i korelują ujemnie z dawką.

Indukcja ferroptozy, erastyną w keratynocytach i czerniaku 1205Lu (Rys. 29) spowodowała spadek potencjału mitochondrialnego wraz z dawką. Wynik ten silnie koreluje ujemnie. Jest to związane z elastyną, która wpływa na mitochondria powodując utratę integralności błony a co za tym idzie blokuje też białka błonowe takie jak NOX2 czy VDAC2/3 [174].

Indukcja ferroptozy, erastyną w komórkach HaCaT spowodowała spadek masy mitochondrialnej wraz z dawką, natomiast w komórkach czerniaka (1205Lu) obserwowano wzrost wraz z dawką (Rys 30). Wynik ten silnie koreluje ujemnie dla keratynocytów, natomiast dla czerniaka korelacja jest dodatnia. Wzrost masy mitochondrialnej w czerniaku może być również spowodowany

charakterystyką linii, z jej morfologii wynika, że ma ona większe mitochondria (Rys. 32).

W przypadku komórek prawidłowych HaCaT, przy dawce 10  $\mu\text{M}$  (Rys. 31 C) obserwowano znaczące zmiany w integralności błon mitochondrialnych. Z kolei w przypadku linii nowotworowych zaobserwowane typowe zmiany w morfologii mitochondriów już przy niższej dawce erastyny, 5  $\mu\text{M}$  (Rys. 32 B i C). Uszkodzenia nasiliły się przy zwiększeniu dawki erastyny do 10  $\mu\text{M}$  (Rys. 32 D i E). Obserwacje potwierdziły działanie induktora, który spowodował uszkodzenia mitochondriów.

Komórki keratynocytów nie wykazały peroksydacji lipidów po dodaniu induktora. Obserwowano wzrost puli zredukowanych lipidów w komórkach (sygnał czerwony na zdjęciach (Rys. 25). Natomiast w komórkach czerniaka 1205Lu obserwowano wzrost oksydacji już przy niższej dawce erastyny (Rys. 33 B).

Komórki nowotworowe jelita grubego (HCT116 p53+/+ i HCT116 p53-/-) odpowiedziały peroksydacją lipidów po dodaniu induktora, w dawce 5  $\mu\text{M}$ . Obserwowano wzrost oksydacji lipidów w komórkach, o czym świadczy duża ilość zielonego sygnału na zdjęciach z mikroskopii konfokalnej (Rys. 34 C i D).

Wyniki pomiaru białek metodą western blot na mutantach GPX4 potwierdziły, że uzyskano linię produkującą nie funkcjonalne białko GPX4, edycją genomu techniką CRISPR/Cas9 uzyskane wycięciem wybranej sekwencji nukleotydowej (Rys. 35 klon nr 15), nazwaną HaCaT GPX4 KO. Wyniki te zostaną potwierdzone sekwencjonowaniem, próbki zostały przygotowane zgodnie z opisem w rozdziale 3.15, a produkt PCR wysłany do sekwencjonowania, niestety do czasu złożenia pracy nie uzyskano wyników.

Analiza aktywności mitochondrialnej w teście MTS, przekładająca się bezpośrednio na żywotność i proliferację komórek wykazała, że dodanie induktora ferroptozy w dwóch dawkach, 5  $\mu\text{M}$  oraz 10  $\mu\text{M}$  spowodowała spadek żywotności w komórkach HaCaT GPX KO do 80% dla niższej dawki i 70% dla dawki wyższej. Wyniki te są zbliżone od tych na komórkach dzikich HaCaT (Rys. 5 A).

Poziom peroksydacji lipidów w komórkach HaCaT GPX4KO już w kontroli wykazywał niewielką ilość oksydowanych lipidów (Rys. 37K.B), oraz przy dawce 10  $\mu\text{M}$  erastyny (Rys. 37 10.B). Natomiast przy dawce 5  $\mu\text{M}$  poziom oksydowanych lipidów był widocznie większy (Rys. 37 5.B). Poziom zredukowanych lipidów wydaje się być podobny w każdym przypadku.

Mutanty GPX4 przy dawce 5  $\mu\text{M}$  nie wykazują ekspresji genów markerowych takich jak TFRC, ACSL4 czy PROM2. Wyniki te są odwrotne do tych uzyskanych na linii dzikiej, co może sugerować, że wyłączenie kluczowego białka antyoksydacyjnego w komórce spowodowało wrażliwość keratynocytów na ferroptozę powodując wzrost ekspresji genów odpowiedzialnych za ten rodzaj śmierci. Nie uzyskano wyników amplifikacji starterów do GPX4, co może również potwierdzać pozytywne wycięcie fragmentu genu.

Poza eksperymentami *in vitro* na pojedynczych liniach komórkowych, hodowanych w klasycznej monowarstwie 2D oraz sprawdzeniu czy wyciszenie genu GPX4 miało miejsce zaplanowano i przeprowadzono eksperymenty w przestrzennej ko-kultywacji. Miało to na celu wstępne zdefiniowanie sygnalizacji międzykomórkowej w populacjach rozdzielonych membraną - możliwość wymiany białek regulatorowych i przekazywanie sygnałów między komórkami. Zbadano odpowiedź w komórkach nie poddanych bezpośrednio działaniu erastyny (efekt sąsiedztwa).

Keratynocyty HaCaT, ko-inkubowane z melanomą 451Lu (w czwartym stadium zaawansowania nowotworu) wykazywały wzrost ekspresji TFRC przy dawce erastyny 5  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$  (Rysunek 36.A). Natomiast w przypadku komórek 451Lu, ekspresja została wyciszona (Rysunek 36.A).

Komórki HaCaT ko-inkubowane z melanomą w pierwszym stadium zaawansowania (1205Lu), wykazały niewielki wzrost ekspresji genu TFRC (Rysunek 36.B). Natomiast komórki czerniaka, po zastosowaniu induktora ferroptozy w badanych dawkach, wykazały ekspresję zbliżoną do poziomu kontrolnego.

Komórki prawidłowych keratynocytów (HaCaT), które były ko-inkubowane z melanomą w czwartym stadium zaawansowania nowotworu (451Lu) wykazują spadek poziomu relatywnej ekspresji ACSL4 przy niższej dawce 5  $\mu\text{M}$ , natomiast

przy dawce 10  $\mu\text{M}$  obserwowany jest wzrost (Rysunek 37A). Może to świadczyć o większej oporności na ferroptozę komórek prawidłowych przy niższej dawce erastyny, jednakże przy dawce 10  $\mu\text{M}$  stają się one bardziej wrażliwe na indukcję śmierci. Poziom *ACSL4* w komórkach nowotworowych 451Lu przy dawce zarówno 5  $\mu\text{M}$ , jak i 10  $\mu\text{M}$  spada do poziomu zerowego. Całkowite wyciszenie ekspresji tego genu może świadczyć o tym, że komórki czerniaka 451Lu są odporne na ferroptozę.

Ko-inkubowane z melanomą w pierwszym stadium (1205Lu) komórki prawidłowych keratynocytów (HaCaT), wykazują wzrost relatywnej ekspresji genu *ACSL4* korelujący z dawką erastyny (Rysunek 37.B). Świadczy to prawdopodobnie o przekazaniu przez komórki czerniaka bodźców powodujących włączenie śmierci komórkowej związanej z akumulacją produktów peroksydacji lipidów w ko-inkubowanych komórkach prawidłowych HaCaT. Poziom ekspresji *ACSL4* w komórkach 1205Lu przy dawce 5  $\mu\text{M}$  wykazuje niewielki spadek natomiast przy dawce 10  $\mu\text{M}$  obserwowany jest nieznaczny wzrost. Oznacza to, że komórki melanomy 1205Lu wykazują większą wrażliwość na ferroptozę.

W prawidłowych komórkach skóry HaCaT, ko-inkubowanych z komórkami melanomy w czwartym stadium zaawansowania nowotworu 451Lu zauważono prawie dwukrotny wzrost ekspresji tego genu przy dawce erastyny 5  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$  (Rysunek 38.A). Wzrost ten oznacza, że białko supresorowe FSP1 wykazuje działanie hamujące peroksydację lipidów i ferroptozę, świadcząc o oporność keratynocytów na ten rodzaj śmierci. W przypadku komórek 451Lu ekspresji genu *FSP1* przy obu zastosowanych dawkach znacznie spada.

Komórki prawidłowych keratynocytów HaCaT, ko-inkubowanych z melanomą w pierwszym stadium zaawansowania nowotworu 1205Lu (Rysunek 38.B), podobnie jak w przypadku ko-inkubacji z 451Lu, wykazują znaczny wzrost poziomu ekspresji genu *FSP1*. Natomiast komórki melanomy 1205Lu w porównaniu do poziomu ekspresji tego genu w próbie kontrolnej, wykazały jego spadek przy obu dawkach erastyny (Rysunek 7.B).

Porównanie wyników uzyskanych dla każdej linii osobno (Tabela 4) z wynikami z eksperymentu Bystander (Tabela 7) ukazuje wzrost ekspresji genów markerowych w komórkach HaCaT, które ekspresje tych genów same miały

wyciszoną lub równą zero. Wyniki te pokazują jak komunikacja między komórkami i transdukcja sygnału może wpłynąć na zmianę profilu ekspresji w komórkach opornych na ferroptozę.

Wyniki uzyskane z bazy danych FerrDB pokazują interakcje poszczególnych genów w komórce. Można zauważyć, jaki wpływ wywierają dane geny przy ekspresji, co regulują oraz jak same są regulowane. *SLC7A11* jest genem supresorowym ferroptozy oraz peroksydacji lipidów, natomiast może odpowiadać za promowanie biosyntezy glutationu, poprzez dostarczanie cystyny do komórki. Podobnie w przypadku *GPX4*, jest regulowany przez ilość glutationu oraz przez czynnik jądrowy *NRF2*, a sam jest odpowiedzialny za inhibicję, m. in. ferroptozy czy peroksyację lipidów.

Na podstawie tabeli 4-6 oraz danych literaturowych wyznaczono zależności, że komórki odporne charakteryzują się zwiększona ekspresją *PROM2*, *GPX4* oraz *FSP1* jak również brakiem ekspresji *SLC7A11* (Rys. 42), co czynić je może markerami oporności [57,105]. Natomiast w przypadku linii wrażliwych markerami są *ACSL4*, *TFRC*, *SLC7A11* *TRX* czy *IRP2* (Rys. 43) ekspresjonowane w górę oraz brak ekspresji *PROM2* [26,107].

## 6. Podsumowanie

Celem pracy było scharakteryzowanie różnych ścieżek śmierci komórkowych oraz próba stworzenia systemu decyzyjnego regulacji ich indukcji/wyciszenia. Ponadto sprawdzono czy modyfikacje genetyczne, prowadzące do uzyskania niefunkcjonalnego białka, wpływają na zmianę wrażliwości komórek na indukcję ferroptozy. Sprawdzono, czy wpływa na to również ko-inkubacja komórek wrażliwych z opornymi. Na podstawie uzyskanych wyników stworzono tablice decyzyjne pomagające w określeniu wrażliwości lub oporności komórek na indukcję ferroptozy.

Różne linie komórkowe odpowiadają inaczej na induktor ferroptozy – erastynę. Wyniki z przeprowadzonych badań potwierdziły przypuszczenia, że linia keratynocytów i ostrej białaczki są odporne na indukcję śmierci; potwierdziły również wrażliwość komórek czerniaka 1205Lu. Dodając erastynę do komórek wrażliwych obserwowano wzrost ekspresji kluczowych genów w ścieżce śmierci, takich jak *ACSL4*, *TFRC* czy *SLC7A11*, czyniąc komórki wrażliwymi na ten rodzaj śmierci. Z kolei, wzrost ekspresji genów *FSP1*, jak i *PROM2* jest charakterystyczny dla komórek opornych. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują na oporność HaCaT i K562 oraz wrażliwość linii 1205Lu *in vitro*. Wyniki dla fibroblastów oraz komórek raka płuc są do siebie zbliżone i odpowiedź zarówno jednej, jak i drugiej linii sugeruje ich ferroptozo-wrażliwość.

Zastosowanie ko-inkubacji pozwoliło zbadać szlak wzajemnej wymiany sygnałów pomiędzy komórkami. Komórki wykazujące oporność (HaCaT) po inkubacji z komórkami wrażliwymi (1205Lu i 451Lu) zaczęły zachowywać się jak wrażliwe, a komórki czerniaka (1205Lu) wykazały większą oporność. Wyniki te potwierdzają możliwość przepływu cząsteczek sygnałowych między komórkami będącymi w bezpośrednim kontakcie z induktorami, a komórkami będącymi w kontakcie pośrednio. Regulacja przełączania typów śmierci daje wiele możliwości w zastosowaniach klinicznych, jako wspomaganie terapii już stosowanych, a także, jako terapia celowana.

Poznanie mechanizmów przełączania śmierci jest kluczowym aspektem terapii w przyszłości. Zarówno możliwość włączenia śmierci, jak i wyłączenia



w konkretnym rodzaju komórek daje możliwości terapii celowanych, zapobiegając tym samym uszkodzeniom tkanki otaczającej [1 2].

Inżynieria biomedyczna jest szybko rozwijającą się dziedziną, która koncentruje się na wspomaganiu medycyny i lekarzy. Koncentruje się ona głównie na projektowaniu, rozwoju i analizie urządzeń medycznych czy systemów. Takim urządzeniem może być sztuczna kończyna czy nawet molekularny test diagnostyczny ułatwiający pracę lekarza. Inżynierowie biomedyczni skupiają się w dużej mierze na projektowaniu urządzeń lub ich ulepszaniu. Ma to na celu wspomaganie lekarzy w diagnozowaniu, leczeniu pacjentów czy zapobieganiu chorobom. Jedną z poddziedzin inżynierii biomedycznej jest inżynieria genetyczna i tkankowa. Pierwsza skupia się na manipulacji genami organizmu, wykorzystując takie metody, jak klonowanie i transformacja molekularna w celu zmiany sekwencji docelowych genów. Jedną z takich nowatorskich metod jest CRISPR/Cas umożliwiającą precyzyjne manipulacje w obrębie genu, umożliwia to naprawę/wyłączenie/wzmacnianie uszkodzonych genów, np. w komórkach nowotworowych. Z kolei inżynieria tkankowa służy do tworzenia sztucznych narządów, czy też wytwarzania ekwiwalentów narządów, np. skóry (model hodowli 3D), która jest bardziej zbliżona do skóry ludzkiej, niż skóra myszy. Modele te mogą dać odpowiedzi na stosowane leki, zarówno z komórek na powierzchni, jak i tych znajdujących się wewnątrz modelu eksperymentalnego.

Wyniki uzyskane podczas doktoratu, mogą posłużyć w dalszych badaniach do utworzenia modelu matematycznego regulacji ścieżek śmierci, rozbudowy przedstawionego modelu decyzyjnego, aż do testu molekularnego ułatwiającego odnalezienie przyczyny obumierania komórek, czy wyboru czynnika indukującego śmierć komórek.

## 7. Spis tabel

TABELA 1 LINIE KOMÓRKOWE WYKORZYSTANE W BADANIACH.....	46
TABELA 2 SEKWENCJE PRIMERÓW UŻYTYCH W REAKCJI RT-QPCR.....	53
TABELA 3 INTERPRETACJA POZIOMU KORELACJI.....	64
TABELA 4 TABLICA DECYZYJNA DLA KOMÓREK SKÓRY.....	107
TABELA 5 TABLICA DECYZYJNA DLA LINI P53 +/- I P53 -/-.....	108
TABELA 6 TABLICA DECYZYJNA DLA KOMÓRKE NABŁONKOWYCH.....	109
TABELA 7 TABLICA DECYZYJNA DLA KOMÓREK BY STENDER.....	110

## 8. Spis rysunków

<b>RYSUNEK 1.</b> SZLAKI POWSTAWANIA RFT ORAZ PEROKSYDACJI LIPIDÓW W KOMÓRKACH, NA PODSTAWIE [9]. WYKONANO W BIORENDER.COM.....	23
<b>RYSUNEK 2</b> WZÓR STRUKTURALNY ERASTYNY [147]. .....	48
<b>RYSUNEK 3</b> PROTOKÓŁ TEMPERATUROWY REAKCJI RT-QPCR Z PROGRAMU CFX MAESTRO 1.1 FIRMY BIO-RAD. ....	53
<b>RYSUNEK 4</b> SCHEMAT EKSPERYMENTU KO-INKUBACJI DO BADANIA SYGNALIZACJI MIĘDZYKOMÓRKOWEJ. UTWORZONO ZA POMOCĄ BIORENDER.COM. ....	60
<b>RYSUNEK 5</b> ŻYWOTNOŚĆ KOMÓREK 24 GODZINY PO DODANIU INDUKTORA FERROPTOZY, ERASTYNY W DWÓCH DAWKACH 5 I 10 $\mu$ M; TEST MTT. WARTOŚCI PRZEDSTAWIONO JAKO ŚREDNIĄ $\pm$ ODCHYLENIE STANDARDOWE. ISTOTNOŚĆ STATYSTYCZNĄ OZNACZONO “**”, PRZY WARTOŚCI $P<0,05$ .....	66
<b>RYSUNEK 6</b> CYTOMETRYCZNA ANALIZA CYKLU KOMÓRKOWEGO, 24 GODZINY PO DODANIU INDUKTORA FERROPTOZY, ERASTYNY W DWÓCH DAWKACH, 5 I 10 $\mu$ M. WARTOŚCI PRZEDSTAWIONO, JAKO ŚREDNIĄ $\pm$ ODCHYLENIE STANDARDOWE. ....	68
<b>RYSUNEK 7</b> CYTOMETRYCZNA ANALIZA POZIOMU APOPTOZY I NEKROZY W KOMÓRKACH 24 GODZINY PO DODANIU INDUKTORA FERROPTOZY, ERASTYNY W DWÓCH DAWKACH, 5 I 10 $\mu$ M. WARTOŚCI PRZEDSTAWIONO, JAKO ŚREDNIĄ $\pm$ ODCHYLENIE STANDARDOWE. ....	69
<b>RYSUNEK 8</b> POZIOM REAKTYWNYCH FORM TLENU W BADANYCH LINIACH PO INDUKCJI ŚMIERCI KOMÓRKOWEJ ERASTYNĄ W DWÓCH DAWKACH 5 I 10 $\mu$ M. WARTOŚCI PRZEDSTAWIONO JAKO ŚREDNIĄ $\pm$ ODCHYLENIE STANDARDOWE. ISTOTNOŚĆ STATYSTYCZNĄ OZNACZONO “**”, PRZY WARTOŚCI $P<0,05$ .....	70
<b>RYSUNEK 9</b> POZIOM ANIONORODNIKA PONADTLENKOWEGO 24 GODZINY PO DODANIU INDUKTORA FERROPTOZY, ERASTYNY W DWÓCH DAWKACH 5 I 10 $\mu$ M. WARTOŚCI PRZEDSTAWIONO JAKO ŚREDNIĄ $\pm$ ODCHYLENIE STANDARDOWE. ISTOTNOŚĆ STATYSTYCZNĄ OZNACZONO “**”, PRZY WARTOŚCI $P<0,05$ .....	71
<b>RYSUNEK 10</b> POZIOM TLENKU AZOTU 24 GODZINY PO DODANIU INDUKTORA FERROPTOZY, ERASTYNY W DWÓCH DAWKACH 5 I 10 $\mu$ M. WARTOŚCI PRZEDSTAWIONO JAKO ŚREDNIĄ $\pm$ ODCHYLENIE STANDARDOWE. ISTOTNOŚĆ STATYSTYCZNĄ OZNACZONO “**”, PRZY WARTOŚCI $P<0,05$ .....	72
<b>RYSUNEK 11</b> SCHEMAT FERROPTOTYCZNEGO SZLAKU PEROKSYDACJI LIPIDÓW. NA PODSTAWIE [165,166], UTWORZONO ZA POMOCĄ BIORENDER.COM.....	73
<b>RYSUNEK 12</b> POZIOM MRNA <i>TFRC</i> W KOMÓRKACH 24 GODZINY PO DODANIU INDUKTORA FERROPTOZY, ERASTYNY W DWÓCH DAWKACH, 5 I 10 $\mu$ M. WARTOŚCI PRZEDSTAWIONO JAKO ŚREDNIĄ $\pm$ ODCHYLENIE STANDARDOWE. ISTOTNOŚĆ STATYSTYCZNĄ OZNACZONO “**”, PRZY WARTOŚCI $P<0,05$ .....	75
<b>RYSUNEK 13</b> BARWIENIE BŁĘKITEM PRUSKIM ŻELAZA W KOMÓRKACH HACAT. KONTROLA (A), PO DAWCE ERASTYNY 5 $\mu$ M (B), PO DAWCE 10 $\mu$ M (C). ŻELAZO	

WYBARWIONE NA KOLOR JASNONIEBIESKI, JĄDRA - CZERWONY, CYTOPLAZMA KOMÓRKI - RÓŻOWY.....	76
<b>RYSUNEK 14</b> BARWIENIE BŁĘKITEM PRUSKIM ŻELAZA W KOMÓRKACH 1205LU. KONTROLA (A), PO DAWCE ERASTYNY 5 $\mu$ M (B), PO DAWCE 10 $\mu$ M (C). ŻELAZO WYBARWIONE NA KOLOR JASNONIEBIESKI, JĄDRA - CZERWONY, CYTOPLAZMA KOMÓRKI - RÓŻOWY.....	76
<b>RYSUNEK 15</b> POZIOM MRNA <i>ACSL4</i> W KOMÓRKACH 24 GODZINY PO DODANIU INDUKTORA FERROPTOZY, ERASTYNY W DWÓCH DAWKACH, 5 I 10 $\mu$ M. WARTOŚCI PRZEDSTAWIONO JAKO ŚREDNIĄ $\pm$ ODCHYLENIE STANDARDOWE. ISTOTNOŚĆ STATYSTYCZNĄ OZNACZONO “**”, PRZY WARTOŚCI P<0,05.....	78
<b>RYSUNEK 16</b> POZIOM MRNA <i>FSP1</i> W KOMÓRKACH 24 GODZINY PO DODANIU INDUKTORA FERROPTOZY, ERASTYNY W DWÓCH DAWKACH 5 I 10 $\mu$ M. WARTOŚCI PRZEDSTAWIONO JAKO ŚREDNIĄ $\pm$ ODCHYLENIE STANDARDOWE. ISTOTNOŚĆ STATYSTYCZNĄ OZNACZONO “**”, PRZY WARTOŚCI P<0,05.....	80
<b>RYSUNEK 17</b> POZIOM MRNA <i>PROM2</i> W KOMÓRKACH 24 GODZINY PO DODANIU INDUKTORA FERROPTOZY, ERASTYNY W DWÓCH DAWKACH, 5 I 10 $\mu$ M. WARTOŚCI PRZEDSTAWIONO JAKO ŚREDNIĄ $\pm$ ODCHYLENIE STANDARDOWE. ISTOTNOŚĆ STATYSTYCZNĄ OZNACZONO “**”, PRZY WARTOŚCI P<0,05.....	81
<b>RYSUNEK 18</b> SZLAK BLOKADY ANTYPORTERA CYSTEINOWO/GLUTAMINOWEGO W KOMÓRCIE. UTWORZONO ZA POMOCĄ BIORENDER.COM.....	82
<b>RYSUNEK 19</b> POZIOM MRNA <i>SLC7A11</i> W KOMÓRKACH 24 GODZINY PO DODANIU INDUKTORA FERROPTOZY, ERASTYNY W DWÓCH DAWKACH, 5 I 10 $\mu$ M. WARTOŚCI PRZEDSTAWIONO JAKO ŚREDNIĄ $\pm$ ODCHYLENIE STANDARDOWE. ISTOTNOŚĆ STATYSTYCZNĄ OZNACZONO “**”, PRZY WARTOŚCI P<0,05.....	83
<b>RYSUNEK 20</b> POZIOM MRNA <i>GPX4</i> W KOMÓRKACH 24 GODZINY PO DODANIU INDUKTORA FERROPTOZY, ERASTYNY W DWÓCH DAWKACH, 5 I 10 $\mu$ M. WARTOŚCI PRZEDSTAWIONO JAKO ŚREDNIĄ $\pm$ ODCHYLENIE STANDARDOWE. ISTOTNOŚĆ STATYSTYCZNĄ OZNACZONO “**”, PRZY WARTOŚCI P<0,05.....	85
<b>RYSUNEK 21</b> SZLAK TARCZY TIOREDOSKYNOWEJ W KOMÓRCIE.....	86
<b>RYSUNEK 22</b> POZIOM MRNA <i>TRX</i> W KOMÓRKACH 24 GODZINY PO DODANIU INDUKTORA FERROPTOZY, ERASTYNY W DWÓCH DAWKACH, 5 I 10 $\mu$ M. WARTOŚCI PRZEDSTAWIONO JAKO ŚREDNIĄ $\pm$ ODCHYLENIE STANDARDOWE. ISTOTNOŚĆ STATYSTYCZNĄ OZNACZONO “**”, PRZY WARTOŚCI P<0,05.....	87
<b>RYSUNEK 23</b> POZIOM MRNA <i>TRXR</i> D W KOMÓRKACH 24 GODZINY PO DODANIU INDUKTORA FERROPTOZY, ERASTYNY W DWÓCH DAWKACH, 5 I 10 $\mu$ M. WARTOŚCI PRZEDSTAWIONO JAKO ŚREDNIĄ $\pm$ ODCHYLENIE STANDARDOWE. ISTOTNOŚĆ STATYSTYCZNĄ OZNACZONO “**”, PRZY WARTOŚCI P<0,05.....	88
<b>RYSUNEK 24</b> POZIOM MRNA <i>IRP2</i> W KOMÓRKACH 24 GODZINY PO DODANIU INDUKTORA FERROPTOZY, ERASTYNY W DWÓCH DAWKACH, 5 I 10 $\mu$ M. WARTOŚCI PRZEDSTAWIONO JAKO ŚREDNIĄ $\pm$ ODCHYLENIE STANDARDOWE. ISTOTNOŚĆ STATYSTYCZNĄ OZNACZONO “**”, PRZY WARTOŚCI P<0,05.....	89
<b>RYSUNEK 25</b> POZIOM MRNA <i>NRF2</i> W KOMÓRKACH 24 GODZINY PO DODANIU INDUKTORA FERROPTOZY, ERASTYNY W DWÓCH DAWKACH, 5 I 10 $\mu$ M. WARTOŚCI PRZEDSTAWIONO JAKO ŚREDNIĄ $\pm$ ODCHYLENIE STANDARDOWE. ISTOTNOŚĆ STATYSTYCZNĄ OZNACZONO “**”, PRZY WARTOŚCI P<0,05.....	91
<b>RYSUNEK 26</b> POZIOM BIAŁKA GPX4 W KOMÓRKACH 24 GODZINY PO DODANIU INDUKTORA FERROPTOZY, ERASTYNY W DWÓCH DAWKACH, 5 I 10 $\mu$ M. WARTOŚCI PRZEDSTAWIONO JAKO ŚREDNIĄ $\pm$ ODCHYLENIE STANDARDOWE. ISTOTNOŚĆ STATYSTYCZNĄ OZNACZONO “**”, PRZY WARTOŚCI P<0,05.....	92
<b>RYSUNEK 27</b> POZIOM BIAŁKA <i>FACL4</i> W KOMÓRKACH 24 GODZINY PO DODANIU INDUKTORA FERROPTOZY, ERASTYNY W DWÓCH DAWKACH, 5 I 10 $\mu$ M. WARTOŚCI	

PRZEDSTAWIONO JAKO ŚREDNIĄ ± ODCHYLENIE STANDARDOWE. ISTOTNOŚĆ STATYSTYCZNĄ OZNACZONO “*”, PRZY WARTOŚCI P<0,05.....	93
<b>RYSUNEK 28</b> POZIOM TOTALNEGO GLUTATIONU 24 GODZINY PO DODANIU ERASTYNY W DWÓCH DAWKACH, 5 I 10 µM. W KOMÓRKACH HACAT (A) I 1205LU (B). WARTOŚCI PRZEDSTAWIONO JAKO ŚREDNIĄ ± ODCHYLENIE STANDARDOWE. ISTOTNOŚĆ STATYSTYCZNĄ OZNACZONO “*”, PRZY WARTOŚCI P<0,05.....	94
<b>RYSUNEK 29</b> POZIOM POTENCJAŁU MITOCHONDRIALNEGO, 24 GODZINY PO DODANIU ERASTYNY W DWÓCH DAWKACH 5 I 10 µM. W KOMÓRKACH HACAT (A) I 1205LU (B). WARTOŚCI PRZEDSTAWIONO JAKO ŚREDNIĄ ± ODCHYLENIE STANDARDOWE. ISTOTNOŚĆ STATYSTYCZNĄ OZNACZONO “*”, PRZY WARTOŚCI P<0,05.....	95
<b>RYSUNEK 30</b> POZIOM MACY MITOCHONDRIALNEJ, 24 GODZINY PO DODANIU ERASTYNY W DWÓCH DAWKACH, 5 I 10 µM. W KOMÓRKACH HACAT (A) I 1205LU (B). WARTOŚCI PRZEDSTAWIONO JAKO ŚREDNIĄ ± ODCHYLENIE STANDARDOWE. ISTOTNOŚĆ STATYSTYCZNĄ OZNACZONO “*”, PRZY WARTOŚCI P<0,05.....	96
<b>RYSUNEK 31</b> MORFOLOGIA TEM I USZKODZENIA W KOMÓRKACH HACAT 24 GODZINY PO PODANIU ERASTYNY. KONTROLA (A), 5 µM ERASTYNY (B), 10 µM ERASTYNY (C). WAKUOLIZACJA C.1, DEGRADACJA KRIST C.3 I MITOFAGIA B.1, C.2.....	97
<b>RYSUNEK 32</b> MORFOLOGIA TEM I USZKODZENIA W 1205LU 24 GODZINY PO PODANIU ERASTYNY. KONTROLA (A), 5 µM ERASTYNY (B I C), 10 µM ERASTYNY (D I E). WAKUOLIZACJA B.1, C.2, D.1, DEGRADACJA CRISTAE C.1 I MITOFAGIA C.2, E.2. ....	98
<b>RYSUNEK 33</b> PEROKSYDACJA LIPIDÓW W KOMÓRKACH HACAT (A I C) ORAZ 1205LU (B I D) PRZY DAWCE 5 µM I 10 µM ERASTYNY W CZASIE (A I B), WIZUALIZACJA 24 GODZINY PO PODANIU (C I D).....	99
<b>RYSUNEK 34</b> PEROKSYDACJA LIPIDÓW W KOMÓRKACH HCT116 P53+/(A I C) ORAZ HCT116 P53-/- (B I D) PRZY DAWCE 5 µM I 10 µM ERASTYNY W CZASIE (A I B), WIZUALIZACJA 24 GODZINY PO PODANIU (C I D).....	100
<b>RYSUNEK 35</b> DETEKCCJA BIAŁEK GPX4 I REFERENCYJNEJ AKTYNY TECHNIKĄ WESTERN BLOT.....	100
<b>RYSUNEK 36</b> ŻYWOTNOŚĆ KOMÓREK 48 GODZINY PO PODANIU INDUKTORA FERROPTOZY, ERASTYNY W DWÓCH DAWKACH, 5 I 10 µM; TEST MTS DO KOMÓREK HACAT GPX4 KO. WARTOŚCI PRZEDSTAWIONO JAKO ŚREDNIĄ ± ODCHYLENIE STANDARDOWE. ISTOTNOŚĆ STATYSTYCZNĄ OZNACZONO “*”, PRZY WARTOŚCI P<0,05.....	101
<b>RYSUNEK 37</b> PEROKSYDACJA LIPIDÓW W KOMÓRKACH HACAT GPX4 KO, KONTROLA (K) PRZY DAWCE 5 µM (5) I 10 µM ERASTYNY (10) 48 GODZINY PO PODANIU. ZDJĘCIA REJESTROWANO W KANALE WIDZIALNYM (A), GFP (DLA BIAŁEK OKSYDOWANYCH, B) ORAZ RFP (DLA BIAŁEK ZREDUKOWANYCH, C). ....	102
<b>RYSUNEK 38</b> POZIOM MRNA GENÓW MARKEROWYCH W KOMÓRKACH HACAT GPX4 KO PO PODANIU ERASTYNY W DWÓCH DAWKACH 5 I 10 µM. <i>TFRC</i> (A), <i>ACSL4</i> (B), <i>NRF2</i> (C) I <i>PROM2</i> (D).....	103
<b>RYSUNEK 39</b> ZMIANY EKSPRESJI GENU RECEPTORA TRANSFERYNY <i>TFRC</i> , SPRZYJAJĄCEGO FERROPTOZIE, W KOMÓRKACH HACAT KO-INKUBOWANYCH Z KOMÓRKAMI 451LU (A) ORAZ KOMÓRKACH HACAT KO-INKUBOWANYCH Z KOMÓRKAMI 1205LU (B), 72 H PO DODANIU INDUKTORA FERROPTOZY, ERASTYNY. ....	104
<b>RYSUNEK 40</b> ZMIANY EKSPRESJI GENU <i>ACSL4</i> , BĘDĄCEJ MARKEREM FERROPTOZY W KOMÓRKACH HACAT KO-INKUBOWANYCH Z KOMÓRKAMI 451LU (A) ORAZ KOMÓRKACH HACAT KO-INKUBOWANYCH Z KOMÓRKAMI 1205LU (B), 72 GODZINY PO DODANIU INDUKTORA FERROPTOZY, ERASTYNY.....	105
<b>RYSUNEK 41.</b> ZMIANY EKSPRESJI GENU <i>FSP1</i> , BĘDĄCEGO BIAŁKIEM SUPRESOROWYM FERROPTOZY W KOMÓRKACH HACAT KO-INKUBOWANYCH Z KOMÓRKAMI 451LU (A)	

ORAZ KOMÓRKACH HACAT KO-INKUBOWANYCH Z KOMÓRKAMI 1205LU (B), 72 GODZINY PO DODANIU INDUKTORA FERROPTOZY, ERASTYNY.....	106
<b>RYSUNEK 42</b> SCHEMAT ZMIAN AKTYWNOŚCI WYBRANYCH GENÓW CHARAKTERYSTYCZNYCH DLA FERROPTOZY W KOMÓRKACH OPORNYCH. ....	110
<b>RYSUNEK 43</b> SCHEMAT ZMIAN AKTYWNOŚCI WYBRANYCH GENÓW CHARAKTERYSTYCZNYCH DLA FERROPTOZY W KOMÓRKACH WRAŻLIWYCH. ....	111
<b>RYSUNEK 44</b> SIEĆ ZALEŻNOŚCI REGULACYJNYCH POMIĘDZY GENAMI <i>SLC7A11</i> I <i>GPX4</i> , .....	112
<b>RYSUNEK 45</b> SIEĆ ZALEŻNOŚCI REGULACYJNYCH POMIĘDZY GENEM <i>ACSL4</i> , A FERROPTOZĄ.....	113
<b>RYSUNEK 46</b> SIEĆ ZALEŻNOŚCI REGULACYJNYCH POMIĘDZY GENEM <i>NCOA4</i> , A FERROPTOZĄ.....	114
<b>RYSUNEK 47</b> SIEĆ ZALEŻNOŚCI REGULACYJNYCH POMIĘDZY <i>IREB2</i> , A FERROPTOZĄ. .....	115
<b>RYSUNEK 48</b> SIEĆ ZALEŻNOŚCI REGULACYJNYCH POMIĘDZY <i>ACSL4</i> I <i>TFRC</i> . ....	116
<b>RYSUNEK 49</b> SCHEMAT WZAJEMNEGO ODDZIAŁYWANIA PRZEBADANYCH W PRACY CZYNNIKÓW DLA ŚCIEŻKI ŚMIERCI, FERROPTOZY.....	118

## 9. Bibliografia

- Galluzzi, L.; Vitale, I.; Aaronson, S.A.; Abrams, J.M.; Adam, D.; Agostinis, P.; Alnemri, E.S.; Altucci, L.; Amelio, I.; Andrews, D.W.; et al. Molecular Mechanisms of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* **2018**, *25*, 486–541, doi:10.1038/s41418-017-0012-4.
- Fuchs, Y.; Steller, H. Live to Die Another Way: Modes of Programmed Cell Death and the Signals Emanating from Dying Cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2015**, *16*, 329–344, doi:10.1038/nrm3999.
- Fuchs, Y.; Steller, H. Programmed Cell Death in Animal Development and Disease. *Cell* **2011**, *147*, 742–758, doi:10.1016/j.cell.2011.10.033.
- Tang, D.; Kang, R.; Berghe, T.V.; Vandenabeele, P.; Kroemer, G. The Molecular Machinery of Regulated Cell Death. *Cell Research* **2019**, *29*, 347–364, doi:10.1038/s41422-019-0164-5.
- Galluzzi, L.; Maiuri, M.C.; Vitale, I.; Zischka, H.; Castedo, M.; Zitvogel, L.; Kroemer, G. Cell Death Modalities: Classification and Pathophysiological Implications. *Cell Death & Differentiation* **2007**, *14*, 1237–1243, doi:10.1038/sj.cdd.4402148.
- Yuan, J.; Kroemer, G. Alternative Cell Death Mechanisms in Development and Beyond. *Genes Dev.* **2010**, *24*, 2592–2602, doi:10.1101/gad.1984410.
- Finkel, T. Signal Transduction by Reactive Oxygen Species. *J Cell Biol* **2011**, *194*, 7–15, doi:10.1083/jcb.201102095.
- Matyska-Piekarska, E.; Łuszczewski, A.; Łącki, J.; Wawer, I. The Role of Oxidative Stress in the Etiopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Postepy Hig Med Dosw* **2006**, *60*.
- Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.D.; Mazur, M.; Telser, J. Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2007**, *39*, 44–84, doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001.
- 8.2.2: Biological Redox Components Available online:  
[https://chem.libretexts.org/Courses/Saint\\_Marys\\_College\\_Notre\\_Dame\\_IN/CHEM\\_342%3A\\_Bio-inorganic\\_Chemistry/Readings/Week\\_8%3A\\_LFT\\_continued...Electronic\\_Properties/8.2%3A\\_Redox\\_and\\_Electron\\_Transfer/8.2.2%3A\\_Biological\\_Redox\\_Component](https://chem.libretexts.org/Courses/Saint_Marys_College_Notre_Dame_IN/CHEM_342%3A_Bio-inorganic_Chemistry/Readings/Week_8%3A_LFT_continued...Electronic_Properties/8.2%3A_Redox_and_Electron_Transfer/8.2.2%3A_Biological_Redox_Component)  
s (accessed on 24 January 2021).

11. Olson, T.L.; Williams, J.C.; Allen, J.P. Influence of Protein Interactions on Oxidation/Reduction Midpoint Potentials of Cofactors in Natural and de Novo Metalloproteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2013**, *1827*, 914–922, doi:10.1016/j.bbabi.2013.02.014.
12. Prabhulkar, S.; Tian, H.; Wang, X.; Zhu, J.-J.; Li, C.-Z. Engineered Proteins: Redox Properties and Their Applications. *Antioxid Redox Signal* **2012**, *17*, 1796–1822, doi:10.1089/ars.2011.4001.
13. Dröge, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews* **2002**, *82*, 47–95, doi:10.1152/physrev.00018.2001.
14. Outten, F.W.; Theil, E.C. Iron-Based Redox Switches in Biology. *Antioxid Redox Signal* **2009**, *11*, 1029–1046, doi:10.1089/ars.2008.2296.
15. Kiley, P.J.; Storz, G. Exploiting Thiol Modifications. *PLoS Biol* **2004**, *2*, e400, doi:10.1371/journal.pbio.0020400.
16. Commoner, B.; Townsend, J.; Pake, G.E. Free Radicals in Biological Materials. *Nature* **1954**, *174*, 689–691, doi:10.1038/174689a0.
17. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*; Oxford University Press, 2015; ISBN 978-0-19-871748-5.
18. Lobo, V.; Patil, A.; Phatak, A.; Chandra, N. Free Radicals, Antioxidants and Functional Foods: Impact on Human Health. *Pharmacogn Rev* **2010**, *4*, 118–126, doi:10.4103/0973-7847.70902.
19. Muscoli, C.; Cuzzocrea, S.; Riley, D.P.; Zweier, J.L.; Thiemermann, C.; Wang, Z.-Q.; Salvemini, D. On the Selectivity of Superoxide Dismutase Mimetics and Its Importance in Pharmacological Studies. *Br J Pharmacol* **2003**, *140*, 445–460, doi:10.1038/sj.bjp.0705430.
20. Cheeseman, K.H.; Slater, T.F. An Introduction to Free Radical Biochemistry. *Br Med Bull* **1993**, *49*, 481–493, doi:10.1093/oxfordjournals.bmb.a072625.
21. Ayala, A.; Muñoz, M.F.; Argüelles, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev* **2014**, *2014*, 360438, doi:10.1155/2014/360438.
22. Czajka, A. WOLNE RODNIKI TLENOWE A MECHANIZMY OBRONNE ORGANIZMU. 6.
23. Auten, R.L.; Davis, J.M. Oxygen Toxicity and Reactive Oxygen Species: The Devil Is in the Details. *Pediatr Res* **2009**, *66*, 121–127, doi:10.1203/PDR.0b013e3181a9eafb.
24. Juan, C.A.; Pérez de la Lastra, J.M.; Plou, F.J.; Pérez-Lebeña, E. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 4642, doi:10.3390/ijms22094642.
25. Stadtman, E.R.; Levine, R.L. Protein Oxidation. *Ann N Y Acad Sci* **2000**, *899*, 191–208, doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06187.x.
26. Kovacic, P.; Pozos, R.S.; Somanathan, R.; Shangari, N.; O'Brien, P.J. Mechanism of Mitochondrial Uncouplers, Inhibitors, and Toxins: Focus on Electron Transfer, Free Radicals, and Structure-Activity Relationships. *Current Medicinal Chemistry* *12*, 2601–2623.
27. Agregán, R.; Echegaray, N.; Pateiro, M.; Teixeira, A.; Pérez-Álvarez, J.Á.; Domínguez, R.; Aleu, G.; Lorenzo, J.M. Chapter 6 - Lipid Oxidation of Marine Oils. In *Food Lipids*; Lorenzo, J.M., Munekata, P.E.S., Pateiro, M., Barba, F.J., Domínguez, R., Eds.; Academic Press, 2022; pp. 105–125 ISBN 978-0-12-823371-9.
28. Rutkowski, R.; Pancewicz, S.A.; Rutkowski, K.; Rutkowska, J. [Reactive oxygen and nitrogen species in inflammatory process]. *Pol Merkur Lekarski* **2007**, *23*, 131–136.
29. Ługowski, M.; Saczko, J.; Kulbacka, J.; Banaś, T. [Reactive oxygen and nitrogen species]. *Pol Merkur Lekarski* **2011**, *31*, 313–317.

30. Martínez, M.C.; Andriantsitohaina, R. Reactive Nitrogen Species: Molecular Mechanisms and Potential Significance in Health and Disease. *Antioxid Redox Signal* **2009**, *11*, 669–702, doi:10.1089/ars.2007.1993.
31. Nordberg, J.; Arnér, E.S.J. Reactive Oxygen Species, Antioxidants, and the Mammalian Thioredoxin System1 1This Review Is Based on the Licentiate Thesis “Thioredoxin Reductase—Interactions with the Redox Active Compounds 1-Chloro-2,4-Dinitrobenzene and Lipoic Acid” by Jonas Nordberg, 2001, Karolinska Institute, Stockholm, ISBN 91-631-1064-4. *Free Radical Biology and Medicine* **2001**, *31*, 1287–1312, doi:10.1016/S0891-5849(01)00724-9.
32. Grist, G. Oxygen or Nitrogen: Which Is the Lesser of Two Evils? *J Extra Corpor Technol* **2013**, *45*, 61–63.
33. Benzie, I.F.F. Evolution of Dietary Antioxidants. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **2003**, *136*, 113–126, doi:10.1016/S1095-6433(02)00368-9.
34. Leopold, J.A. Antioxidants and Coronary Artery Disease: From Pathophysiology to Preventive Therapy. *Coron Artery Dis* **2015**, *26*, 176–183, doi:10.1097/MCA.000000000000187.
35. Saini, R.K.; Prasad, P.; Lokesh, V.; Shang, X.; Shin, J.; Keum, Y.-S.; Lee, J.-H. Carotenoids: Dietary Sources, Extraction, Encapsulation, Bioavailability, and Health Benefits—A Review of Recent Advancements. *Antioxidants (Basel)* **2022**, *11*, 795, doi:10.3390/antiox11040795.
36. Y, L.; He, S. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *The Journal of nutrition* **2007**, *137*, doi:10.1093/jn/137.10.2171.
37. Mustacich, D.J.; Bruno, R.S.; Traber, M.G. Vitamin E. *Vitam Horm* **2007**, *76*, 1–21, doi:10.1016/S0083-6729(07)76001-6.
38. Doll, S.; Freitas, F.P.; Shah, R.; Aldrovandi, M.; da Silva, M.C.; Ingold, I.; Goya Grocin, A.; Xavier da Silva, T.N.; Panzilius, E.; Scheel, C.H.; et al. FSP1 Is a Glutathione-Independent Ferroptosis Suppressor. *Nature* **2019**, *575*, 693–698, doi:10.1038/s41586-019-1707-0.
39. Ponnampalam, E.N.; Kiani, A.; Santhiravel, S.; Holman, B.W.B.; Lauridsen, C.; Dunshea, F.R. The Importance of Dietary Antioxidants on Oxidative Stress, Meat and Milk Production, and Their Preservative Aspects in Farm Animals: Antioxidant Action, Animal Health, and Product Quality—Invited Review. *Animals* **2022**, *12*, 3279, doi:10.3390/ani12233279.
40. Bebbber, C.M.; Müller, F.; Prieto Clemente, L.; Weber, J.; von Karstedt, S. Ferroptosis in Cancer Cell Biology. *Cancers (Basel)* **2020**, *12*, 164, doi:10.3390/cancers12010164.
41. Holmgren, A. Thioredoxin and Glutaredoxin Systems. *J Biol Chem* **1989**, *264*, 13963–13966.
42. Pizzorno, J. Glutathione! *Integr Med (Encinitas)* **2014**, *13*, 8–12.
43. Biswas, S.K.; Rahman, I. Environmental Toxicity, Redox Signaling and Lung Inflammation: The Role of Glutathione. *Mol Aspects Med* **2009**, *30*, 60–76, doi:10.1016/j.mam.2008.07.001.
44. Da, Q.; Wang, P.; Wang, M.; Sun, T.; Jin, H.; Liu, B.; Wang, J.; Grimm, B.; Wang, H.-B. Thioredoxin and NADPH-Dependent Thioredoxin Reductase C Regulation of Tetrapyrrole Biosynthesis. *Plant Physiol* **2017**, *175*, 652–666, doi:10.1104/pp.16.01500.
45. Miller, C.G.; Holmgren, A.; Arnér, E.S.J.; Schmidt, E.E. NADPH-Dependent and -Independent Disulfide Reductase Systems. *Free Radical Biology and Medicine* **2018**, *127*, 248–261, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.051.
46. Glutathione Reductase Mediates Drug Resistance in Glioblastoma Cells by Regulating Redox Homeostasis., doi:10.1111/jnc.14250.
47. Bilaska, A. Różne oblicza biologicznej roli glutationu. *Postepy Hig Med Dosw.*

48. Lee, S.; Kim, S.M.; Lee, R.T. Thioredoxin and Thioredoxin Target Proteins: From Molecular Mechanisms to Functional Significance. *Antioxid Redox Signal* **2013**, *18*, 1165–1207, doi:10.1089/ars.2011.4322.
49. Circu, M.L.; Aw, T.Y. REACTIVE OXYGEN SPECIES, CELLULAR REDOX SYSTEMS AND APOPTOSIS. *Free Radic Biol Med* **2010**, *48*, 749–762, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022.
50. Mustacich, D.; Powis, G. Thioredoxin Reductase. *Biochem J* **2000**, *346 Pt 1*, 1–8.
51. Arnér, E.S.; Holmgren, A. Physiological Functions of Thioredoxin and Thioredoxin Reductase. *Eur J Biochem* **2000**, *267*, 6102–6109, doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01701.x.
52. Lu, J.; Holmgren, A. The Thioredoxin Antioxidant System. *Free Radic Biol Med* **2014**, *66*, 75–87, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036.
53. Liu, Y.; Min, W. Thioredoxin Promotes ASK1 Ubiquitination and Degradation to Inhibit ASK1-Mediated Apoptosis in a Redox Activity-Independent Manner. *Circulation Research* **2002**, *90*, 1259–1266, doi:10.1161/01.RES.0000022160.64355.62.
54. Zhang, L.-L.; Tang, R.-J.; Yang, Y.-J. The Underlying Pathological Mechanism of Ferroptosis in the Development of Cardiovascular Disease. *Front Cardiovasc Med* **2022**, *9*, 964034, doi:10.3389/fcvm.2022.964034.
55. Yang, Y.; Sun, S.; Xu, W.; Zhang, Y.; Yang, R.; Ma, K.; Zhang, J.; Xu, J. Piperlongumine Inhibits Thioredoxin Reductase 1 by Targeting Selenocysteine Residues and Sensitizes Cancer Cells to Erastin. *Antioxidants (Basel)* **2022**, *11*, 710, doi:10.3390/antiox11040710.
56. Hendricks, J.M.; Doubravsky, C.; Wehri, E.; Li, Z.; Roberts, M.A.; Deol, K.; Lange, M.; Lasheras-Otero, I.; Dixon, S.J.; Bersuker, K.; et al. Identification of Structurally Diverse FSP1 Inhibitors That Sensitize Cancer Cells to Ferroptosis 2022, 2022.12.14.520445.
57. Bersuker, K.; Hendricks, J.M.; Li, Z.; Magtanong, L.; Ford, B.; Tang, P.H.; Roberts, M.A.; Tong, B.; Maimone, T.J.; Zoncu, R.; et al. The CoQ Oxidoreductase FSP1 Acts Parallel to GPX4 to Inhibit Ferroptosis. *Nature* **2019**, *575*, 688–692, doi:10.1038/s41586-019-1705-2.
58. Xavier da Silva, T.N.; Schulte, C.; Alves, A.N.; Maric, H.M.; Friedmann Angeli, J.P. Molecular Characterization of AIFM2/FSP1 Inhibition by IFSP1-like Molecules. *Cell Death Dis* **2023**, *14*, 1–9, doi:10.1038/s41419-023-05787-z.
59. Stockwell, B.R. Ferroptosis Turns 10: Emerging Mechanisms, Physiological Functions, and Therapeutic Applications. *Cell* **2022**, *185*, 2401–2421, doi:10.1016/j.cell.2022.06.003.
60. Imlay, J.A. Cellular Defenses against Superoxide and Hydrogen Peroxide. *Annu Rev Biochem* **2008**, *77*, 755–776, doi:10.1146/annurev.biochem.77.061606.161055.
61. Chiancone, E.; Ceci, P.; Ilari, A.; Ribacchi, F.; Stefanini, S. Iron and Proteins for Iron Storage and Detoxification. *Biometals* **2004**, *17*, 197–202, doi:10.1023/b:biom.0000027692.24395.76.
62. Feng, H.; Stockwell, B.R. Unsolved Mysteries: How Does Lipid Peroxidation Cause Ferroptosis? *PLOS Biology* **2018**, *16*, e2006203, doi:10.1371/journal.pbio.2006203.
63. Martemucci, G.; Costagliola, C.; Mariano, M.; D’andrea, L.; Napolitano, P.; D’Alessandro, A.G. Free Radical Properties, Source and Targets, Antioxidant Consumption and Health. *Oxygen* **2022**, *2*, 48–78, doi:10.3390/oxygen2020006.
64. Ostrea Jr., E.M.; Cepeda, E.E.; Fleury, C.A.; Balun, J.E. Red Cell Membrane Lipid Peroxidation and Hemolysis Secondary to Phototherapy. *Acta Paediatrica* **1985**, *74*, 378–381, doi:10.1111/j.1651-2227.1985.tb10987.x.
65. Marnett, L.J. Lipid Peroxidation—DNA Damage by Malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **1999**, *424*, 83–95, doi:10.1016/S0027-5107(99)00010-X.



66. Yadav, D.K.; Kumar, S.; Choi, E.-H.; Chaudhary, S.; Kim, M.-H. Molecular Dynamic Simulations of Oxidized Skin Lipid Bilayer and Permeability of Reactive Oxygen Species. *Sci Rep* **2019**, *9*, 4496, doi:10.1038/s41598-019-40913-y.
67. Repetto, M.; Semprine, J.; Boveris, A.; Repetto, M.; Semprine, J.; Boveris, A. Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination. In *Lipid Peroxidation*; IntechOpen, 2012 ISBN 978-953-51-0716-3.
68. Repetto, M.G.; Ossani, G.; Monserrat, A.J.; Boveris, A. Oxidative Damage: The Biochemical Mechanism of Cellular Injury and Necrosis in Choline Deficiency. *Exp Mol Pathol* **2010**, *88*, 143–149, doi:10.1016/j.yexmp.2009.11.002.
69. Sahin, E.; Gümüşlü, S. Stress-Dependent Induction of Protein Oxidation, Lipid Peroxidation and Anti-Oxidants in Peripheral Tissues of Rats: Comparison of Three Stress Models (Immobilization, Cold and Immobilization-Cold). *Clin Exp Pharmacol Physiol* **2007**, *34*, 425–431, doi:10.1111/j.1440-1681.2007.04584.x.
70. Yang, W.S.; Stockwell, B.R. Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. *Trends in Cell Biology* **2016**, *26*, 165–176, doi:10.1016/j.tcb.2015.10.014.
71. Galluzzi, L.; Vitale, I.; Abrams, J.M.; Alnemri, E.S.; Baehrecke, E.H.; Blagosklonny, M.V.; Dawson, T.M.; Dawson, V.L.; El-Deiry, W.S.; Fulda, S.; et al. Molecular Definitions of Cell Death Subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* **2012**, *19*, 107–120, doi:10.1038/cdd.2011.96.
72. Penalzoza, C.; Lin, L.; Lockshin, R.A.; Zakeri, Z. Cell Death in Development: Shaping the Embryo. *Histochem Cell Biol* **2006**, *126*, 149–158, doi:10.1007/s00418-006-0214-1.
73. Galluzzi, L.; Bravo-San Pedro, J.M.; Vitale, I.; Aaronson, S.A.; Abrams, J.M.; Adam, D.; Alnemri, E.S.; Altucci, L.; Andrews, D.; Annicchiarico-Petruzzelli, M.; et al. Essential versus Accessory Aspects of Cell Death: Recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ* **2015**, *22*, 58–73, doi:10.1038/cdd.2014.137.
74. Fink, S.L.; Cookson, B.T. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infect Immun* **2005**, *73*, 1907–1916, doi:10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005.
75. Levin, S. Apoptosis, Necrosis, or Oncosis: What Is Your Diagnosis? A Report from the Cell Death Nomenclature Committee of the Society of Toxicologic Pathologists. *Toxicol Sci* **1998**, *41*, 155–156, doi:10.1006/toxs.1997.2432.
76. Majno, G.; Joris, I. Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. An Overview of Cell Death. *Am J Pathol* **1995**, *146*, 3–15.
77. Kanduc, D.; Mittelman, A.; Serpico, R.; Sinigaglia, E.; Sinha, A.A.; Natale, C.; Santacroce, R.; Di Corcia, M.G.; Lucchese, A.; Dini, L.; et al. Cell Death: Apoptosis versus Necrosis (Review). *Int J Oncol* **2002**, *21*, 165–170.
78. Cui, J.; Zhao, S.; Li, Y.; Zhang, D.; Wang, B.; Xie, J.; Wang, J. Regulated Cell Death: Discovery, Features and Implications for Neurodegenerative Diseases. *Cell Communication and Signaling* **2021**, *19*, 120, doi:10.1186/s12964-021-00799-8.
79. Galluzzi, L.; Vitale, I.; Aaronson, S.A.; Abrams, J.M.; Adam, D.; Agostinis, P.; Alnemri, E.S.; Altucci, L.; Amelio, I.; Andrews, D.W.; et al. Molecular Mechanisms of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* **2018**, *25*, 486–541, doi:10.1038/s41418-017-0012-4.
80. Rochette, L.; Dogon, G.; Rigal, E.; Zeller, M.; Cottin, Y.; Vergely, C. Lipid Peroxidation and Iron Metabolism: Two Corner Stones in the Homeostasis Control of Ferroptosis. *International Journal of Molecular Sciences* **2023**, *24*, doi:10.3390/ijms24010449.
81. Burke, R.; Schwarze, J.; Sherwood, O.L.; Jnaid, Y.; McCabe, P.F.; Kacprzyk, J. Stressed to Death: The Role of Transcription Factors in Plant Programmed Cell Death Induced by Abiotic and Biotic Stimuli. *Frontiers in Plant Science* **2020**, *11*.

82. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. Programmed Cell Death (Apoptosis). In *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*; Garland Science, 2002.
83. Lockshin, R.A.; Zakeri, Z. Cell Death. In *Encyclopedia of Gerontology (Second Edition)*; Birren, J.E., Ed.; Elsevier: New York, 2007; pp. 249–256 ISBN 978-0-12-370870-0.
84. Ye, C.; Zheng, S.; Jiang, D.; Lu, J.; Huang, Z.; Liu, Z.; Zhou, H.; Zhuang, C.; Li, J. Initiation and Execution of Programmed Cell Death and Regulation of Reactive Oxygen Species in Plants. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 12942, doi:10.3390/ijms222312942.
85. Chaudhry, G.-S.; Akim, A.M.; Sung, Y.Y.; Muhammad, T.S.T. Cancer and Apoptosis. In *Apoptosis and Cancer: Methods and Protocols*; Barcenilla, H., Diaz, D., Eds.; Methods in Molecular Biology; Springer US: New York, NY, 2022; pp. 191–210 ISBN 978-1-07-162553-8.
86. Borges, H.L.; Linden, R.; Wang, J.Y.J. DNA Damage-Induced Cell Death: Lessons from the Central Nervous System. *Cell Res* **2008**, *18*, 17–26, doi:10.1038/cr.2007.110.
87. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* **2007**, *35*, 495–516, doi:10.1080/01926230701320337.
88. Chen, Y.; Zhao, X. Shaping Limbs by Apoptosis. *J Exp Zool* **1998**, *282*, 691–702.
89. Gao, J.; Cui, J.Z.; To, E.; Cao, S.; Matsubara, J.A. Evidence for the Activation of Pyroptotic and Apoptotic Pathways in RPE Cells Associated with NLRP3 Inflammasome in the Rodent Eye. *Journal of Neuroinflammation* **2018**, *15*, 15, doi:10.1186/s12974-018-1062-3.
90. Cunha, L.D. Autophagy Special Collection: Cell Machinery Dealing with Stress and Beyond. *Science Advances* **2022**, *8*, eadf0585, doi:10.1126/sciadv.adf0585.
91. N, M. Autophagy: Process and Function. *Genes & development* **2007**, *21*, doi:10.1101/gad.1599207.
92. Durgan, J.; Florey, O. Many Roads Lead to CASM: Diverse Stimuli of Noncanonical Autophagy Share a Unifying Molecular Mechanism. *Science Advances* **2022**, *8*, eabo1274, doi:10.1126/sciadv.abo1274.
93. Klionsky, D.J. Look People, “Atg” Is an Abbreviation for “Autophagy-Related.” That’s It. *Autophagy* **2012**, *8*, 1281–1282, doi:10.4161/auto.21812.
94. Orhon, I.; Reggiori, F. Assays to Monitor Autophagy Progression in Cell Cultures. *Cells* **2017**, *6*, 20, doi:10.3390/cells6030020.
95. Chen, M.; Rong, R.; Xia, X. Spotlight on Pyroptosis: Role in Pathogenesis and Therapeutic Potential of Ocular Diseases. *Journal of Neuroinflammation* **2022**, *19*, 183, doi:10.1186/s12974-022-02547-2.
96. Zhaolin, Z.; Guohua, L.; Shiyuan, W.; Zuo, W. Role of Pyroptosis in Cardiovascular Disease. *Cell Prolif* **2018**, *52*, e12563, doi:10.1111/cpr.12563.
97. Dvorianchikova, G.; Lypka, K.R.; Adis, E.V.; Ivanov, D. Multiple Types of Programmed Necrosis Such as Necroptosis, Pyroptosis, Oxytosis/Ferroptosis, and Parthanatos Contribute Simultaneously to Retinal Damage after Ischemia-Reperfusion. *Sci Rep* **2022**, *12*, 17152, doi:10.1038/s41598-022-22140-0.
98. Jiang, X.; Stockwell, B.R.; Conrad, M. Ferroptosis: Mechanisms, Biology and Role in Disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2021**, *22*, 266–282, doi:10.1038/s41580-020-00324-8.
99. Yan, H.; Zou, T.; Tuo, Q.; Xu, S.; Li, H.; Belaidi, A.A.; Lei, P. Ferroptosis: Mechanisms and Links with Diseases. *Sig Transduct Target Ther* **2021**, *6*, 1–16, doi:10.1038/s41392-020-00428-9.
100. Li, J.; Cao, F.; Yin, H.; Huang, Z.; Lin, Z.; Mao, N.; Sun, B.; Wang, G. Ferroptosis: Past, Present and Future. *Cell Death Dis* **2020**, *11*, 1–13, doi:10.1038/s41419-020-2298-2.

101. Tang, D.; Chen, X.; Kang, R.; Kroemer, G. Ferroptosis: Molecular Mechanisms and Health Implications. *Cell Res* **2021**, *31*, 107–125, doi:10.1038/s41422-020-00441-1.
102. Torti, S.V.; Torti, F.M. Iron and Cancer: More Ore to Be Mined. *Nat Rev Cancer* **2013**, *13*, 342–355, doi:10.1038/nrc3495.
103. Friedmann Angeli, J.P.; Schneider, M.; Proneth, B.; Tyurina, Y.Y.; Tyurin, V.A.; Hammond, V.J.; Herbach, N.; Aichler, M.; Walch, A.; Eggenhofer, E.; et al. Inactivation of the Ferroptosis Regulator Gpx4 Triggers Acute Renal Failure in Mice. *Nat Cell Biol* **2014**, *16*, 1180–1191, doi:10.1038/ncb3064.
104. Hao, S.; Liang, B.; Huang, Q.; Dong, S.; Wu, Z.; He, W.; Shi, M. Metabolic Networks in Ferroptosis. *Oncol Lett* **2018**, *15*, 5405–5411, doi:10.3892/ol.2018.8066.
105. Brown, C.W.; Amante, J.J.; Chhoy, P.; Elaimy, A.L.; Liu, H.; Zhu, L.J.; Baer, C.E.; Dixon, S.J.; Mercurio, A.M. Prominin2 Drives Ferroptosis Resistance by Stimulating Iron Export. *Developmental Cell* **2019**, *51*, 575–586.e4, doi:10.1016/j.devcel.2019.10.007.
106. Wang, Y.; Zhang, M.; Bi, R.; Su, Y.; Quan, F.; Lin, Y.; Yue, C.; Cui, X.; Zhao, Q.; Liu, S.; et al. ACSL4 Deficiency Confers Protection against Ferroptosis-Mediated Acute Kidney Injury. *Redox Biology* **2022**, *51*, 102262, doi:10.1016/j.redox.2022.102262.
107. Yuan, H.; Li, X.; Zhang, X.; Kang, R.; Tang, D. Identification of ACSL4 as a Biomarker and Contributor of Ferroptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **2016**, *478*, 1338–1343, doi:10.1016/j.bbrc.2016.08.124.
108. Mattson, M.P.; Gleichmann, M.; Cheng, A. Mitochondria in Neuroplasticity and Neurological Disorders. *Neuron* **2008**, *60*, 748–766, doi:10.1016/j.neuron.2008.10.010.
109. Xie, L.; Shi, F.; Tan, Z.; Li, Y.; Bode, A.M.; Cao, Y. Mitochondrial Network Structure Homeostasis and Cell Death. *Cancer Sci* **2018**, *109*, 3686–3694, doi:10.1111/cas.13830.
110. Xie, Y.; Hou, W.; Song, X.; Yu, Y.; Huang, J.; Sun, X.; Kang, R.; Tang, D. Ferroptosis: Process and Function. *Cell Death Differ* **2016**, *23*, 369–379, doi:10.1038/cdd.2015.158.
111. Zhou, Q.; Zhan, H.; Liao, X.; Fang, L.; Liu, Y.; Xie, H.; Yang, K.; Gao, Q.; Ding, M.; Cai, Z.; et al. A Revolutionary Tool: CRISPR Technology Plays an Important Role in Construction of Intelligentized Gene Circuits. *Cell Prolif* **2018**, *52*, e12552, doi:10.1111/cpr.12552.
112. Terns, R.M.; Terns, M.P. CRISPR-Based Technologies: Prokaryotic Defense Weapons Repurposed. *Trends Genet* **2014**, *30*, 111–118, doi:10.1016/j.tig.2014.01.003.
113. Hille, F.; Charpentier, E. CRISPR-Cas: Biology, Mechanisms and Relevance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **2016**, *371*, 20150496, doi:10.1098/rstb.2015.0496.
114. Jinek, M.; Chylinski, K.; Fonfara, I.; Hauer, M.; Doudna, J.A.; Charpentier, E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* **2012**, *337*, 816–821, doi:10.1126/science.1225829.
115. Ishino, Y.; Krupovic, M.; Forterre, P. History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. *J Bacteriol* **2018**, *200*, e00580-17, doi:10.1128/JB.00580-17.
116. Shabbir, M.A.B.; Hao, H.; Shabbir, M.Z.; Hussain, H.I.; Iqbal, Z.; Ahmed, S.; Sattar, A.; Iqbal, M.; Li, J.; Yuan, Z. Survival and Evolution of CRISPR–Cas System in Prokaryotes and Its Applications. *Front Immunol* **2016**, *7*, 375, doi:10.3389/fimmu.2016.00375.
117. Asmamaw, M.; Zawdie, B. Mechanism and Applications of CRISPR/Cas-9-Mediated Genome Editing. *Biologics* **2021**, *15*, 353–361, doi:10.2147/BTT.S326422.

118. Gostimskaya, I. CRISPR–Cas9: A History of Its Discovery and Ethical Considerations of Its Use in Genome Editing. *Biochemistry (Mosc)* **2022**, *87*, 777–788, doi:10.1134/S0006297922080090.
119. Makarova, K.S.; Koonin, E.V. Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. *Methods Mol Biol* **2015**, *1311*, 47–75, doi:10.1007/978-1-4939-2687-9\_4.
120. Chaudhuri, A.; Halder, K.; Datta, A. Classification of CRISPR/Cas System and Its Application in Tomato Breeding. *Theor Appl Genet* **2022**, *135*, 367–387, doi:10.1007/s00122-021-03984-y.
121. Barrangou, R.; Fremaux, C.; Deveau, H.; Richards, M.; Boyaval, P.; Moineau, S.; Romero, D.A.; Horvath, P. CRISPR Provides Acquired Resistance against Viruses in Prokaryotes. *Science* **2007**, *315*, 1709–1712, doi:10.1126/science.1138140.
122. Mosterd, C.; Rousseau, G.M.; Moineau, S. A Short Overview of the CRISPR-Cas Adaptation Stage. *Can. J. Microbiol.* **2021**, *67*, 1–12, doi:10.1139/cjm-2020-0212.
123. Haurwitz, R.E.; Jinek, M.; Wiedenheft, B.; Zhou, K.; Doudna, J.A. Sequence- and Structure-Specific RNA Processing by a CRISPR Endonuclease. *Science* **2010**, *329*, 1355–1358, doi:10.1126/science.1192272.
124. Hale, C.R.; Zhao, P.; Olson, S.; Duff, M.O.; Graveley, B.R.; Wells, L.; Terns, R.M.; Terns, M.P. RNA-Guided RNA Cleavage by a CRISPR RNA-Cas Protein Complex. *Cell* **2009**, *139*, 945–956, doi:10.1016/j.cell.2009.07.040.
125. Marraffini, L.A.; Sontheimer, E.J. CRISPR Interference Limits Horizontal Gene Transfer in Staphylococci by Targeting DNA. *Science* **2008**, *322*, 1843–1845, doi:10.1126/science.1165771.
126. Wang, R.; Preamplume, G.; Terns, M.P.; Terns, R.M.; Li, H. Interaction of the Cas6 Riboendonuclease with CRISPR RNAs: Recognition and Cleavage. *Structure* **2011**, *19*, 257–264, doi:10.1016/j.str.2010.11.014.
127. Zhang, J.; Rouillon, C.; Kerou, M.; Reeks, J.; Brugger, K.; Graham, S.; Reimann, J.; Cannone, G.; Liu, H.; Albers, S.-V.; et al. Structure and Mechanism of the CMR Complex for CRISPR-Mediated Antiviral Immunity. *Mol Cell* **2012**, *45*, 303–313, doi:10.1016/j.molcel.2011.12.013.
128. Garneau, J.E.; Dupuis, M.-È.; Villion, M.; Romero, D.A.; Barrangou, R.; Boyaval, P.; Fremaux, C.; Horvath, P.; Magadán, A.H.; Moineau, S. The CRISPR/Cas Bacterial Immune System Cleaves Bacteriophage and Plasmid DNA. *Nature* **2010**, *468*, 67–71, doi:10.1038/nature09523.
129. Gaj, T.; Sirk, S.J.; Shui, S.; Liu, J. Genome-Editing Technologies: Principles and Applications. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2016**, *8*, a023754, doi:10.1101/cshperspect.a023754.
130. Gleditzsch, D.; Pausch, P.; Müller-Esparza, H.; Özcan, A.; Guo, X.; Bange, G.; Randau, L. PAM Identification by CRISPR-Cas Effector Complexes: Diversified Mechanisms and Structures. *RNA Biol* **2018**, *16*, 504–517, doi:10.1080/15476286.2018.1504546.
131. Akram, F.; Haq, I.U.; Sahreen, S.; Nasir, N.; Naseem, W.; Imitaz, M.; Aqeel, A. CRISPR/Cas9: A Revolutionary Genome Editing Tool for Human Cancers Treatment. *Technol Cancer Res Treat* **2022**, *21*, 15330338221132078, doi:10.1177/15330338221132078.
132. Mei, Y.; Wang, Y.; Chen, H.; Sun, Z.S.; Ju, X.-D. Recent Progress in CRISPR/Cas9 Technology. *J Genet Genomics* **2016**, *43*, 63–75, doi:10.1016/j.jgg.2016.01.001.
133. Shao, M.; Xu, T.-R.; Chen, C.-S. The Big Bang of Genome Editing Technology: Development and Application of the CRISPR/Cas9 System in Disease Animal Models. *Dongwuxue Yanjiu* **2016**, *37*, 191–204, doi:10.13918/j.issn.2095-8137.2016.4.191.
134. Jiang, F.; Doudna, J.A. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu Rev Biophys* **2017**, *46*, 505–529, doi:10.1146/annurev-biophys-062215-010822.

135. Chen, H.; Choi, J.; Bailey, S. Cut Site Selection by the Two Nuclease Domains of the Cas9 RNA-Guided Endonuclease. *J Biol Chem* **2014**, *289*, 13284–13294, doi:10.1074/jbc.M113.539726.
136. Tang, Y.-T.; Huang, Y.-Y.; Zheng, L.; Qin, S.-H.; Xu, X.-P.; An, T.-X.; Xu, Y.; Wu, Y.-S.; Hu, X.-M.; Ping, B.-H.; et al. Comparison of Isolation Methods of Exosomes and Exosomal RNA from Cell Culture Medium and Serum. *Int J Mol Med* **2017**, *40*, 834–844, doi:10.3892/ijmm.2017.3080.
137. Hall, E.J. The Bystander Effect. *Health Phys* **2003**, *85*, 31–35, doi:10.1097/00004032-200307000-00008.
138. Widel, M. Radiation Induced Bystander Effect: From in Vitro Studies to Clinical Application. *International Journal of Medical Physics, Clinical Engineering and Radiation Oncology* **2016**, *5*, 1–17, doi:10.4236/ijmpcero.2016.51001.
139. Mitchel, R.E.J. The Bystander Effect: Recent Developments and Implications for Understanding the Dose Response. *Nonlinearity Biol Toxicol Med* **2004**, *2*, 173–183, doi:10.1080/15401420490507512.
140. Witt, G. Chapter 3 - A Brief History of Rules. In *Writing Effective Business Rules*; Witt, G., Ed.; Morgan Kaufmann: Boston, 2012; pp. 25–63 ISBN 978-0-12-385051-5.
141. Belli, F.; Beyazit, M.; Budnik, C.J.; Tuglular, T. Chapter Five - Advances in Model-Based Testing of Graphical User Interfaces. In *Advances in Computers*; Memon, A.M., Ed.; Elsevier, 2017; Vol. 107, pp. 219–280.
142. Aronson, J.E. Expert Systems. In *Encyclopedia of Information Systems*; Bidgoli, H., Ed.; Elsevier: New York, 2003; pp. 277–289 ISBN 978-0-12-227240-0.
143. Ross, R. Decision Tables, Part 2 ~ The Route to Completeness : Commentary : Business Rules Community / Business Rules Journal Available online: <https://www.brcommunity.com/articles.php?id=b243> (accessed on 14 May 2023).
144. Decision Tables, Learn How to Use Decision Tables. *ReQtest* 2012.
145. Kramer-Marek, G.; Serpa, C.; Szurko, A.; Widel, M.; Sochanik, A.; Snietura, M.; Kus, P.; Nunes, R.M.D.; Arnaut, L.G.; Ratuszna, A. Spectroscopic Properties and Photodynamic Effects of New Lipophilic Porphyrin Derivatives: Efficacy, Localisation and Cell Death Pathways. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2006**, *84*, 1–14, doi:10.1016/j.jphotobiol.2005.12.011.
146. Dixon, S.J.; Patel, D.N.; Welsch, M.; Skouta, R.; Lee, E.D.; Hayano, M.; Thomas, A.G.; Gleason, C.E.; Tatonetti, N.P.; Slusher, B.S.; et al. Pharmacological Inhibition of Cystine–Glutamate Exchange Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Ferroptosis. *eLife* **2014**, *3*, e02523, doi:10.7554/eLife.02523.
147. Dolma, S.; Lessnick, S.L.; Hahn, W.C.; Stockwell, B.R. Identification of Genotype-Selective Antitumor Agents Using Synthetic Lethal Chemical Screening in Engineered Human Tumor Cells. *Cancer Cell* **2003**, *3*, 285–296, doi:10.1016/S1535-6108(03)00050-3.
148. CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTT) | MTT Assay Available online: [https://pl.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter-96-non\\_radioactive-cell-proliferation-assay-\\_mtt\\_/](https://pl.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter-96-non_radioactive-cell-proliferation-assay-_mtt_/) (accessed on 3 July 2023).
149. CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay | MTS Assay | MTT Assay Available online: [https://pl.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-\\_mts\\_/?catNum=G3582](https://pl.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-_mts_/?catNum=G3582) (accessed on 3 July 2023).
150. Badanie Działania Cytotoksycznego Substancji Chemicznych - Postępy Biologii Komórki. Supplement - Numer 24 (2008) - Biblioteka Nauki - Yadda Available online: <http://yadda.icm.edu.pl/yadda/element/bwmeta1.element.agro-article-6a2e4e99-e3fb-4a81-853a-aba783019258> (accessed on 2 July 2023).
151. Span, L.F.R.; Pennings, A.H.M.; Vierwinden, G.; Boezeman, J.B.M.; Raymakers, R. a. P.; de Witte, T. The Dynamic Process of Apoptosis Analyzed by Flow Cytometry

- Using Annexin-V/Propidium Iodide and a Modified in Situ End Labeling Technique. *Cytometry* **2002**, *47*, 24–31.
152. Kelesidis, T.; Tran, E.; Arastoo, S.; Lakhani, K.; Heymans, R.; Gornbein, J.; Middlekauff, H.R. Elevated Cellular Oxidative Stress in Circulating Immune Cells in Otherwise Healthy Young People Who Use Electronic Cigarettes in a Cross-Sectional Single-Center Study: Implications for Future Cardiovascular Risk. *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease* **2020**, *9*, doi:10.1161/JAHA.120.016983.
  153. MitoSox Red Mitochondrial Superoxide Indicator for Live-Cell Imaging.
  154. Ghebremariam, Y.T.; Huang, N.F.; Kambhampati, S.; Volz, K.S.; Joshi, G.G.; Anslyn, E.V.; Cooke, J.P. Characterization of a Fluorescent Probe for Imaging Nitric Oxide. *J Vasc Res* **2014**, *51*, 68–79, doi:10.1159/000356445.
  155. Total RNA Mini Available online: <https://www.aabiot.com/izolacja-rna/calkowite-rna/total-rna-mini> (accessed on 3 July 2023).
  156. NG dART RT kit Available online: [https://eurx.com.pl/product/e0801\\_pl/](https://eurx.com.pl/product/e0801_pl/) (accessed on 3 July 2023).
  157. Pereira-Gómez, M.; Fajardo, Á.; Echeverría, N.; López-Tort, F.; Perbolianachis, P.; Costábile, A.; Aldunate, F.; Moreno, P.; Moratorio, G. Evaluation of SYBR Green Real Time PCR for Detecting SARS-CoV-2 from Clinical Samples. *J Virol Methods* **2021**, *289*, 114035, doi:10.1016/j.jviromet.2020.114035.
  158. RT PCR Mix SYBR® Available online: <https://www.aabiot.com/rt-pcr-mix-sybr-a?search=sybr> (accessed on 3 July 2023).
  159. Joshi, C.J.; Ke, W.; Drangowska-Way, A.; O'Rourke, E.J.; Lewis, N.E. What Are Housekeeping Genes? *PLoS Comput Biol* **2022**, *18*, e1010295, doi:10.1371/journal.pcbi.1010295.
  160. Kj, L.; Td, S. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)* **2001**, *25*, doi:10.1006/meth.2001.1262.
  161. Arocho, A.; Chen, B.; Ladanyi, M.; Pan, Q. Validation of the 2-DeltaDeltaCt Calculation as an Alternate Method of Data Analysis for Quantitative PCR of BCR-ABL P210 Transcripts. *Diagn Mol Pathol* **2006**, *15*, 56–61, doi:10.1097/00019606-200603000-00009.
  162. Kamencic, H.; Lyon, A.; Paterson, P.G.; Juurlink, B.H.J. Monochlorobimane Fluorometric Method to Measure Tissue Glutathione. *Analytical Biochemistry* **2000**, *286*, 35–37, doi:10.1006/abio.2000.4765.
  163. Perry, S.W.; Norman, J.P.; Barbieri, J.; Brown, E.B.; Gelbard, H.A. Mitochondrial Membrane Potential Probes and the Proton Gradient: A Practical Usage Guide. *Biotechniques* **2011**, *50*, 98–115, doi:10.2144/000113610.
  164. Ratinaud, M.H.; Leprat, P.; Julien, R. In Situ Flow Cytometric Analysis of Nonyl Acridine Orange-Stained Mitochondria from Splenocytes. *Cytometry* **1988**, *9*, 206–212, doi:10.1002/cyto.990090304.
  165. Zhou, N.; Bao, J. FerrDb: A Manually Curated Resource for Regulators and Markers of Ferroptosis and Ferroptosis-Disease Associations. *Database (Oxford)* **2020**, *2020*, baaa021, doi:10.1093/database/baaa021.
  166. Statistical Treatment for Rejection of Deviant Values: Critical Values of Dixon's "Q" Parameter and Related Subrange Ratios at the 95% Confidence Level | Analytical Chemistry Available online: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00002a010> (accessed on 5 May 2023).
  167. Wadhwa, R.R.; Marappa-Ganeshan, R. T Test. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2023.
  168. Buda, A. Life Time of Correlation between Stocks Prices on Established and Emerging Markets 2011.

169. Statistical Power Analysis For The Behavioral Sciences [PDF] [1c390n5bbdjo] Available online: <https://vdoc.pub/documents/statistical-power-analysis-for-the-behavioral-sciences-1c390n5bbdjo> (accessed on 22 January 2023).
170. Liu, X.; Chen, C.; Han, D.; Zhou, W.; Cui, Y.; Tang, X.; Xiao, C.; Wang, Y.; Gao, Y. SLC7A11/GPX4 Inactivation-Mediated Ferroptosis Contributes to the Pathogenesis of Triptolide-Induced Cardiotoxicity. *Oxid Med Cell Longev* **2022**, *2022*, 3192607, doi:10.1155/2022/3192607.
171. Koppula, P.; Zhuang, L.; Gan, B. Cystine Transporter SLC7A11/XCT in Cancer: Ferroptosis, Nutrient Dependency, and Cancer Therapy. *Protein Cell* **2021**, *12*, 599–620, doi:10.1007/s13238-020-00789-5.
172. Zhang, Y.; Shi, J.; Liu, X.; Feng, L.; Gong, Z.; Koppula, P.; Sirohi, K.; Li, X.; Wei, Y.; Lee, H.; et al. BAP1 Links Metabolic Regulation of Ferroptosis to Tumor Suppression. *Nat Cell Biol* **2018**, *20*, 1181–1192, doi:10.1038/s41556-018-0178-0.
173. Zheng, X.; Liang, Y.; Zhang, C. Ferroptosis Regulated by Hypoxia in Cells. *Cells* **2023**, *12*, 1050, doi:10.3390/cells12071050.
174. Yang, Y.; Luo, M.; Zhang, K.; Zhang, J.; Gao, T.; Connell, D.O.; Yao, F.; Mu, C.; Cai, B.; Shang, Y.; et al. Nedd4 Ubiquitylates VDAC2/3 to Suppress Erastin-Induced Ferroptosis in Melanoma. *Nat Commun* **2020**, *11*, 433, doi:10.1038/s41467-020-14324-x.
175. Sato, M.; Kusumi, R.; Hamashima, S.; Kobayashi, S.; Sasaki, S.; Komiyama, Y.; Izumikawa, T.; Conrad, M.; Bannai, S.; Sato, H. The Ferroptosis Inducer Erastin Irreversibly Inhibits System Xc<sup>-</sup> and Synergizes with Cisplatin to Increase Cisplatin's Cytotoxicity in Cancer Cells. *Sci Rep* **2018**, *8*, 968, doi:10.1038/s41598-018-19213-4.
176. The Interaction between Ferroptosis and Lipid Metabolism in Cancer | Signal Transduction and Targeted Therapy Available online: <https://www.nature.com/articles/s41392-020-00216-5> (accessed on 11 July 2023).

## 10. Dorobek naukowy autora

### Pełne artykuły naukowe

- Skonieczna Magdalena, Hudy Dorota, Hejmo Tomasz, Bułdak RJ, **Adamiec Małgorzata** and Kukla Michał. *The adipokine vaspin reduces apoptosis in human hepatocellular carcinoma (Hep-3B) cells, associated with lower levels of NO and superoxide anion*, 2019. BMC PHARMACOLOGY & TOXICOLOGY, vol. 2019, no. 20, 70pkt MNiSW, IF. 2,103
- Siewniak Agnieszka, Bielas Rafał, Skonieczna Magdalena, **Adamiec Małgorzata**, Mielanzyk Łukasz and Neugebauer Dorota. *Choline based polymethacrylate matrix with pharmaceutical cations as co-delivery system for antibacterial and antiinflammatory combined therapy*, 2019. JOURNAL OF MOLECULAR LIQUIDS, vol. 2019, no. 285, pp. 114-122, 100pkt MNiSW, IF. 4,561
- **Adamiec Małgorzata** and Skonieczna Magdalena. *UV radiation in HCT 116 cells influences intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and glutathione levels, antioxidant expression, and protein glutathionylation*, 2019. ACTA BIOCHIMICA POLONICA, vol. 2019, no. 66, pp. 605-610, 40 pkt MNiSW, IF. 1.626
- Skonieczna Magdalena, **Adamiec Małgorzata**, Hudy Dorota, Niesłoń Patrycja, Fochtman Daniel and Bil Patryk. *Live cell impedance measurements and time lapse microscopy observations for ionizing radiation stimulated cellular adhesion, proliferation, and migration.*, 2020. CURRENT PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY, vol. 2020, no. 21, 100 pkt MNiSW, IF. 1.516
- Magdalena Skonieczna, **Małgorzata Adamiec-Organisciok**, Dorota Hudy, Arkadiusz Dziedzic, Laura Los, Lubomir Składany, Ivica Grgurevic, Tajana

Filipec Kanizaj, Mieczysław Jagodziński, Michał Kukła, Joanna Nackiewicz. *Hepatocellular cancer cell lines, Hep-3B and Hep-G2 display the pleiotropic response to resveratrol and berberine, 2022, Advances in Medical Sciences, Volume 67, Issue 2, 100 pkt MNiSW, IF. 2.852*

- Śmiga-Matuszowicz, M.; Włodarczyk, J.; Skorupa, M.; Czerwińska-Główka, D.; Folta, K.; Pastusiak, M.; **Adamiec-Organiściok**, M.; Skonieczna, M.; Turczyn, R.; Sobota, M.; Krukiewicz, K. Biodegradable Scaffolds for Vascular Regeneration Based on Electrospun Poly(L-Lactide-co-Glycolide)/Poly(Isosorbide Sebacate) Fibers. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 1190. <https://doi.org/10.3390/ijms24021190>,
- Sojka, D.R., Abramowicz, A., Adamiec-Organiściok, M. et al. Heat shock protein A2 is a novel extracellular vesicle-associated protein. *Sci Rep* **13**, 4734 (2023). 140 pkt MNiSW IF. 5.516
- Niesyto, K, Skonieczna, M, Adamiec-Organiściok, M, Neugebauer, D. Toxicity evaluation of choline ionic liquid-based nanocarriers of pharmaceutical agents for lung treatment. *J Biomed Mater Res.* **2023**; 1- 12. 100 pkt MNiSW, IF. 4.854

## Monografie

- **Adamiec Małgorzata**, Hudy Dorota, Gendosz de Carriello Daria and Skonieczna Magdalena. *Ferroptoza -indukowana promieniowaniem jonizującym, nieapoptotyczna Śmierć w komórkach prawidłowych i nowotworowych*, 2019. Biomedycyna i zagadnienia pokrewne., ISBN: 978-8-3659-3269-3, pp. 121-136 , rozdział w monografii, 20pkt MNiSW
- Skonieczna Magdalena, Hudy Dorota, Bil Patryk, **Adamiec Małgorzata**, Stachowska Marta and Biernacki Krzysztof. *Current Trends in Biomedical Engineering and Bioimages Analysis*, 2019. Role of Let-7 Family miRNAs in Migration of Colorectal Cancer HCT 116 and Caco-2 Cells After Stimulation by the Adipokine Vaspin. TimeLapse Live-Cell Microscopic Observations, ISBN: 978-3-0302-9884-5, pp. 47-61, rozdział w monografii, 20pkt MNiSW
- Łukasz Cienciąła, Luiza Ochocka, Jakub Pawlikowski, Magdalena Węgrzyn, **Małgorzata Adamiec-Organiściok**, Magdalena Skonieczna; *Efekt sąsiedztwa w prawidłowych keratynocytach HaCaT w układzie ko-inkubacji z nowotworami skóry w obserwacji regulowanej ścieżki śmierci – ferroptozie*; Łukasz B. Pilarz; *Komórki, tkanki i narządy ludzkie – prawne problemy wykorzystania medycznego i pozamedycznego*; 2023; ISBN:978-83-67104-93-7. pp. 84-98,

## Doniesienia konferencyjne

Daniel Fochtman, Patrycja Niesłoń, Seweryn Gałęcki, Daria Kostka, Karol Mierzwa, Magdalena Węgrzyn, Małgorzata Adamiec, Magdalena Skonieczna (2020). In ferroptosis-sensitive A549 cells, oxidative stress results in a specific lipid peroxidation death pathway. XXIV GSN 2020, POSTER

Mierzwa Karol, Niesłoń Patrycja, Adamiec Małgorzata, Skonieczna Magdalena (2020). Anionorodnik ponadtlenkowy uruchamia w prawidłowych komórkach skóry NHDF i HaCaT protekcyjny mechanizm chroniący przed oksydacją lipidów – VII Ogólnopolskie Sympozjum Biomedyczne ESKULAP, 28-29 listopada 2020 r, REFERAT

Gałęcki Seweryn, Niesłoń Patrycja, Kostka Daria, Mierzwa Karol, Węgrzyn Magdalena, Fochtman Daniel, Adamiec Małgorzata, Dorota Hudy, Skonieczna Magdalena (2020). Adipocytokine vaspin stimulates the migration process in different colorectal cancer cell lines. ISC2020. REFERAT



Gogler-Piğłowska Agnieszka, Adamiec Małgorzata, Sojka Damian, Urszula Bojko and Dorota Ścieglińska. HSPA2 chaperone, the epidermal keratinocyte differentiation-associated protein, participates in the inflammatory response mediated by cytokines related to psoriasis., 2020. The 5th Warsaw Conference on Perspectives of Molecular Oncology: Molecular Immunology of Cancer, 23/09/2020-24/09/2020, Warszawa, Polska. POSTER

Seweryn Gałeccki, Małgorzata Adamiec, Magdalena Skonieczna - „Indukcja ferroptozy poprzez wewnątrzkomórkowy stres oksydacyjny”, VIII Ogólnopolska Konferencja Interdyscyplinarna „Eureka” , 2021.

Daniel Fochtman, Seweryn Gałeccki, Małgorzata Adamiec, Magdalena Skonieczna - „Obserwacje przyżyciowe migracji komórek o fenotypie „zwiadowców” w teście zdrapaniowym pod wpływem promieniowania jonizującego ”, VII Ogólnopolskie Sympozjum Biomedyczne ESKULAP 2020, 28-29 listopada 2020 r, REFERAT

Adamiec Małgorzata, Hudy Dorota, Gendosz de Carriello Daria and Skonieczna Magdalena „Ferroptoz, śmierć komórkowa związana z peroksydacją lipidów w komórkach nowotworowych”, VII Ogólnopolskie Sympozjum Biomedyczne ESKULAP 2020, 28-29 listopada 2020 r, REFERAT

Adamiec Małgorzata, Hudy Dorota, Gendosz de Carriello Daria and Skonieczna Magdalena „Ferroptosis, cell death depending of lipid oxidation in skin cell lines”, Skin Ageing and Challenges 2020, 4-6 listopad 2020 r, REFERAT

Adamiec Małgorzata, Hudy Dorota, Gendosz de Carriello Daria and Skonieczna Magdalena „Rodzaje śmierci komórkowych w różnych liniach komórkowych”, VIII Ogólnopolska Konferencja Interdyscyplinarna „Eureka” , 2021.

Małgorzata Adamiec, Agnieszka Gogler-Piğłowska, Damian Robert Sojka, Gracjana Zająć, Urszula Bojko, Dorota Ścieglińska, „ HSPA2 deficiency in keratinocytes may augment cytokine-induced psoriasis-like inflammation”, XXIV GSN 2020, 20-21 listopad 2020, POSTER

Małgorzata Adamiec-Organisciok, Dorota Hudy, Daria Gendosz de Carrillo, Magdalena Skonieczna "Erastin regulated death pathways in different skin cell lines", 1-5 May 2022 | Crete, Greece

Małgorzata Adamiec-Organisciok, Anahit Dawicka, Magdalena Węgrzyn, Daria Gendosz de Carrillo, Magdalena Skonieczna „Skin cell lines response to death pathway modulation”, 17-18 listopad 2022, Lisboa, Portugal

Małgorzata Adamiec-Organisciok, Anahit Dawicka, Magdalena Węgrzyn, Daria Gendosz de Carrillo, Magdalena Skonieczna, "Ferroptotic regulated cell death in lipid peroxidation resistant cell lines „ EMBO workshop, Ferroptosis: When metabolism meets cell death, 23-27 kwiecień 2023,