

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum

Elżbieta Buczek

**Ocena zmian czynności śródbłónka w toku rozwoju
nowotworu oraz w odpowiedzi na leki
przeciwnowotworowe w modelach *in vivo* i *ex vivo***

Praca doktorska

Promotor: Prof. dr hab. Stefan Chłopicki
Promotor pomocniczy: Dr hab. Marta Smęda

Pracę wykonano w Jagiellońskim Centrum Rozwoju Leków (JCET)
Kierownik jednostki Prof. dr hab. Stefan Chłopicki

Kraków, 2025

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania mojemu Mentorowi i Promotorowi rozprawy doktorskiej **Panu Prof. dr hab. Stefanowi Chłopickiemu** za możliwość ciągłego rozwoju, inspirację i nieocenioną pomoc merytoryczną w mojej pracy badawczej oraz podczas pisania rozprawy doktorskiej.

Składam serdeczne podziękowania mojej Promotor Pomocniczej **Pani dr hab. Marcie Smędzie**, za jej wielką życzliwość, wsparcie merytoryczne oraz nasze rozmowy, nie tylko o nauce.

Dziękuję wszystkim **Koleżankom i Kolegom z JCET** za owocną współpracę, wszelką pomoc w pracy naukowej oraz niezwykle przyjazną atmosferę.

Dziękuję moim **Bliskim** po prostu za ich obecność w moim życiu, za motywację, za wiarę w moje możliwości i dodawanie mi otuchy, gdy tego potrzebowałam.

„Gdybym (...) znał wszystkie tajemnice
i posiadał wszelką wiedzę,
i wiarę miał tak wielką, iżbym góry przenosił,
a miłości bym nie miał –
byłbym niczym”

1 Kor, 13

**Pracę tę dedykuję moim ukochanym
Mężowi Kamilowi
oraz Córkom Katarzynie, Agnieszce i Małgorzacie**

SPIS TREŚCI

WSPARCIE PROJEKTOWE.....	8
STRESZCZENIE	9
ABSTRACT	11
WYKAZ NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	13
1 WSTĘP	15
1.1 Śródbłonek naczyniowy i jego dysfunkcja w chorobach układu krążenia	16
1.2 Rola śródbłonka Naczyniowego w Rozwoju chorób nowotworowych	17
1.3 Dysfunkcja śródbłonka jako następstwo różnych terapii przeciwnowotworowych	18
1.4 Inhibitory kinaz BRAF i MEK jako przykład terapii celowanej o negatywnym działaniu na układ krążenia	22
2 CEL PRACY.....	25
3 METODYKA.....	26
3.1 Ocena zmian czynności śródbłonka w toku rozwoju nowotworu w mysim ortotopowym modelu raka gruczołu sutkowego	26
3.1.1 Linia komórek nowotworowych 4T1	26
3.1.2 Myszy BALB/c	26
3.1.3 Mysi ortotopowy model raka gruczołu sutkowego 4T1	27
3.1.4 Ocena wzrostu guza pierwotnego i liczby przerzutów w płucach myszy BALB/c	27
3.1.5 Analiza histologiczna i immunohistochemiczna płuc myszy BALB/c	27
3.1.6 Ocena zależnej od NO czynności śródbłonka naczyniowego izolowanych krążków aorty myszy BALB/c	28
3.1.7 Ocena produkcji azotynów w izolowanych krążkach aorty myszy BALB/c	29
3.1.8 Ocena produkcji prostacykliny w krążkach aorty myszy BALB/c	29
3.1.9 Ocena ekspresji czynnika von Willebranda w śródbłonku aorty myszy BALB/c	30
3.1.10 Ocena produkcji NO w izolowanym perfundowanym płucu myszy BALB/c	30
3.1.11 Analiza morfologii krwi i stężenia cytokin w osoczu myszy BALB/c	31
3.1.12 Ocena stężenia azotynów i azotanów w osoczu myszy BALB/c	31
3.1.13 Ocena stężenia nitrozyłhemoglobiny (NOHb) w erytrocytach myszy BALB/c	31
3.2 Ocena zmian czynności śródbłonka naczyniowego pod wpływem wybranych leków przeciwnowotworowych.....	32
3.2.1 Myszy C57BL/6J.....	32
3.2.2 Badanie działania dabrafenibu i trametynibu na czynność śródbłonka naczyniowego <i>in vivo</i>	32
3.2.3 Ocena czynności rozkurczowej aorty myszy C57BL/6J <i>in vivo</i> z wykorzystaniem MRI	33
3.2.4 Ocena parametrów morfologii krwi oraz SAA w osoczu mszy C57BL/6J.....	33
3.2.5 Badanie działania dabrafenibu i trametynibu <i>ex vivo</i> w modelu izolowanej aorty myszy C57BL/6J...	34

3.2.6	Ocena ekspresji wybranych genów na poziomie mRNA w aorcie myszy C57BL/6J.....	34
3.2.7	Ocena funkcji śródbłonna zależnej od NO w izolowanych krążkach aorty myszy C57BL/6J	36
3.2.8	Ocena produkcji tlenu azotu w izolowanej aorcie myszy C57BL/6J	36
3.2.9	Ocena aktywności eNOS w izolowanej aorcie myszy C57BL/6J	37
3.2.10	Ocena poziomu wybranych białek w homogenatach aorty myszy C57BL/6J	38
3.2.11	Ocena zmian aktywności kinaz serynowo-treoninowych w homogenatach aort myszy C57BL/6J pod wpływem działania badanych leków.....	39
3.2.12	Analiza metabolizmu energetycznego krążków aorty myszy C57BL/6J	40
3.2.13	Próba farmakologicznego odwrócenia dysfunkcji śródbłonna naczyniowego wywołanej dabrafenibem.....	41
3.2.14	Analiza statystyczna	42
4	WYNIKI.....	43
	CZĘŚĆ I	43
4.1	Ocena zmian czynności śródbłonna w toku rozwoju choroby nowotworowej w mysim ortotopowym modelu raka gruczołu sutkowego.....	43
4.1.1	Progresja choroby nowotworowej u myszy BALB/c po ortotopowym wszczepieniu komórek 4T1 oceniona na podstawie zmian masy guza pierwotnego i liczby przerzutów w płucach	43
4.1.2	Zmiany zapalne i ogniska przerzutowe w płucach myszy BALB/c po ortotopowym wszczepieniu komórek 4T1	44
4.1.3	Zmiany ekspresji V-CAM i vWF w płucach myszy BALB/c po ortotopowym wszczepieniu komórek 4T1	44
4.1.4	Leukocytoza i inne zmiany parametrów morfologii krwi po ortotopowym wszczepieniu komórek 4T1 u myszy BALB/c	46
4.1.5	Wzrost stężenia Il-6 i białek ostrej fazy w osoczu po ortotopowym wszczepieniu komórek 4T1 u myszy BALB/c	48
4.1.6	Upośledzenie czynności śródbłonna aorty po ortotopowym wszczepieniu komórek 4T1, w zaawansowanym stadium choroby nowotworowej u myszy BALB/c	49
4.1.7	Zmiany produkcji NO w toku rozwoju choroby nowotworowej w aorcie po ortotopowym wszczepieniu komórek 4T1 u myszy BALB/c.....	50
4.1.8	Zmiany produkcji PGI ₂ w aorcie po ortotopowym wszczepieniu komórek 4T1, w toku rozwoju choroby nowotworowej u myszy BALB/c	50
4.1.9	Zmiany w ekspresji czynnika von Willebranda w aorcie po ortotopowym wszczepieniu komórek 4T1, w toku rozwoju choroby nowotworowej u myszy BALB/c.....	52
4.1.10	Spadek produkcji azotynów i azotanów w płucach po ortotopowym wszczepieniu komórek 4T1, na wczesnym etapie rozwoju nowotworu u myszy BALB/c.....	53
	CZĘŚĆ II	55
4.2	Ocena wpływu inhibitorów kinaz BRAF i MEK na czynność śródbłonna naczyniowego aorty <i>in vivo</i> i <i>ex vivo</i> u myszy C57BL/6J	55

4.2.1	Zmiany czynności śródbłonna naczyniowego po jednorazowym podaniu dabrafenibu <i>in vivo</i> u myszy C57BL/6J – badania z wykorzystaniem MRI	55
4.2.2	Zmiany czynności śródbłonna <i>in vivo</i> u myszy C57BL/6J po 7 dniach podawania dabrafenibu lub trametynibu w paszy – badania z wykorzystaniem MRI	55
4.2.3	Ekspresja wybranych białek na poziomie mRNA w homogenatach aorty myszy C57BL/6J po 7 dniach podawania dabrafenibu lub trametynibu w paszy	57
4.2.4	Zmiany parametrów morfologii krwi oraz stężenie surowiczego amyloidu A (SAA) w osoczu myszy C57BL/6J po 7 dniach podawania dabrafenibu lub trametynibu w paszy.	58
4.2.5	Wpływ dabrafenibu i trametynibu na czynność śródbłonna naczyniowego <i>in vivo</i> u myszy C57BL/6J – podsumowanie wyników	60
4.2.6	Brak wpływu dabrafenibu i trametynibu na czynność śródbłonna w izolowanej aorcie myszy C57BL/6J po 6 godzinach inkubacji	60
4.2.7	Upośledzenie czynności śródbłonna naczyniowego przez dabrafenib, ale nie przez trametynib po 24 godzinach inkubacji w izolowanej aorcie myszy C57BL/6J	61
4.2.8	Zmiany w kurczliwości aort w odpowiedzi na chlorek potasu i fenylefrynę, po 24 godzinach inkubacji z dabrafenibem i trametynibem w izolowanej aorcie myszy C57BL/6J	61
4.2.9	Istotny spadek produkcji NO w izolowanych aortach myszy C57BL/6J inkubowanych 24 godziny z dabrafenibem	63
4.2.10	Aktywność eNOS w aortach myszy C57BL/6J inkubowanych z dabrafenibem lub trametynibem przez 24 godziny	64
4.2.11	Zmiany ekspresji eNOS na poziomie mRNA, w aortach myszy C57BL/6J inkubowanych 24 godziny z dabrafenibem lub trametynibem	66
4.2.12	Zmiany ekspresji eNOS na poziomie białka w aortach myszy C57BL/6J inkubowanych 24 godziny z dabrafenibem lub trametynibem	66
4.2.13	Ekspresja kinaz AKT i ERK na poziomie białka w aortach myszy C57BL/6J inkubowanych 24 godziny z dabrafenibem lub trametynibem	68
4.2.14	Zmiany produkcji PGI ₂ oraz zmiany ekspresji COX-1 i COX-2 na poziomie mRNA w aortach myszy C57BL/6J inkubowanych 24 godziny z dabrafenibem lub trametynibem	69
4.2.15	Aktywność kinaz serynowo-treoninowych w aortach myszy C57BL/6J inkubowanych przez 24 godziny z dabrafenibem, trametynibem oraz kombinacją tych leków	70
4.2.16	Wpływu dabrafenibu, trametynibu oraz ich kombinacji na metabolizm mitochondrialny w aortach myszy C57BL/6	76
4.2.17	Działanie dabrafenibu i trametynibu na czynność śródbłonna <i>ex vivo</i> w aorcie myszy C57BL/6J – podsumowanie	78
4.2.18	Wpływ inhibitora ROCK – fasudilu na upośledzenie czynności śródbłonna w aorcie myszy C57BL/6J <i>ex vivo</i> wywołane przez dabrafenib	79
4.2.19	Wpływ inhibitora CAMK2 – KN-93 na upośledzenie czynności śródbłonna w aorcie myszy C57BL/6J <i>ex vivo</i> wywołane przez dabrafenib	82

4.2.20	Wpływ inhibitora CAMK2 – CAMK-IN-1 na upośledzenie czynności śródbłonka w aorcie myszy C57BL/6J <i>ex vivo</i> wywołane przez dabrafenib.....	84
4.2.21	Wpływ inhibitora NOX-2 – apocyniny na upośledzenie czynności śródbłonka w aorcie myszy C57BL/6J <i>ex vivo</i> wywołane przez dabrafenib.....	86
4.2.22	Wpływ inhibitora NOX-1/NOX-4 – setanaxibu na upośledzenie czynności śródbłonka w aorcie myszy C57BL/6J <i>ex vivo</i> wywołane przez dabrafenib	88
4.2.23	Wpływ przeciwutleniacza o działaniu mitochondrialnym – MitoTEMPO na upośledzenie czynności śródbłonka w aorcie myszy C57BL/6J <i>ex vivo</i> wywołane przez dabrafenib	89
5	DYSKUSJA	92
5.1	Charakterystyka dysfunkcji śródbłonka w mysim modelu nowotworu gruczołu sutkowego	93
5.1.1	Wczesny etap rozwoju choroby nowotworowej a dysfunkcja śródbłonka naczyniowego	94
5.1.2	Zaawansowany etap rozwoju choroby nowotworowej a czynność śródbłonka naczyniowego	96
5.2	Charakterystyka dysfunkcji śródbłonka wywołanej leczeniem przeciwnowotworowym inhibitorami kinaz BRAF i MEK	99
5.2.1	Dysfunkcja śródbłonka naczyniowego wywołana przez dabrafenib u myszy C57BL/6J <i>in vivo</i>	100
5.2.2	Dysfunkcja śródbłonka naczyniowego wywołana przez dabrafenib w izolowanej aorcie myszy C57BL/6J <i>ex vivo</i>	103
5.2.3	Aktywność kinazy ROCK a upośledzenie czynności śródbłonka naczyniowego	106
5.2.4	Aktywność kinazy CAMK2 a upośledzenie czynności śródbłonka naczyniowego	107
5.2.5	Dabrafenib a stres oksydacyjny i metabolizm komórkowy.....	108
5.2.6	Aktywacja kinaz jako kompensacyjna odpowiedź komórek śródbłonka na działanie dabrafenibu ...	110
5.3	Farmakologiczne strategie przeciwdziałania dysfunkcji śródbłonka wywołanej przez dabrafenib	111
5.3.1	Działanie fasudilu – inhibitora kinazy ROCK na czynność śródbłonka naczyniowego	111
5.3.2	Ochronne działanie inhibitorów CAMK2 na czynności śródbłonka naczyniowego	112
5.3.3	Ochronne działanie inhibitorów NOX (apocyniny i setanaxibu) oraz przeciwutleniacza mitochondrialnego (MitoTEMPO) na upośledzenie czynności śródbłonka naczyniowego wywołane przez dabrafenib	113
6	WNIOSKI	116
	BIBLIOGRAFIA.....	118
	SPIS PUBLIKACJI AUTORKI	140

WSPARCIE PROJEKTOWE

Przedstawiona rozprawa doktorska została zrealizowana dzięki wsparciu finansowemu z budżetów następujących projektów:

PRELUDIUM 8, Narodowe Centrum Nauki (UMO-2014/15/N/NZ7/02889)

Kierownik projektu **Mgr Elżbieta Buczek**

TEAM TECH Core Facility, Fundacja na Rzecz Nauki Polskiej, współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014 2020 (PO IR.04.04.00-00-5CAC/17-00)

Kierownik projektu **Prof. dr hab. Stefan Chłopicki**

MAESTRO 13, Narodowe Centrum Nauki (UMO 2021/42/A/NZ4/00273)

Kierownik projektu **Prof. dr hab. Stefan Chłopicki**

STRESZCZENIE

Nowotwory i choroby układu krążenia to najczęstsze przyczyny śmiertelności na świecie, których patogeneza ma wiele wspólnych mechanizmów i czynników ryzyka. Pacjenci onkologiczni oraz osoby, które przeżyły chorobę nowotworową wykazują wyższe ryzyko powikłań sercowo-naczyniowych związanych z dysfunkcją śródbłónka, która może być następstwem zarówno samej choroby nowotworowej, jak i leczenia przeciwnowotworowego. Aby rozwijać coraz lepsze strategie leczenia, ukierunkowane zarówno na wyleczenie choroby nowotworowej, jak i na ochronę śródbłónka naczyniowego, kluczowe jest zrozumienie złożonych mechanizmów leżących u podstaw rozwoju dysfunkcji śródbłónka u tych pacjentów.

Celem niniejszej pracy było zbadanie, jak przebieg choroby nowotworowej wpływa na czynność śródbłónka naczyniowego oraz jak wybrana terapia przeciwnowotworowa wpływa na czynność śródbłónka naczyniowego.

W pierwszej części przeprowadzonych doświadczeń zbadano zmiany funkcji śródbłónka oraz miejscową i ogólnoustrojową odpowiedź zapalną w toku rozwoju nowotworu w mysim modelu raka gruczołu sutkowego 4T1, który jest modelem często wykorzystywanym do badań związanych z progresją i leczeniem nowotworu piersi. W drugiej części badań oceniono wpływ wybranych leków przeciwnowotworowych: inhibitorów kinaz BRAF i MEK na czynność śródbłónka. Połączenie inhibitorów BRAF i MEK jest z powodzeniem stosowane jako terapia celowana w leczeniu chorób nowotworowych u pacjentów, u których stwierdza się obecność mutacji w genie kodującym kinazę BRAF. Jednocześnie u tych pacjentów zaobserwowano zwiększenie częstości incydentów sercowo-naczyniowych, których mechanizm nie został do tej pory wyjaśniony.

Przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej wyniki wskazują, że we wczesnym stadium choroby nowotworowej u myszy rozwija się stan zapalny w płucach. Ponadto, zarówno w płucach jak i w krążeniu obwodowym zmniejsza się dostępność tlenu azotu będącego kluczowym mediatorem naczynioprotekcyjnym. Natomiast zaawansowane stadium choroby nowotworowej, charakteryzujące się obecnością przerzutów w płucach, jest związane z bardzo silnym ogólnoustrojowym stanem zapalnym oraz z upośledzeniem zależnej od NO funkcji śródbłónka w aortalii, a także z kompensacyjnym zwiększeniem zależnej od COX-2 produkcji PGI₂. Wyniki te wskazują na istotną rolę wczesnych zmian w płucach, które torują drogę do rozwoju przerzutów, podczas gdy w zaawansowanym stadium choroby nowotworowej

występuje ogólnoustrojowy stan zapalny i obwodowa dysfunkcja śródbłónka, które przyczyniają się do dalszej progresji choroby.

Wyniki przedstawione w drugiej części rozprawy doktorskiej pozwoliły wykazać, że dabrafenib (inhibitor kinazy BRAF), ale nie trametynib (inhibitor MEK), upośledza funkcję śródbłónka naczyniowego po krótkotrwałej ekspozycji zarówno *ex vivo* jak i *in vivo*. Mechanizm dysfunkcji śródbłónka wywołanej inhibitorem BRAF może obejmować zmniejszoną aktywność śródbłonkowej syntazy tlenu azotu, zwiększoną produkcję reaktywnych form tlenu, a także zwiększenie aktywności niektórych kinaz, w tym szlaków ROCK i CAMK. Ponadto wykazano, że dabrafenib wpływa na metabolizm energetyczny komórek naczyń krwionośnych, co łącznie z aktywacją licznych kinaz, może stanowić efekt kompensacyjny w odpowiedzi na jego toksyczność naczyniową.

Przeprowadzone interwencje farmakologiczne *ex vivo* wykazały, że potencjalną strategią przeciwdziałania dysfunkcji śródbłónka wywołanej przez dabrafenib może być zastosowanie inhibitorów szlaku zależnego od aktywności kinazy CAMK oraz szlaku zależnego od kinazy ROCK, jak również zahamowanie produkcji reaktywnych form tlenu.

Podsumowując, w niniejszej rozprawie doktorskiej wykazano w modelach zwierzęcych upośledzenie czynności śródbłónka zarówno indukowane przez rozwój choroby nowotworowej jak i w następstwie działania badanych leków przeciwnowotworowych. Ponadto, wyniki interwencji farmakologicznych niwelujących niekorzystny wpływ dabrafenibu na śródbłonek, mają wysoki potencjał translacyjny ze względu na konieczność ochrony śródbłónka naczyniowego u pacjentów onkologicznych, która jest niezbędna dla zmniejszenia ryzyka występowania powikłań sercowo-naczyniowych w tej grupie pacjentów.

ABSTRACT

Cancer and cardiovascular diseases are the most common causes of mortality worldwide, the pathogenesis of which has many common mechanisms and risk factors. Oncological patients and cancer survivors are at higher risk of cardiovascular complications associated with endothelial dysfunction, which may be the consequence of both the cancer itself and anticancer treatment. It is crucial to understand the complex mechanisms underlying the development of endothelial dysfunction in these patients in order to develop efficient treatment strategies aimed at both curing the cancer and protecting the vascular endothelium.

The aim of this study was to investigate how cancer development affects the function of vascular endothelium and how selected anticancer therapeutics affect endothelial function.

In the first part of the conducted experiments changes in endothelial function as well as local and systemic inflammatory response during tumor development were examined in the murine orthotopic model of breast cancer 4T1, that is often used to study progression and treatment strategies of breast cancer. In the second part of the study, the effects of selected anticancer drugs, BRAF and MEK kinase inhibitors, on endothelial function were assessed. The combination of BRAF and MEK inhibitors is successfully used as a targeted therapy for BRAF-mutated cancers although the combination of these drugs substantially increases cardiovascular events in cancer patients treated with these drugs, and the mechanisms involved have not been elucidated.

The results presented in this doctoral dissertation indicate that the early stage of cancer development is associated with inflammation in the lungs. Moreover, the bioavailability of nitric oxide, a key vasoprotective mediator, is reduced in both the lungs and in the peripheral circulation. In contrast, the advanced stage of cancer, characterized by the presence of lung metastases, is associated with very strong systemic inflammation and with impaired NO- dependent endothelial function in the aorta, as well as with a compensatory increase in COX-2-dependent PGI₂ production. These results suggest that the early lung changes pave the way for development of pulmonary metastases, while the subsequent systemic inflammation and systemic endothelial dysfunction contribute to further progression of the neoplastic disease and its complications.

The results presented in the second part of the doctoral dissertation demonstrated that the BRAF kinase inhibitor dabrafenib, but not the MEK inhibitor trametinib, impairs vascular endothelial

function after short-term exposure both *ex vivo* and *in vivo*. The mechanism of BRAF inhibitor-induced endothelial dysfunction may include reduced activity of endothelial nitric oxide synthase, increased production of reactive oxygen species and increased activity of some kinases, including the ROCK and CAMK. Furthermore, dabrafenib has been found to affect the energy metabolism of vascular cells, which together with the activation of multiple kinases, may constitute a compensatory mechanism featuring vascular response to its vascular toxicity.

Pharmacological *ex vivo* interventions have shown that inhibition of CAMK-dependent pathway and ROCK-dependent pathway, as well as inhibition of reactive oxygen species production may constitute a potential strategy to counteract dabrafenib-induced endothelial dysfunction.

In summary, this doctoral thesis demonstrated impaired endothelial function in animal models, both as a consequence of tumor development and as a consequence of anticancer treatment. The results of pharmacological interventions that eliminated the adverse effects of dabrafenib on the endothelium may have translational value, as endothelial protection in cancer patients is essential to minimize their cardiovascular complications.

WYKAZ NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

4T1 – linia komórek nowotworowych mysiego raka gruczołu sutkowego

Ach (ang. acetylcholine) – Acetylocholina

AKT = PKB (ang. protein kinase B) – kinaza białkowa B/kinaza AKT

BRAF – serynowo-treoninowa kinaza białkowa B-Raf

CAMK (ang. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase) – kinazy białkowe zależne od Ca^{2+} i kalmoduliny

CAMK-IN-1 – inhibitor kinazy CAMK2

CDK (ang. cyclin-dependent kinases) – kinazy zależne od cyklin

COX (ang. cyclooxygenase) – cyklooksygenaza

DETC (ang. diethyldithiocarbamate) – dietylotiotiokarbaminian

DMEM (ang. Dulbecco's modified Eagle medium) – modyfikowane podłoże do hodowli komórkowych

ECAR (ang. extra-cellular acidification rate) – szybkość zewnątrzkomórkowego zakwaszania

ELISA (ang. enzyme-linked immunosorbent assay) – test immunoenzymatyczny

EndMT (ang. endothelial mesenchymal transition) – przejście śródbłonkowo mezenchymalne

eNOS (ang. endothelial nitric oxide synthase) – śródbłonkowa syntaza tlenu azotu

EPR (ang. electron paramagnetic resonance) – elektronowy rezonans paramagnetyczny

ERK (ang. extracellular signal-regulated kinase) – kinaza regulowana sygnałami pozakomórkowymi

FBS (ang. fetal bovine serum) – płodowa surowica bydlęca

GRA (ang. granulocytes) – granulocyty

GSK3 (ang. glycogen synthase kinase-3) – kinaza syntazy glikogenu 3

HCT (ang. hematocrit) – hematokryt

HGB (ang. hemoglobin concentration) – stężenie hemoglobiny

KH – bufor Krebsa Hansleita

KN-93 – inhibitor kinazy CAMK2

LC-MS (ang. liquid chromatography–mass spectrometry) – technika chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią mas

LIM – rodzina kinaz wiążących aktyny

LYM (ang. lymphocytes) – limfocyty

MAPK (ang. mitogen activated protein kinase) – kinaza aktywowana mitogenami

MCH (ang. mean cell hemoglobin) – średnia hemoglobina komórkowa

MCV (ang. mean cell volume) – średnia objętość krwinki czerwonej

MEK – kinaza aktywowana mitogenami w szlaku MAPK

MEM (ang. minimum essential medium) – syntetyczne podłoże do hodowli komórkowych

MLC (ang. myosin light chain) – lekki łańcuch miozyny

MLCK (ang. myosin light chain kinase) – kinaza łańcucha lekkiego miozyny

MLCP (ang. myosin light chain phosphatase) – fosfataza łańcucha lekkiego miozyny

MON (ang. monocytes) – monocyty

MPV (ang. mean platelet volume) – średnia objętość płytek krwi

MRI (ang. magnetic resonance imaging) – obrazowanie rezonansem magnetycznym
 NET (ang. neutrophil extracellular traps) – neutrofilowe sieci zewnątrzkomórkowe
 NF- κ B (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) – czynnik transkrypcyjny
 NO (ang. nitric oxide) – tlenek azotu
 NO-DETC – kompleks tlenku azotu i pułapki spinowej = NO-Fe²⁺(DETC)₂
 NOHb (ang. nitrosyl hemoglobin) – nitrozył hemoglobina
 NOX (ang. NADPH oxidase) – oksydaza NADPH
 OCR (ang. oxygen consumption rate) – szybkość zużycia tlenu
 PGI₂ (ang. prostacyclin) – prostacyklina
 PI3K (ang. phosphatidylinositol 3-kinase) – kinaza 3-fosfatydylinozytolu
 PKA (ang. protein kinase A) – rodzina kinaz białkowych A
 PKC (ang. protein kinase C) – rodzina kinaz białkowych C
 PKG (ang. protein kinase G) – rodzina kinaz białkowych G
 PKN1 (ang. protein kinase N1) – kinaza białkowa N1
 PLT (ang. platelets) – płytki krwi
 PRKA (ang. protein kinase cAMP-dependent) – kinaza białkowa A, aktywowana przez AMP
 PRKAC (ang. protein kinase cAMP-dependent catalytic subunit) – podjednostka katalityczna kinazy białkowej aktywowanej przez AMP
 PRKG (ang. protein kinase cGMP-dependent) – kinaza białkowa G
 qRT-PCR (ang. real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction) – reakcja łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym z odwrotną transkrypcją
 RAP-1 (ang. Ras-associated protein 1) – białko związane z Ras 1
 RAS – rodzina enzymów hydrolaz zwanych małymi GTPazami lub małymi białkami G
 RBC (ang. red blood cells) – krwinki czerwone, eryocyty
 Rho – mała GTPaza z rodziny RAS
 ROCK (=ROK α , ang. Rho-associated kinase) – kinaza związana z Rho
 ROS (ang. reactive oxygen species) – reaktywne formy tlenu, wolne rodniki tlenowe
 RPS6K (ang. ribosomal protein S6 kinase) – kinaza rybosomalna s6
 RSK (ang. ribosomal S6 kinase family) – rodzina kinaz rybosomalnych s6
 SAA (ang. serum amyloid A) – surowiczy amyloid A
 SAP (ang. serum amyloid protein) – surowicze białko amyloidu
 SEM (ang. standard error of measurement) – błąd standardowy
 SNP (ang. sodium nitroprusside) – nitroprusydek sodu
 STK (ang. serine threonine kinases) – kinazy serynowo treoninowe
 TNF (ang. tumor necrosis factor) – czynnik martwicy nowotworów
 UKA (ang. upstream kinase analysis) – analiza aktywności kinaz na podstawie fosforylacji substratów
 VCAM-1 (ang. vascular cell adhesion molecule 1) – cząsteczka adhezji komórkowej 1
 VEGF (ang. vascular endothelial growth factor) – czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego
 vWF (ang. von Willebrand factor) – czynnik von Willebranda
 WBC (ang. white blood cell) – krwinki białe

1 WSTĘP

Choroby układu krążenia i choroby nowotworowe są głównymi czynnikami, przyczyniającymi się do przedwczesnej umieralności na świecie. W Polsce, umieralność z powodu chorób układu krążenia i chorób nowotworowych stanowi przyczynę ponad 70% zgonów w ogólnej liczbie zgonów w Polsce (1). Choć uznawane za dwie zupełnie odrębne grupy chorób, w świetle obecnej wiedzy, są one ze sobą istotnie powiązane. Terapie przeciwnowotworowe, ciągle rozwijane i coraz skuteczniejsze, wiążą się z krótkoterminowym, jak i długoterminowym ryzykiem wystąpienia powikłań sercowo-naczyniowych u pacjentów onkologicznych, do których należą niewydolność serca ze zmniejszoną frakcją wyrzutową, arytmie, zakrzepica, nadciśnienie, czy niedotlenienie/zawał mięśnia sercowego. Potrzeba diagnozy, leczenia i zapobiegania tym niekorzystnym skutkom sercowo-naczyniowym u pacjentów onkologicznych, doprowadziła do rozwoju nowej dziedziny medycyny, zwanej kardioonkologią (2, 3).

Badania w ostatnich latach ujawniły jednak bardziej złożoną i dwukierunkową zależność między nowotworami a chorobami układu krążenia, wskazując na związek między chorobami serca a zapadalnością na raka, jego progresją i śmiertelnością (2). Obecność chorób układu krążenia stwierdza się u 17% do 43% pacjentów w momencie zdiagnozowania u nich choroby nowotworowej (4). W praktyce klinicznej choroby nowotworowe i choroby układu krążenia często współistnieją, ze względu na liczne wspólne czynniki ryzyka, takie jak wiek, palenie tytoniu, cukrzyca, otyłość, nadciśnienie, niska aktywność fizyczna oraz różne czynniki środowiskowe, w tym wysoko przetworzona dieta (5, 6). Oprócz wspólnych czynników ryzyka, rosnąca liczba dowodów eksperymentalnych i klinicznych wskazuje, że u podstaw obu tych patologii leżą wspólne mechanizmy, takie jak przewlekły stan zapalny, stres oksydacyjny, zaburzenia metaboliczne i hormonalne, dysbioza mikrobiologiczna, czy starzenie się komórek (6, 7).

Postępy w farmakologicznej terapii niewydolności serca znacznie zmniejszyły śmiertelność z przyczyn sercowo-naczyniowych, a w szczególności nagłą śmierć sercową, co istotnie zwiększyło liczbę pacjentów z przewlekłą niewydolnością serca. Jednocześnie u pacjentów tych wzrasta obciążenie chorobami współistniejącymi, wśród których wyraźnie zwiększone jest ryzyko wystąpienia wielu typów nowotworów. Z drugiej strony, dzięki postępowi w leczeniu chorób nowotworowych także wyraźnie spada śmiertelność

z ich powodu, natomiast wzrasta liczba pacjentów onkologicznych obciążonych chorobami współistniejącymi, wśród których choroby układu krążenia są najczęstszą przyczyną śmierci niezwiązaną bezpośrednio z chorobą nowotworową w tej grupie pacjentów (6, 7).

Niezbędne jest ciągle pogłębianie rozumienia patofizjologii chorób nowotworowych i chorób układu krążenia. Poznanie ich wspólnych mechanizmów na poziomie komórkowym i molekularnym, możliwe dzięki badaniom podstawowym, może w przyszłości zaowocować wykorzystaniem tej wiedzy w badaniach klinicznych i rozwojem bardziej skutecznych terapii onkologicznych, które ograniczałyby również zwiększone ryzyko sercowo-naczyniowe w tej grupie pacjentów.

1.1 ŚRÓDBŁONEK NACZYNIOWY I JEGO DYSFUNKCJA W CHOROBAH UKŁADU KRĄŻENIA

Istotną rolę w patogenezie chorób układu krążenia odgrywa dysfunkcja śródbłónka (8). Śródbłonek naczyniowy to pojedyncza warstwa wyspecjalizowanych komórek, wyściełająca wnętrze wszystkich naczyń krwionośnych i limfatycznych w organizmie. Przez dziesięciolecia badań naukowych, systematycznie wzrastała wiedza na temat jego ogromnej roli w prawidłowym funkcjonowaniu ludzkiego organizmu, jak i w patogenezie coraz liczniejszych chorób. Komórki śródbłónka produkując liczne aktywne cząsteczki (mediatory), odgrywają rolę w procesach takich jak krzepnięcie, stan zapalny, utrzymanie ciśnienia krwi, czy angiogeneza (9). Ich prawidłowa funkcja jest niezbędna w utrzymaniu homeostazy naczyniowej. Stanowią również barierę między krwią, a komórkami wszystkich tkanek i narządów, umożliwiając kontrolowaną wymianę substancji: dostarczanie tlenu i składników odżywczych oraz transport metabolitów (10). Komórki śródbłónka są też barierą dla patogenów oraz migrujących komórek nowotworowych (11, 12).

Dysfunkcja śródbłónka charakteryzuje się upośledzoną produkcją mediatorów chroniących naczynia krwionośne, takich jak tlenek azotu (NO) i prostacyklina (PGI₂) oraz nadmierną produkcją mediatorów prozapalnych, prooksydacyjnych i prozakrzepowych (13). Dysfunkcja śródbłónka często wiąże się także z utratą szczelności połączeń między komórkami i zwiększoną przepuszczalnością naczyń krwionośnych (14). Dysfunkcja śródbłónka zaburza homeostazę naczyń oraz prowadzi do powstawania zmian patologicznych, takich jak upośledzenie zdolności do rozkurczu naczyń krwionośnych, aktywacja płytek krwi, zaburzenia krzepnięcia, powstawanie zakrzepów, zwiększenie adhezji leukocytów, indukcji

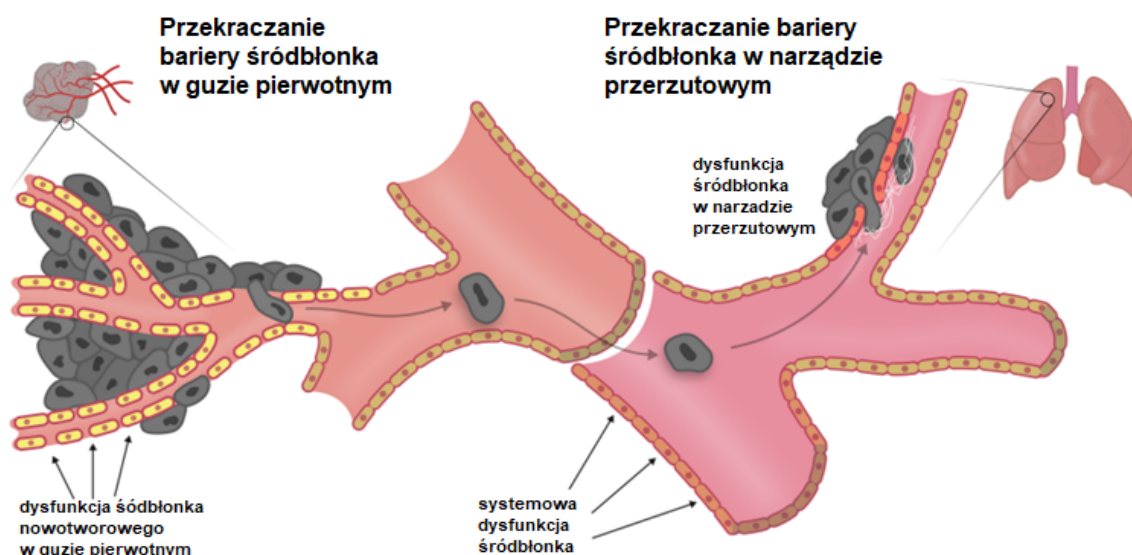
miejscowego stanu zapalnego oraz powstawanie zmian miażdżycowych. Dysfunkcja śródbłónka pojawia się, jako przyczyna lub następstwo, w wielu chorobach człowieka, od wspomnianych chorób układu sercowo-naczyniowego, poprzez metaboliczne, neurodegeneracyjne, zakaźne, aż po choroby nowotworowe (15).

1.2 ROLA ŚRÓDBŁONKA NACZYNIOWEGO W ROZWOJU CHOROÓB NOWOTWOROWYCH

Zarówno u pacjentów onkologicznych, jak i osób, które przeżyły chorobę nowotworową, obserwuje się powikłania sercowo-naczyniowe związane z rozwojem dysfunkcji śródbłónka o podobnych cechach, jakie opisano u pacjentów z miażdżycą, takich jak aktywacja układu hemostazy oraz nadmierna ekspresja cytokin i cząsteczek adhezyjnych przez komórki śródbłónka (16).

W toku progresji nowotworu, od wzrostu guza pierwotnego do powstania przerzutów, dochodzi do interakcji między komórkami nowotworowymi, a komórkami śródbłónka, na wszystkich etapach tego procesu (17). Rozwój guza wymaga tworzenia w nim nowych naczyń krwionośnych, w celu dostarczania tlenu i składników odżywczych, koniecznych do jego wzrostu i przeżycia. Komórki śródbłónka są odpowiedzialne za tworzenie nowych naczyń krwionośnych w procesie zwanym angiogenezą. Uwalniają one czynniki pro- angiogenne, m.in. czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (VEGF), proliferują i migrują, tworząc nowe naczynia włosowate w tkance guza. W niektórych przypadkach guzy mogą przejąć kontrolę nad istniejącymi naczyniami krwionośnymi (ang. vascular co-option) lub same tworzyć struktury przypominające naczynia (ang. vascular mimicry), omijając potrzebę tradycyjnej angiogenezy (18). W procesie przerzutowym komórki nowotworowe przekraczają barierę śródbłonkową, najpierw dostając się z tkanki guza pierwotnego do krwiobiegu (ang. intravasation), a następnie z naczynia krwionośnego do tkanki (tzw. ekstrawazacja, ang. extravasation) w docelowym narządzie np. płucu, mózgu, wątrobie czy kości (Rycina 1). Mechanizmy molekularne leżące u podstaw tych procesów, takie jak wzajemne oddziaływanie komórek nowotworowych i komórek śródbłónka oraz prozapalne zmiany fenotypu śródbłónka, są przedmiotem ciągłych badań. Dotychczasowe badania wskazują, że migracja i inwazja krążących komórek nowotworowych do odległych tkanek jest wspierana przez te same mechanizmy, które są zaangażowane w rekrutację leukocytów z krwi do tkanek (12). Komórki nowotworowe mogą reagować na chemokiny i cząsteczki adhezji komórkowej zaangażowane w transport leukocytów i odpowiedź zapalną śródbłónka (19, 20).

Badania *in vitro* wykazały, że czynniki uwalniane z dysfunkcyjnego śródbłónka aktywują szlaki sygnałowe NF- κ B i STAT3 w komórkach nowotworowych i zwiększają ich inwazyjność (21). Natomiast mediatory chroniące naczynia krwionośne, takie jak tlenek azotu (NO) i tlenek węgla (CO), hamują przyleganie i transmigrację komórek nowotworowych przez śródbłonek (22, 23). Prostacyklina (PGI₂) i związki uwalniające PGI₂ mają natomiast udowodnione w badaniach *in vivo* działanie przeciwp przerzutowe, co dodatkowo potwierdza kluczowy związek między funkcją śródbłónka, jego naczynioprotekcyjnymi mediatorami, a przerzutami nowotworowymi (24–27).



Rycina 1. Dysfunkcja śródbłónka w toku rozwoju choroby nowotworowej. Rycina na podstawie Smęda i wsp. 2020, zmodyfikowano (17).

1.3 DYSFUNKCJA ŚRÓDBŁÓNKA JAKO NASTĘPSTWO RÓŻNYCH TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWYCH

Obok samej choroby nowotworowej, bardzo istotny wpływ na rozwój dysfunkcji śródbłónka u pacjentów onkologicznych mają leki stosowane w terapii nowotworów. Leki określane zbiorczo mianem chemioterapii, które były jako pierwsze stosowane do leczenia nowotworów osobno lub w połączeniu z radioterapią, mają działanie antyproliferacyjne

i toksyczne na komórki będące w fazie podziału, czyli zarówno intensywnie dzielące się komórki nowotworowe jak i pozostałe komórki organizmu. Leki cytotoksyczne można podzielić, uwzględniając ich mechanizm działania, na antybiotyki przeciwnowotworowe (np. bleomycyna i antracykliny), alkaloidy roślinne (np. taksany, alkaloidy barwinka), substancje alkilujące (np. cisplatyna, cyklofosfamid) i antymetabolity (np. 5-Fluorouracyl) (28). Leki te powodują szeroko pojętą toksyczność sercowo-naczyniową, której mechanizmy obejmują: wytwarzanie reaktywnych form tlenu i stres oksydacyjny, uszkodzenia komórek śródbłonna i kardiomiocytów, zaburzenia homeostazy wapnia, zaburzenia funkcji mitochondriów, stan zapalny, czy skurcz naczyń, czego następstwem mogą być nadciśnienie, zakrzepica, uszkodzenia mięśnia sercowego, zwłóknienia tkanki serca, arytmie, kardiomiopatie i niewydolność serca (28).

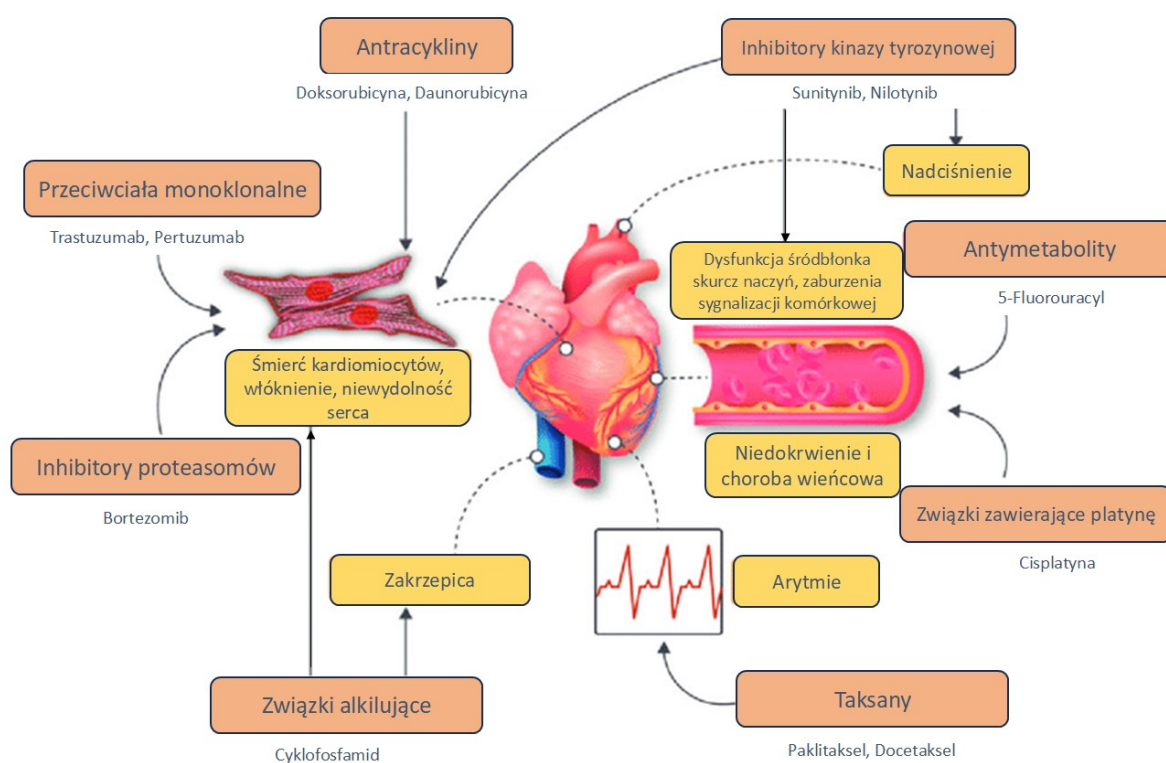
Wśród klasycznych leków chemioterapeutycznych prawdopodobnie najlepiej przebadane pod względem toksycznego działania na śródbłonek są antracykliny (Dokсорubicyna, Daunorubicyna) (29), używane w leczeniu chorych na liczne nowotwory lite i hematologiczne (np. mięsaki, nowotwór piersi, chłoniak Hodgkina, szpiczak mnogi). Mechanizmy toksyczności antracyklin, tak jak i mechanizmy stojące za ich działaniem przeciwnowotworowym, są złożone. W badaniach *in vitro* oraz na izolowanych naczyniach wykazano toksyczne działanie antracyklin na komórki śródbłonna, objawiające się akumulacją tych związków wewnątrz jądra komórkowego, uszkodzeniem DNA, upośledzoną produkcją NO, generowaniem ROS oraz zaburzoną nanomechaniką komórek śródbłonna w postaci zwiększonej sztywności błony komórek śródbłonna (29). Antracykliny wbudowują się w DNA, tworząc addukty z DNA i zakłócając proces replikacji. Zahamowanie aktywności topoizomerazy-II β , prowadzi do akumulacji pęknięć DNA, co ostatecznie powoduje apoptotyczną śmierć komórek (30). W badaniach na myszach wykazano, że specyficzna dla kardiomiocytów delecja genu kodującego topoizomerazę-II β chroni przed rozwojem niewydolności serca wywołanej przez dokсорubicynę (30). Inne badania *in vivo* wykazały, że u myszy leczonych dokсорubicyną upośledzenie zależnej od śródbłonna czynności naczyń i sztywność tętnic wyprzedzają rozwój dysfunkcji serca w postaci obniżonej frakcji wyrzutowej lewej komory i są związane ze wzrostem w ścianie aorty poziomu trombospondyny-1 (THBS1) i alfa-1-antychymotrypsyny (SERPINA3), które są również podwyższone w osoczu pacjentów doświadczających kardiotoxyczności wywołanej antracyklinami (31). W kolejnych badaniach stwierdzono u myszy leczonych dokсорubicyną objawy włóknienia serca połączone ze wzrostem stężenia cytokin prozapalnych takich jak IL-6, IL-1 β i TNF (ang. tumor necrosis

factor) oraz spadkiem przeciwzapalnej IL-10 (32). Dokсорubicyna powoduje także dysfunkcję mitochondriów, uszkadza mitochondrialne DNA (mtDNA), hamuje funkcję łańcucha oddechowego mitochondriów i obniża poziom ATP w kardiomiocytach, jednocześnie silnie indukuje produkcję reaktywnych form tlenu (33). W komórkach śródbłónki dokсорubicyna nasila stres oksydacyjny, zwiększając produkcję ROS, zarówno przez eNOS jak i mitochondria, co prowadzi do uszkodzenia oksydacyjnego tych komórek (34, 35). Dokсорubicyna może także indukować stan prozakrzepowy naczyń poprzez zwiększenie ekspresji czynnika tkankowego i zmniejszenie ekspresji trombomoduliny, co prowadzi do zwiększonej adhezji i agregacji płytek krwi (36). Ponadto dokсорubicyna zaburza homeostazę wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} , niezbędnego do prawidłowej kurczliwości serca, co także przyczynia się do niewydolności tego narządu (37). Pomimo wielu badań dotyczących mechanizmów toksyczności dokсорubicyny, jak dotąd nie opracowano skutecznego sposobu przeciwdziałania jej kardiotoksycznemu działaniu, które jest wciąż dość częstym powikłaniem jej stosowania u pacjentów onkologicznych.

Pomimo licznych działań ubocznych, chemioterapia, stosowana samodzielnie lub w połączeniu z radioterapią, stanowi podstawę leczenia chorób nowotworowych od dziesiątek lat. Ciągły rozwój badań podstawowych i medycyny translacyjnej skutkuje natomiast wprowadzaniem do praktyki klinicznej coraz lepszych i skuteczniejszych terapii przeciwnowotworowych. W ciągu ostatnich dekad nastąpił bezprecedensowy postęp w zrozumieniu biologii nowotworów na poziomie molekularnym. Narzędzia, takie jak sekwencjonowanie nowej generacji i sekwencjonowanie RNA, znacznie poprawiły zdolność wykrywania predykcyjnych i prognostycznych zmian molekularnych guza, co doprowadziło do zmiany paradygmatu w leczeniu pacjentów z chorobami nowotworowymi w kierunku spersonalizowanego leczenia, dobranego na podstawie indywidualnych profili genetycznych pacjentów, w celu zwiększenia skuteczności i zmniejszenia skutków ubocznych (38). Terapia celowana ukierunkowana jest na konkretne zmiany molekularne w komórkach nowotworowych, odpowiedzialne za ich niekontrolowany wzrost i przeżycie. W przeciwieństwie do tradycyjnej chemioterapii, która wpływa na wszystkie szybko dzielące się komórki, terapia celowana działa poprzez blokowanie określonych białek lub genów w komórkach nowotworowych za pomocą przeciwciał monoklonalnych lub leków małocząsteczkowych. Do tej grupy należą m.in. inhibitory czynnika wzrostu śródbłónki naczyniowego (ang. VEGF inhibitors), hamujące wzrost guza przez zahamowanie tworzenia w nim nowych naczyń krwionośnych, inhibitory kinazy tyrozynowej, inhibitory proteasomów,

a także przeciwciała monoklonalne, skierowane przeciw antygenom nowotworowym oraz inhibitory punktów kontrolnych układu odpornościowego (ang. immune checkpoint inhibitors), pozwalające wykorzystać układ odporności organizmu pacjenta do walki z rozwijającą się chorobą nowotworową (39).

Okazuje się jednak, że podobnie jak w przypadku klasycznej chemioterapii, terapie celowane, wbrew oczekiwaniom, także powodują u pacjentów powikłania sercowo naczyniowe, u podłoża których leży dysfunkcja śródbłónka naczyniowego, a należą do nich nadciśnienie, zdarzenia zakrzepowo-zatorowe, arytmie, czy niewydolność serca (**Rycina 2**) (39, 40).



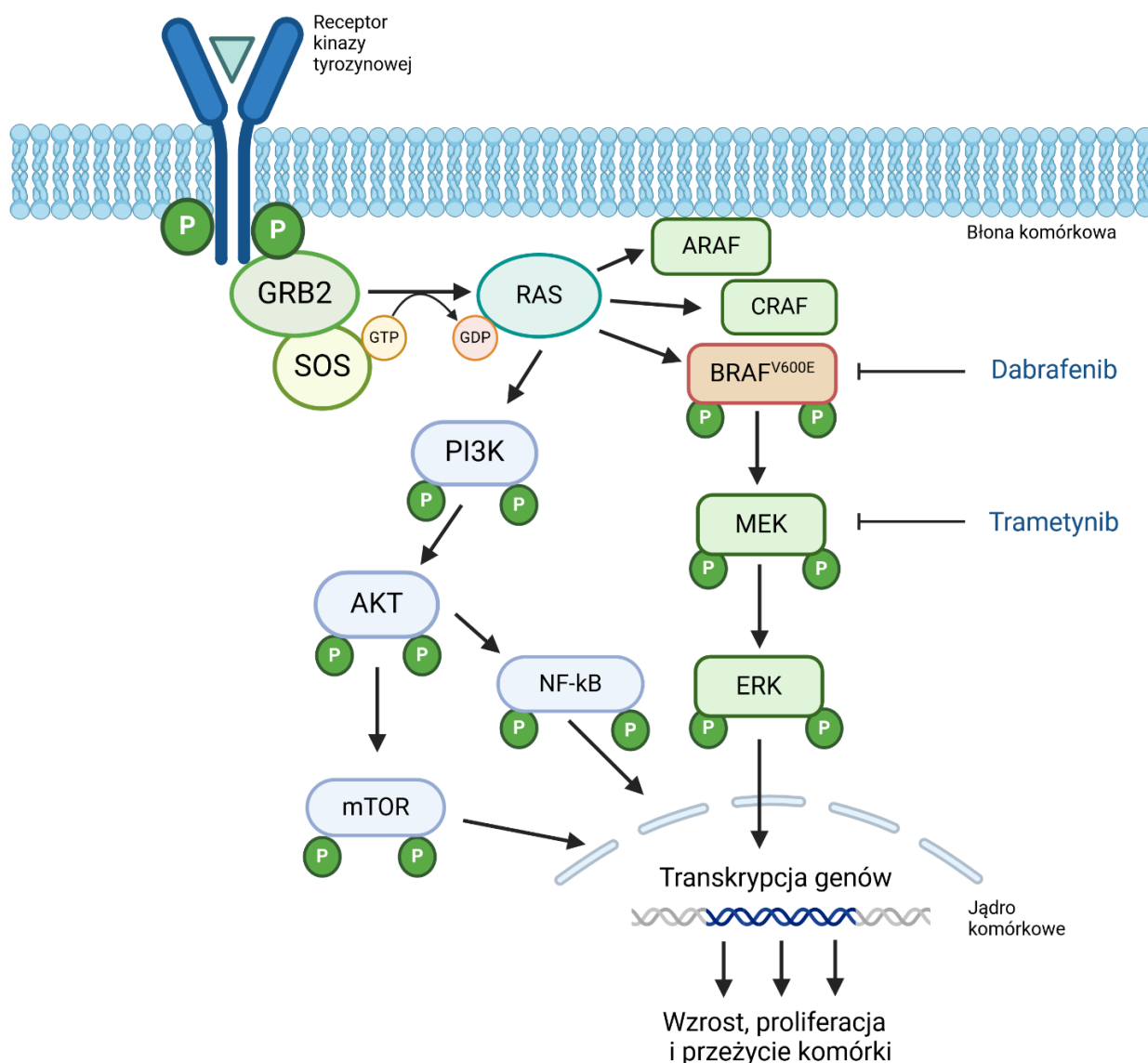
Rycina 2. Toksyczne działanie różnych leków przeciwnowotworowych na układ sercowo - naczyniowy. Rycina na podstawie Sayed i wsp. 2019, zmodyfikowano (39).

1.4 INHIBITORY KINAZ BRAF I MEK JAKO PRZYKŁAD TERAPII CELOWANEJ O NEGATYWNYM DZIAŁANIU NA UKŁAD KRAŻENIA

Inhibitory kinaz BRAF i MEK są stosowane w leczeniu nowotworów u pacjentów posiadających specyficzną mutację w genie *BRAF*. Białko BRAF, posiadające aktywność kinazy serynowo-treoninowej, jest składnikiem szlaku sygnałowego MAPK (ang. mitogen activated protein kinase), czyli kinaz białkowych aktywowanych tzw. mitogenami (czynniki wzrostu). Szlak MAPK składa się z kaskady RAS–RAF–MEK–ERK, która odgrywa kluczową rolę w regulacji wzrostu komórek, proliferacji i przeżycia. Jednak w niektórych przypadkach mutacje w genie *BRAF*, takie jak mutacje V600E lub V600K, prowadzą do konstytutywnej aktywacji białka BRAF, skutkującej stałym wzrostem aktywności całego szlaku MAPK, co prowadzi do niekontrolowanej proliferacji komórek i rozwoju chorób nowotworowych, m.in. czerniaka i raka jelita grubego (41, 42).

Wprowadzenie terapii celowanej inhibitorami BRAF, do których należą dabrafenib, encorafenib i vemurafenib, było przełomem w leczeniu nowotworów u pacjentów z mutacją genu *BRAF*. Jednak pomimo ich niezwyklej skuteczności, u wielu pacjentów z czasem rozwija się oporność na lek, głównie poprzez reaktywację szlaku MAPK za pomocą różnych mechanizmów kompensacyjnych, takich jak aktywacja innych izoform RAF, zwiększenie aktywacji receptorów TK lub amplifikacja i alternatywne składanie BRAF (43, 44). W celu zminimalizowania oporności na leczenie, wprowadzono inhibitory kinazy MEK, do których należą trametynib, binimetynib, kobimetynib i selumetynib, ukierunkowane na białko MEK, występujące w szlaku sygnałowym MAPK. Terapia skojarzona inhibitorami BRAF i MEK spowodowała poprawę odpowiedzi na leczenie, wydłużenie czasu przeżycia bez progresji i ogólnego przeżycia pacjentów w porównaniu z monoterapią.

Dabrafenib to selektywny inhibitor, który wiąże się z miejscem wiązania ATP zmutowanego białka BRAF, hamując jego aktywność kinazową i aktywację kolejnych cząsteczek sygnałowych, czyli MEK (kinaza MAPK/ERK) i ERK (kinaza regulowana sygnałem pozakomórkowym). Trametynib jest ukierunkowany na MEK, kolejne białko w szlaku sygnałowym. Hamując zarówno BRAF, jak i MEK, terapia skojarzona zapewnia bardziej kompleksową blokadę szlaku MAPK, co skutkuje poprawą aktywności przeciwnowotworowej (45). Szlak sygnałowy MAPK oraz miejsca hamującego działania dabrafenibu i trametynibu przedstawia **Rycina 3**.



Rycina 3. Hamujące działanie dabrafenibu i trametynibu na kinazy w szlaku MAPK. Rycinę przygotowano z wykorzystaniem <https://BioRender.com>

Szlak kinaz MAPK, nieprawidłowo aktywowany w zmutowanych komórkach nowotworowych, odgrywa rolę w wielu istotnych funkcjach komórkowych, w tym we wzroście, różnicowaniu i przeżyciu komórek (46). Dabrafenib jest selektywny dla komórek z mutacją genu *BRAF*, ale nie można wykluczyć jego oddziaływania na prawidłowe komórki, prowadzącego do potencjalnych skutków ubocznych. Podczas gdy trametynib hamuje kinazę MEK i wpływa na szlak MAPK zarówno w komórkach nowotworowych, jak i normalnych, jego wpływ na zdrowe tkanki ogranicza dawki, które można bezpiecznie stosować (47).

Terapia celowana inhibitorami BRAF i MEK znacznie poprawiła kontrolę choroby i przeżycie pacjentów chorych na nowotwory takie jak czerniak, niedrobnokomórkowy rak płuc i rak jelita grubego. Niestety, wysoka skuteczność przeciwnowotworowa tych leków idzie w parze z niepożądanymi powikłaniami sercowo-naczyniowymi, takimi jak nadciśnienie, dysfunkcja lewej komory, czy żylna choroba zakrzepowo-zatorowa (46). Mechanizmy molekularne leżące u podłoża obserwowanych u pacjentów powikłań nie są w pełni poznane. Ponadto nie jest jasne, inhibitor której z kinaz, BRAF czy MEK, jest odpowiedzialny za toksyczność sercowo-naczyniową skojarzonego schematu leczenia. Dlatego do badań nad negatywnym wpływem leków przeciwnowotworowych na czynność śródbłoka naczyniowego, w ramach pracy doktorskiej, wybrano dabrafenib i trametynib, jako reprezentatywne leki skojarzonej terapii inhibitorami BRAF i MEK.

2 CEL PRACY

Pacjenci onkologiczni są szczególnie narażeni na rozwój dysfunkcji śródbłónka, z jednej strony wywołanej toczącym się procesem nowotworowym, z drugiej strony będącej skutkiem zastosowanego leczenia przeciwnowotworowego. W celu zapobiegania powikłaniom sercowo-naczyniowym u tych pacjentów oraz zwiększenia skuteczności i bezpieczeństwa stosowanych terapii, konieczne jest lepsze zrozumienie mechanizmów leżących u podłoża dysfunkcji śródbłónka rozwijającej się w toku choroby nowotworowej i leczenia onkologicznego. To zagadnienie stało się celem badań przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej.

W szczególności, przedstawiona praca doktorska miała następujące cele:

1. Zbadanie zmian czynności śródbłónka naczyniowego w toku progresji choroby nowotworowej w mysim ortotopowym modelu raka gruczołu sutkowego, ze szczególnym uwzględnieniem ich związku czasowego z rozwojem przerzutów oraz rozwojem lokalnego stanu zapalnego w płucach i stanu zapalnego o charakterze ogólnoustrojowym.
2. Zbadanie wpływu leków przeciwnowotworowych z grupy inhibitorów kinaz BRAF i MEK wykorzystywanych w tzw. terapii celowanej na funkcję śródbłónka naczyniowego oraz wyjaśnienie mechanizmów odpowiedzialnych za ich niekorzystne działanie na czynność śródbłónka.
3. Podjęcie próby farmakologicznego odwrócenia dysfunkcji śródbłónka naczyniowego wywołanej przez dabrafenib (inhibitor kinaz BRAF), w oparciu o zdobytą wiedzę dotyczącą profilu jego działania na śródbłonek.

Pierwszą część rozprawy doktorskiej stanowią wyniki opublikowane w pracy:

E. Buczek, A. Denslow, L. Mateuszuk, B. Proniewski, T. Wojcik, B. Sitek, A. Fedorowicz, A. Jaształ, E. Kus, A. Chmura-Skirlinska, R. Gurbiel, J. Wietrzyk, S. Chlopicki *Alterations in NO- and PGI₂- dependent function in aorta in the orthotopic murine model of metastatic 4T1 breast cancer: Relationship with pulmonary endothelial dysfunction and systemic inflammation*. BMC Cancer (2018) 18:582 doi: 10.1186/s12885-018-4445-z

Druga część pracy doktorskiej zawiera nieopublikowane wyniki, które stanowią główną część przygotowywanej obecnie publikacji.

3 METODYKA

3.1 OCENA ZMIAN CZYNNOŚCI ŚRÓDBŁONKA W TOKU ROZWOJU NOWOTWORU W MYSIM ORTOTOPOWYM MODELU RAKA GRUCZOŁU SUTKOWEGO

Spośród różnych mysich modeli chorób nowotworowych, do badania lokalnej i systemowej odpowiedzi śródbłónka wybrano ortotopowy model mysiego raka gruczołu sutkowego. W modelu tym komórki nowotworowe 4T1 są wszczepiane do tkanki, z której zostały pierwotnie wyizolowane – gruczołu sutkowego u zdrowych myszy z prawidłowo funkcjonującym układem odpornościowym. Tworzą one guzy pierwotne, które następnie stanowią źródło komórek przerzutujących głównie do płuc.

3.1.1 Linia komórek nowotworowych 4T1

Komórki 4T1 zostały po raz pierwszy wyizolowane z gruczolaka sutka, który spontanicznie powstał u myszy szczepu BALB/c. Linię komórek 4T1 wykorzystywaną w doświadczeniach zakupiono w American Type Culture Collection (ATCC, Stany Zjednoczone). Komórki hodowano w medium RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Polska) z podłożem Opti-MEM® (Life Technologies, Stany Zjednoczone) (1:1 v/v) i 5% płodowej surowicy bydlęcej (HyClone, Thermo Scientific, Stany Zjednoczone). Do medium hodowlanego dodatkowo dodano glukozę (4,5 g/l), glutaminę (2 mM) i pirogronian sodu (1,0 mM), które zostały zakupione w Sigma-Aldrich. Ponadto, do medium hodowlanego dodano antybiotyki (100 U/ml penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny; Polfa Tarchomin, Polska). Hodowle komórek utrzymywano w temperaturze 37°C w wilgotnej atmosferze z 5% CO₂ i regularnie testowano na obecność Mycoplasma przy użyciu zestawu MycoAlert Mycoplasma Detection Kit (Lonza, Szwajcaria).

3.1.2 Myszy BALB/c

Samice myszy szczepu BALB/c zakupiono w Charles River Laboratories Polska - Anima Lab (Poznań, Polska). Zwierzęta utrzymywano w indywidualnie wentylowanych klatkach hodowlanych, w pomieszczeniu o kontrolowanych warunkach temperatury i wilgotności, z 12-godzinnym cyklem dzień/noc, w warunkach wolnych od patogenów (SPF) i karmiono standardową laboratoryjną dietą z dostępem do wody *ad libitum*.

Zgodnie z wytycznymi Dyrektywy Parlamentu Europejskiego 2010/63/UE w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych, wszystkie procedury doświadczalne stosowane w badaniu zostały zatwierdzone przez Pierwszą Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach przy Uniwersytecie Jagiellońskim (Kraków, Polska), numer zezwolenia: 140/2013.

3.1.3 Mysi ortotopowy model raka gruczołu sutkowego 4T1

Ilość wszczepianych myszom komórek nowotworowych (10 tys./mysz) dobrano na podstawie wcześniejszych doświadczeń tak, aby czas rozwoju nowotworu do stadium zaawansowanego wynosił około 6 tygodni. Komórki 4T1 zawieszone w 0,05 ml buforu Hank's Balanced Salt Solution (Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone) wszczepiano ortotopowo do prawego gruczołu sutkowego samic myszy BALB/c. Zwierzętom z grup kontrolnych podawano do prawego gruczołu sutkowego 0,05 ml buforu Hank's Balanced Salt Solution. W punktach czasowych 2, 4, 5 i 6 tygodni od wykonania podania ortotopowego zwierzęta z grup badanych i kontrolnych poddawano eutanazji poprzez dootrzewnowe (*i.p.*) podanie mieszaniny ketaminy i ksylazyny (100 mg ketaminy i 10 mg ksylazyny/kg masy ciała). Próbkę krwi pobierano z prawej komory serca za pomocą strzykawki zawierającej środek przeciwzkrzepowy (EDTA 1,6 mg/ml). Następnie izolowano i zabezpieczano aorty, płuca i guzy pierwotne do dalszych analiz. W celu uzyskania osocza oraz erytrocytów do dalszych analiz, próbki krwi wirowano przez 5 minut (1000 x g, 4°C).

3.1.4 Ocena wzrostu guza pierwotnego i liczby przerzutów w płucach myszy BALB/c

Guzy pierwotne po wycięciu wypreparowano z otaczających tkanek i zważono. Wyizolowane płuca przemyto solą fizjologiczną, zważono i utrwalono 4% buforowanym roztworem formaliny. Liczba przerzutów została oceniona makroskopowo, widoczne na powierzchni płuc miejsca przerzutów zostały zliczone przy użyciu lupy stereoskopowej.

3.1.5 Analiza histologiczna i immunohistochemiczna płuc myszy BALB/c

Po makroskopowej analizie liczby przerzutów, płuca przygotowano metodą parafinową do analiz histologicznych i immunohistochemicznych. W szczególności, bloczki parafinowe pocięto na skrawki o grubości 6 µm na obrotowym mikrotomie Accu-Cut® SRM™ 200 (Sakura Finetek, Stany Zjednoczone) i barwiono hematoksyliną i eozyną. Badanie mikroskopowe i dokumentacja fotograficzna zostały wykonane przy użyciu mikroskopu

Olympus BX53F wyposażonego w aparat cyfrowy. Zdjęcia wykonywano przy powiększeniu 20x i 200x.

Ekspresję wybranych białek, których zmiany mogą świadczyć o dysfunkcji komórek śródbłónka w naczyniach krwionośnych płuc, oceniono metodą barwienia immunohistochemicznego. Po deparafinizacji, skrawki poddano wstępnej obróbce zgodnie z protokołem HIER opartym na cytrynianie, a następnie inkubowano w roztworze 5% surowicy koziej (Jackson ImmunoResearch, Stany Zjednoczone) i 2% mleka, aby zminimalizować niespecyficzne wiązanie przeciwciał. Zastosowano pierwotne przeciwciała szczurze anti- mysie VCAM-1 (1:100, Abcam, Wielka Brytania) lub królicze anti-mysie vWF (1:500, Abcam), a następnie dopasowane gatunkowo przeciwciała drugorzędowe sprzężone z barwnikiem fluorescencyjnym Cy3 (Jackson ImmunoResearch). Obrazy uzyskano przy użyciu odwróconego mikroskopu fluorescencyjnego AxioObserver D2 (Carl Zeiss, Niemcy) i monochromatycznej kamery cyfrowej AxioCam HRm. Intensywność fluorescencji analizowano automatycznie za pomocą oprogramowania Columbus (Perkin Elmer, Stany Zjednoczone).

3.1.6 Ocena zależnej od NO czynności śródbłónka naczyniowego izolowanych krążków aorty myszy BALB/c

Czynność śródbłónka naczyniowego oceniano przy użyciu klasycznego miografu naczyniowego 620M DMT (Danish Myo Technology, Dania). Wypreparowane aorty oczyszczano w buforze Krebsa-Henseleita (KH) (pH = 7,4), a następnie cięto na krążki o długości 2mm, które zawieszano i poddawano stabilizacji w komorze miografu wypełnionej 5ml buforu KH, napowietrzanym karbogenem (5% CO₂ i 95% O₂), w temperaturze 37°C. Następnie krążki stopniowo naciągano do osiągnięcia docelowego naciągu 10mN. Po procesie normalizacji, badano odpowiedzi skurczowe naczyń na chlorek potasu (KCl, 30 mM, 60 mM) i fenylefryny (Phe, 3 μM). Funkcja śródbłónka zależna od NO została zmierzona w naczyniach wstępnie skurczonych fenylefryną (Phe, 0,1–1 μM) na podstawie ich odpowiedzi rozkurczowej na acetylocholinę (Ach; 0,01–10 μM). Rozkurcz naczyń krwionośnych niezależny od śródbłónka został wywołany przy użyciu nitroprusydku sodu (SNP; 0,001–1 μM). Aby upewnić się, że cała odpowiedź wywołana przez Ach była zależna od NO, odpowiedź na Ach została również zmierzona w obecności L-NAME. Odpowiedzi zostały zarejestrowane przy użyciu systemu zbierania danych i oprogramowania Power Lab (Lab Chart, AD Instruments, Australia). Ach, Phe, SNP i L-NAME zakupiono od firmy Sigma (Polska).

3.1.7 Ocena produkcji azotynów w izolowanych krążkach aorty myszy BALB/c

Podstawową produkcję NO przez śródbłonek naczyniowy aorty oceniono na podstawie pomiarów stężenia azotynów (NO_2^-), które są głównym stabilnym produktem utleniania tlenu azotu w roztworze. Krążki wyizolowanej aorty otwierano przez rozcięcie wzdłuż, umieszczano w 96-dołkowej płytce śródbłonkiem skierowanym ku górze i inkubowano przez 1 godzinę w 120 μl buforu KH w temperaturze 37°C przy użyciu specjalnie zaprojektowanej zamkniętej komory BIO-V (Noxygen, Niemcy), która została wypełniona karbogenem (95% O_2 , 5% CO_2). Następnie próbki buforu umieszczano na lodzie i wykorzystywano do pomiaru azotynów przy użyciu analizatora tlenu azotu Sievers* NOA 280i, zgodnie z instrukcją producenta. Uśredniony sygnał pusty (bez krążków aorty) dla danego doświadczenia został odjęty jako sygnał tła, aby uwzględnić zanieczyszczenie buforu i/lub atmosfery laboratoryjnej azotynem. Po zakończeniu doświadczenia krążki aorty wysuszono i zważono. Stężenie azotynu wyrażono jako ng/ml/mg suchej masy krążków aorty.

3.1.8 Ocena produkcji prostacykliny w krążkach aorty myszy BALB/c

Produkcja prostacykliny (PGI_2) przez krążki aorty mysiej została zbadana na podstawie stężenia 6-keto $\text{PGF}1\alpha$, będącego stabilnym metabolitem PGI_2 , w buforze po inkubacji krążków aorty. Krążki aorty inkubowano w temperaturze 37°C na termobloku (Liebisch Labortechnik, Niemcy) w 1 ml buforu KH, bez lub w obecności selektywnego inhibitora COX-2 DuP-697 (1 μM , Tocris Bioscience, Wielka Brytania) lub nieselektywnego inhibitora COX-1/COX-2 indometacyny (5 μM , Sigma Aldrich, Polska). Ponieważ DuP-697 i indometacyna były rozpuszczone w DMSO, również krążki kontrolne inkubowano z DMSO (1 $\mu\text{l/ml}$). Po wstępnej inkubacji, krążki aorty umieszczono w świeżym buforze i inkubowano bez lub w obecności inhibitorów przez 30 min. Próbki buforu pobrano po upływie 3 i 30 minut inkubacji. Stężenie 6-keto- $\text{PGF}1\alpha$ mierzono przy użyciu zestawu ELISA (Enzo, Stany Zjednoczone). Produkcja PGI_2 została obliczona jako różnica między końcowym a początkowym stężeniem 6-keto $\text{PGF}1\alpha$ i wyrażona jako pg/ml/mg suchej masy krążków aorty.

3.1.9 Ocena ekspresji czynnika von Willebranda w śródbłonku aorty myszy BALB/c

Krażki aorty zamrożono w związku OCT (Thermo Scientific, Stany Zjednoczone) w temperaturze -80°C . Bloczki pocięto przy użyciu automatycznego kriostatu Leica CM1950 (Leica Biosystems, Niemcy) na skrawki o grubości $10\mu\text{m}$ i umieszczono na pokrytych poli-L-lizyną (Sigma-Aldrich) szkiełkach mikroskopowych (Super Frost, Mentzel Gläser, Niemcy), po czym utrwalono acetonem (10 min). Następnie przeprowadzono wstępną inkubację skrawków na szkiełkach mikroskopowych z roztworem 2,5% surowicy końskiej (VectorLabs, Stany Zjednoczone) i 2% mleka, aby zminimalizować niespecyficzne wiązanie przeciwciał. Analizę immunohistochemiczną ekspresji czynnika von Willebranda w śródbłonku wykonano z użyciem przeciwciał pierwszorzędowych: poliklonalne królicze przeciwciała anty-mysie vWF (1:500, Abcam), oraz dopasowanych przeciwciał drugorzędowych: biotynylowane końskie przeciwciała anty-królicze (Vector Labs, Stany Zjednoczone) i znacznika fluorescencyjnego Cy3-sprzężonego ze streptawidyną (Jackson Immuno Research, Stany Zjednoczone). Obrazy uzyskano za pomocą odwróconego mikroskopu fluorescencyjnego AxioObserver D2 (Carl Zeiss, Niemcy) połączonego z monochromatyczną kamerą cyfrową AxioCam HRm. Intensywność fluorescencji analizowano automatycznie za pomocą oprogramowania Columbus (Perkin Elmer, Stany Zjednoczone).

3.1.10 Ocena produkcji NO w izolowanym perfundowanym płucu myszy BALB/c

Doświadczenia na izolowanym płucu mysim przeprowadzono z użyciem aparatury do perfuzji izolowanego płuca (Isolated Lung Perfusion Systems, Hugo Sachs Elektronik, HSE, Niemcy), we współpracy z dr A. Fedorowiczem (JCET, UJ), zgodnie z wcześniej opisaną metodologią (47). Płuca izolowano od znieczulonych (pentobarbiton, 140 mg/kg , *i.p.*) zwierząt i perfundowano je przy stałym, nierecyklującym przepływie około $1,5\text{ ml/min}$ DMEM o niskim stężeniu glukozy, z 4% albuminy i 0,3% HEPES, montowano w sztucznej klatce piersiowej z płaszczem wodnym (HSE) i wentylowano ciśnieniem ujemnym z częstością 90 oddechów/min. Ciśnienie końcowo-wydechowe w komorze ustawiono na $-3\text{ cm H}_2\text{O}$, a ciśnienie wdechowe regulowano w zakresie od -6 do $-10\text{ cm H}_2\text{O}$, aby uzyskać początkową objętość oddechową (TV) około $0,2\text{ ml}$. Co 5 minut podczas doświadczenia automatycznie inicjowano głęboki oddech o ciśnieniu końcowo-wdechowym $-21\text{ cm H}_2\text{O}$, aby uniknąć zapadnięcia płuca. Płuca po zawieszeniu pozostawiono do stabilizacji przez 15 minut pod perfuzją, po czym pobierano próbki płynu po perfuzji do analiz. Stężenia azotynów

w płynie po perfuzji z izolowanych płuc mierzono za pomocą analizatora ENO-20 NO_x (EiCom, Kioto, Japonia).

3.1.11 Analiza morfologii krwi i stężenia cytokin w osoczu myszy BALB/c

Morfologię krwi wykonano za pomocą licznika krwi abc Vet (Horiba, Japonia). Aby uzyskać osocze oraz erytrocyty do dalszych analiz, próbki krwi wirowano przez 5 minut (1000 x g, 4°C). Stężenie białek ostrej fazy w osoczu mierzono za pomocą immuno-analizy Multiplex (Merck Millipore, Niemcy). Stężenia SAA i IL-6 w osoczu mierzono za pomocą zestawów ELISA (odpowiednio Invitrogen, Stany Zjednoczone i R&D Systems, Stany Zjednoczone).

3.1.12 Ocena stężenia azotynów i azotanów w osoczu myszy BALB/c

Biodostępność NO na poziomie systemowym oceniono pośrednio na podstawie pomiaru stężenia NO₂- i NO₃- w osoczu. Próbkę osocza o objętości 50 µl mieszało się z 100 µl zimnego etanolu i trzymano na lodzie w celu wytrącenia białka (30 min), odwirowano (14000 x g, 5 min., 4°C), a powstały supernatant wykorzystano natychmiast po przygotowaniu próbki do pomiaru stężenia azotynów i azotanów za pomocą analizy reduktywnej chemiluminescencji z użyciem analizatora tlenu azotu Sievers* NOA 280i.

3.1.13 Ocena stężenia nitrozyłhemoglobiny (NOHb) w erytrocytach myszy BALB/c

Wyizolowane z krwi erytrocyty umieszczono w strzykawkach insulinowych i zamrożono w ciekłym azocie. W celu pomiarów zawartości nitrozyłhemoglobiny (NOHb) zastosowano metodę spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR). Ocenę ilościową poziomu NOHb wykonano poprzez pomiar widm EPR zamrożonych erytrocytów w oparciu o opisaną wcześniej procedurę (48) z wykorzystaniem spektrometru EMXplus (Bruker, Niemcy) wyposażonego w mostek mikrofalowy PremiumX oraz wnękę rezonansową wysokiej czułości ER 4119HS, w temperaturze ciekłego azotu. Poziomy NOHb zostały wyrażone jako amplituda linii widma EPR w obszarze $g = 2$, w jednostkach umownych i znormalizowane do masy próbki.

3.2 OCENA ZMIAN CZYNNOŚCI ŚRÓDBŁONKA NACZYNIOWEGO POD WPŁYWEM WYBRANYCH LEKÓW PRZECIWNOWOTWOROWYCH

3.2.1 Myszy C57BL/6J

Do oceny efektów działania leków przeciwnowotworowych *in vivo* i *ex vivo* wykorzystano samce myszy szczepu C57BL/6J. Myszy C57BL/6J zakupiono w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Zwierzęta trzymane w indywidualnie wentylowanych klatkach hodowlanych, z nieograniczonym dostępem do pożywienia i wody, w pomieszczeniu o kontrolowanych warunkach temperatury i wilgotności, z 12-godzinnym cyklem dzień/noc. Badania na zwierzętach przeprowadzono po uzyskaniu zgody II Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie przy Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk (Kraków, Polska), zezwolenie nr 187/2022.

Wszystkie zwierzęta wykorzystane w doświadczeniach poddano eutanazji podając dootrzewnowo ketaminę (100 mg/kg m.c.) i ksylazynę (10 mg/kg m.c.). Od zwierząt przeznaczonych do badań wpływu leków *in vivo*, pobierano próbki krwi z prawej komory serca, stosując 3,8% cytrynian sodu jako środek przeciwzakrzepowy. Po odwirowaniu krwi (1000 x g, 12 min, 4 °C) pobrano próbki osocza i przechowywano je w temperaturze -80°C, w celu dalszej analizy. Aorty wyizolowano, oczyszczono i zamrożono w roztworze RNeasy Lysis Solution (Invitrogen) do analizy qRT-PCR.

3.2.2 Badanie działania dabrafenibu i trametynibu na czynność śródbłonka naczyniowego *in vivo*

W celu oceny działania dabrafenibu (MedChem, Polska) oraz trametynibu (MedChem) na śródbłonek naczyniowy *in vivo* przeprowadzono dwie serie doświadczeń.

W pierwszym etapie wpływ działania w/w leków na czynność śródbłonka naczyniowego badano po upływie 6, 12 oraz 24 godzin od jednorazowego, dootrzewnowego podania ich myszom w dawce 50 mg/kg m.c. (dabrafenib) i w dawce 5 mg/kg m.c. (trametinib). Ponieważ rozpuszczalność dabrafenibu i trametynibu w wodzie jest ograniczona, roztwory związków podawanych dootrzewnowo przygotowano w mieszaninie DMSO, PEG i PBS (30:30:40; v/v). Aby wyeliminować wpływ rozpuszczalnika na badane parametry, myszom kontrolnym również wstrzykiwano mieszaninę DMSO, PEG i PBS.

W drugim etapie wpływ działania leków na śródbłonek naczyniowy badano po 7 dniach podawania w/w leków w paszy. Myszy C57BL/6J żywiono przez 7 dni kontrolną dietą AIN 93G (Zoolab, Polska), dietą AIN 93G wzbogaconą w dabrafenib w dawce 50 mg/kg m. c. lub dietą AIN 93G zawierającą trametynib w dawce 5 mg/kg m.c. (Zoolab). Zawartość leków w paszy dobrano na podstawie średniego dziennego spożycia paszy przez zwierzęta.

3.2.3 Ocena czynności rozkurczowej aorty myszy C57BL/6J *in vivo* z wykorzystaniem MRI

W każdej grupie myszy oceniano zależną i niezależną od śródbłonka odpowiedź rozkurczową aorty techniką obrazowania magnetyczno-rezonansowego (MRI; magnetic resonance imaging) w aorcie piersiowej oraz brzusznej (n=6 myszy/grupę), zgodnie z protokoł został opublikowanym wcześniej protokołem, opracowanym przez dr A. Bar i wsp. z zespołu JCET (49). Obrazowanie MRI wykonano w Zakładzie Tomografii Magnetyczno-Rezonansowej Instytutu Fizyki Jądrowej im. Henryka Niewodniczańskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, za pomocą skanera 9,4T (BioSpec 94/20 USR; Bruker BioSpin GmbH; Ettlingen, Niemcy) u myszy w anestezji ogólnej z użyciem izofluranu (Baxter, Polska). W trakcie badania monitorowano parametry życiowe zwierząt takie jak rytm serca, oddech oraz temperatura ciała. Zależną od śródbłonka odpowiedź rozkurczową aorty oceniono w odpowiedzi na Ach, podawaną dootrzewnowo w dawce 16,6 mg/kg m.c. Niezależny od śródbłonka rozkurcz naczyń oceniano w odpowiedzi na SNP, podawany dożylnie w dawce 1 mg/kg m.c.

3.2.4 Ocena parametrów morfologii krwi oraz SAA w osoczu mszy C57BL/6J

Morfologię krwi wykonano za pomocą licznika krwi abc Vet (Horiba, Japonia). Po odwirowaniu krwi (1000 x g, 12 min, 4°C) pobrano próbki osocza i przechowywano je w temperaturze -80°C, w celu dalszej analizy.

Pomiary stężenia SAA w próbkach osocza wykonano za pomocą zestawu Mouse SAA ELISA Kit (Abcam, Wielka Brytania).

3.2.5 Badanie działania dabrafenibu i trametynibu *ex vivo* w modelu izolowanej aorty myszy C57BL/6J

Piersiowe odcinki aorty uzyskane od zdrowych myszy wyizolowano, oczyszczono w zimnym roztworze KH i inkubowano z badanymi lekami lub ich kombinacją przez 6 lub 24 godziny w pożywce hodowlanej Minimum Essential Medium (MEM, Gibco, Wielka Brytania) zawierającej 0,5% roztwór FBS i antybiotyki, w inkubatorze w temperaturze 37°C, 5% CO₂, 21% O₂. Ponieważ dabrafenib i trametynib rozpuszczane były w DMSO, aorty kontrolne inkubowane były z dodatkiem odpowiedniej ilości DMSO do pożywki hodowlanej. Następnie aorty poddano dalszym analizom wyszczególnionym poniżej. (1) Do doświadczeń z użyciem miografu wykorzystano krążki aorty o długości 2mm. (2) Do pomiarów produkcji tlenu azotu metodą EPR wykorzystano aorty rozcięte wzdłuż w celu lepszego dostępu pułapki spinowej do śródbłonna. (3) Aorty przeznaczone do analizy qRT-PCR zamrożono w roztworze RNeasy Lysis Solution (Qiagen).

3.2.6 Ocena ekspresji wybranych genów na poziomie mRNA w aorcie myszy C57BL/6J

Zmiany ekspresji genów związanych z funkcją śródbłonna naczyniowego określono przy użyciu ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym z odwrotną transkrypcją (qRT-PCR), we współpracy z dr A. Gdulą z JCET. W modelu *in vivo*, w aortach izolowanych od myszy karmionych paszą z lekami przez 7 dni zbadano zmiany ekspresji genów kodujących białka połączeń międzykomórkowych (klaudyna-5 i VE-kadheryna) oraz genu kodującego śródbłonną syntazę NO (eNOS). W modelu *ex vivo* w izolowanych aortach inkubowanych z lekami zbadano ekspresję genów kodujących eNOS, cyklooksygenazę-1 (COX-1) i cyklooksygenazę-2 (COX-2).

W celu wykonania analizy w pierwszym etapie całkowite RNA wyizolowano z aort przy użyciu zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy) postępując zgodnie z protokołem producenta. Następnie dla każdej próby wykonano pomiar stężenia RNA za pomocą spektrofotometru UV/Vis NanoDrop™ Lite (Thermo Scientific™, Stany Zjednoczone). Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono w termocyklerze CFX Opus Real-Time PCR Systems (BioRad, Stany Zjednoczone) korzystając z odczynników iScript™ cDNA Synthesis Kit (BioRad) w mieszaninie reakcyjnej o objętości końcowej 20 µl, podczas 20 minutowego programu inkubacji w temperaturze 46°C, z jednodominutowym etapem inaktywacji enzymu w 96°C. Łańcuchowe reakcje polimerazy w czasie rzeczywistym

prowadzono z użyciem dedykowanego zestawu odczynników: SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Sigma Aldrich). Wykorzystano pary starterów specyficznych dla genów kodujących: kładynę-5, VE- kadherynę, COX-1, COX-2, eNOS. Poszczególne oligonukleotydy zostały zsyntetyzowane w firmie Genomed (Warszawa, Polska), a ich sekwencje przedstawiono w **Tabeli 1**. Reakcje prowadzono w objętościach 10 µl, zgodnie z profilem temperaturowym ustalonym dla każdej pary starterów podczas etapu optymalizacji* (**Tabela 2**). Przyrost produktu w czasie rzeczywistym rejestrowano jako wzrost sygnału fluorescencji emitowanej przez SYBR Green. Uzyskane wartości znormalizowano do genu referencyjnego β-aktyny, względne poziomy ekspresji (RQ, ang. Relative Quantitation) badanych genów wyznaczono metodą $\Delta\Delta C_t$, opracowaną przez Livak’a i Schmittgen’a (50).

Gen	Kierunek	Sekwencja (5’->3’)
β-Aktyna	Forward	GGCTGTATTCCCCTCCATCG
	Reverse	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
Kładyna-5	Forward	CTGGACCACAACATCGTGAC
	Reverse	AGTGCTACCCGTGCCTTAAC
VE-Kadheryna	Forward	GCCCACCATCGCCAAAAGAG
	Reverse	GGCGGTTCACGTTGGACTTG
COX-1	Forward	TTCCGTGTGCCAGATTACCC
	Reverse	AATGCCAAGCCACGAAAACC
COX-2	Forward	CCACTTCAAGGGAGTCTGGA
	Reverse	AGTCATCTGCTACGGGAGGA
eNOS	Forward	AGTCCTCACCGCCTTTTCCA
	Reverse	GACATCGCCGCAGACAAACA

Tabela 1. Sekwencje starterów stosowanych w reakcjach real-time PCR.

Lp	Etap	Temperatura [°C]		Czas
1	Denaturacja wstępna	95		240 sec
2	Denaturacja	95		10 sec
3	Przylączanie starterów	58-62*	x 40	15 sec
4	Wydłużanie	72		10 sec
		95		15 sec
5	Analiza krzywej topnienia	60		60 sec
		95		1 sec

Tabela 2. Parametry reakcji polimerazy DNA w czasie rzeczywistym.

3.2.7 Ocena funkcji śródbłónka zależnej od NO w izolowanych krążkach aorty myszy C57BL/6J

Upośledzenie zależnej od śródbłónka naczyniowego odpowiedzi rozkurczowej naczyń *ex vivo* oceniano w wykorzystaniem klasycznego miografu. Bezpośrednio po zakończeniu 6- lub 24-godzinnej inkubacji krążki aorty były przenoszone do komór miografu i zawieszane w nagrzanym do 37°C buforze KH. Pomiar zależnej od śródbłónka naczyniowego odpowiedzi rozkurczowej naczyń *ex vivo* z wykorzystaniem klasycznego miografu przeprowadzano w sposób opisany powyżej w punkcie 1.6. Czynność śródbłónka naczyniowego zależna od NO była zmierzona na podstawie odpowiedzi rozkurczowych na Ach w stężeniach 0,001–10 μM , a odpowiedzi niezależne od śródbłónka przy użyciu SNP w zakresie stężeń 0,001–10 μM .

3.2.8 Ocena produkcji tlenu azotu w izolowanej aorcie myszy C57BL/6J

Do pomiaru produkcji NO w aorcie myszy C57BL/6J wykorzystano metodę spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR). W aortach piersiowych po 24 godzinach inkubacji z badanymi lekami przeprowadzono pułapkowanie spinowe NO z przepuszczalnym dla komórek czynnikiem wychytującym – dietyloditiokarbaminianem (DETC). Pomiary wykonano we współpracy z dr J. Pyką w oparciu o opisaną wcześniej

procedurę (51) i protokół opracowany w zespole JCET (52). W szczególności, aorty inkubowano wstępnie przez pół godziny w odtlenowanym poprzez przepuszczanie argonu buforze KH z 1 μM L-NIL, w inkubatorze w temperaturze 37°C, 5% CO₂, 21% O₂. Następnie przeprowadzono 90-minutową inkubację z 200 μM roztworem koloidalnej pułapki spinowej Fe²⁺(DETC)₂ i 1 μM roztworem jonoforu A23187 (Cayman Chemical, Stany Zjednoczone). Bezpośrednio po inkubacji aorty zamrażano w środku kolumny 600 μL buforu KH w 1 ml strzykawkach poprzez zanurzenie w ciekłym azocie. Próbkę przechowywano w temperaturze -80°C. Pomiar zamrożonych kompleksów NO-Fe²⁺(DETC)₂ metodą fali ciągłej elektronowego rezonansu paramagnetycznego (CW EPR) przeprowadzono z wykorzystaniem spektrometru EMXplus (Bruker, Niemcy) wyposażonego w mostek mikrofalowy PremiumX oraz wnękę rezonansową wysokiej czułości ER 4119HS, w temperaturze ciekłego azotu. Dodatkowo wykonywano pomiary kolumny buforu bez aorty w celu rejestracji widma linii bazowej. Po pomiarach rozmrożone i odsączone aorty zważono. Całkowita amplituda NO-Fe²⁺(DETC)₂ po korekcie linii bazowej została wykorzystana do ilościowego określenia sygnałów. Wyniki znormalizowano do masy aorty i wyrażono w jednostkach umownych j.u./mg tkanki.

Widma CW EPR rejestrowano przy mocy mikrofalowej równej 10 mW. Uzyskane widma konwertowano do postaci ASCII wykorzystując pakiet DNPLab (<http://dnplab.net/>), a następnie usuwano cyfrowo niespecyficzny sygnał, odejmowano uśrednioną linię bazową i zaczytywano amplitudę sygnału widma wykorzystując odpowiednie skrypty w języku Python.

3.2.9 Ocena aktywności eNOS w izolowanej aorcie myszy C57BL/6J

W komórkach śródbłoka naczyniowego eNOS jest enzymem uczestniczącym w metabolizmie L-argininy do tlenku azotu, a produktem ubocznym tej reakcji jest L-Cytrulina. Natomiast, w alternatywnym szlaku metabolizmu L-argininy, z udziałem enzymu arginazy, powstaje L-Ornityna oraz mocznik. Dlatego też, aktywność syntazy tlenku azotu w izolowanych aortach inkubowanych w obecności dabrafenibu oraz trametynibu została oceniona pośrednio w oparciu o śledzenie ścieżki metabolizmu znakowanej izotopowo ¹³C₆, ¹⁵N₄ L-argininy (Arginina+10) do znakowanych ¹³C₆, ¹⁵N₃ L-Cytruliny (Cytrulina+9) oraz ¹³C₅, ¹⁵N₂ L-Ornityny (Ornityna+7) z zastosowaniem analizy metabolomicznej (ang. tracer- based metabolomics) postępując zgodnie z wcześniej opisaną metodologią (53).

W skrócie, izolowaną i oczyszczoną aortę piersiową inkubowano przez 24 godziny z dabrafenibem (1, 3 i 10 μM) oraz trametynibem (10 μM) w medium hodowlanym RPMI SILAC zawierającym 1% roztwór FBS oraz 150 μM roztwór $^{13}\text{C}_6, ^{15}\text{N}_4$ L-argininy-HCl (arginina+10) (Sigma-Aldrich), przy czym 90 minut przed zakończeniem inkubacji dodano jonofor wapnia A23187 (1 μM ; Cayman Chemical) celem aktywacji eNOS. Do analizy metabolomicznej przeznaczono medium po inkubacji w objętości 500 μl , które wysuszono z zastosowaniem wirówki próżniowej, a następnie suchą pozostałość rozpuszczono w 100 μl wody MilliQ. Próbkę analizowano z zastosowaniem metody opartej na platformie profilowania amin wykorzystującej strategię derywatyzacji AccQ-TagAQC zaadaptowaną z protokołu producenta (Waters, Holandia) (54). Analizę metabolomiczną znakowanych aminokwasów (arginina+10, cytrulina+9 oraz ornityna+7) w próbkach wykonano z zastosowaniem techniki ultrasprawniej chromatografii cieczowej w połączeniu ze spektrometrią mas (LC-MS). System LC-MS składał się z ACQUITY UPLC I-Class (Waters Chromatography Europe BV, Holandia) wyposażonego w kolumnę chromatograficzną AccQ-Tag Ultra C18 (1,7 μm , 100 x 2,1 mm, Waters, Irlandia) sprzężonego ze spektrometrem mas typu potrójny kwadrupol QTRAP® 6500 (Sciex, Kanada). Uzyskane wyniki przedstawiono jako powierzchnia piku znormalizowana na mg masy inkubowanej aorty.

3.2.10 Ocena poziomu wybranych białek w homogenatach aorty myszy C57BL/6J

Do oceny poziomu wybranych białek w homogenatach aorty wykorzystano technikę Western Blot. Aortę piersiową po 24 godzinach inkubacji z badanymi lekami poddano homogenizacji w buforze T-PER (Tissue Protein Extraction Reagent, Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone) w obecności inhibitorów proteaz i fosfataz (Thermo Fisher Scientific), przy użyciu homogenizatora tkankowego Precellys Evolution (Bertin, Francja). Stężenie białka zmierzono przy użyciu kitu BCA (ang. bicinchoninic acid) (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific). Następnie do próbek dodano buforu obciążającego (Bio-Rad, Stany Zjednoczone) oraz 2-merkaptoetanolu (Bio-Rad) i próbki podgrzewano w temperaturze 95 °C przez 5 min, a po ich ochłodzeniu przechowywano je w temperaturze -80 °C. Próbkę homogenatów aorty z buforem obciążającym (10 μg białka) rozdzielono elektroforetycznie na żelu poliakrylamidowym (12 %), a następnie przeprowadzono transfer białek na membrany wykonane z polifluorku winylidenu (PVDF). Każdorazowo, jako kontrolę równomiernego nałożenia białka wykorzystano densytometryczny pomiar sygnału generowanego przez białka na błonie PVDF po zakończeniu transferu dla poszczególnych próbek (ang. total protein

loading control) (55), mierzony przy użyciu ChemiDoc Imager (Bio-Rad). Następnie błonę PVDF poddano blokowaniu w buforze 5% mleka przez noc, po czym przeprowadzono inkubację w temperaturze 4°C z odpowiednimi przeciwciałami pierwszorzędowymi: P44/42 MAPK (Erk1/2) (1:1000, Cell Signaling Technology, Stany Zjednoczone), Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (1:1000, Cell Signaling Technology), Akt (1:1000, Cell Signaling Technology), Phospho Akt (Thr308) (1:1000, Cell Signaling Technology), eNOS (1:10000, BD Biosciences), p(Ser1177)eNOS (1:1000, Biorbyt), p(Thr195)eNOS (1:1000, Fisher Scientific). W kolejnym etapie błony inkubowano z przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z HRP (1:5000, Santa Cruz Biotechnology) w temperaturze pokojowej. Detekcja sygnału chemiluminescencyjnego została wykonana przy użyciu ChemiDoc Imager (Bio-Rad), a pomiar intensywności sygnału został wykonany przy użyciu oprogramowania ImageJ.

3.2.11 Ocena zmian aktywności kinaz serynowo-treoninowych w homogenatach aort myszy C57BL/6J pod wpływem działania badanych leków

W celu poznania molekularnych mechanizmów działania badanych leków, aorty piersiowe po 24h inkubacji z dabrafenibem, trametynibem oraz kombinacją obu tych leków zamrożono w ciekłym azocie. Następnie aorty poddano homogenizacji, a w uzyskanych homogenatach wykonane zostało profilowanie aktywności kinaz przez firmę PamGene International B.V. ('s-Hertogenbosch, Holandia) z wykorzystaniem nowoczesnej platformy PamStation® z opatentowaną technologią mikromacierzy peptydowych 3D (PamChip®) (56). W szczególności homogenaty aort były nanoszone na powierzchnie mikromacierzy pokryte peptydami o znanych sekwencjach aminokwasów będących miejscami fosforylacji dla kinaz serynowo treoninowych (panel STK). Aktywne kinazy obecne w badanych próbkach fosforylowały specyficzne dla siebie peptydy na PamChip® w obecności ATP. Fosforylowane formy substratów określonych kinaz zostały uwidocznione przy użyciu przeciwciał specyficznych w stosunku do określonych peptydów, sprzężonych z FITC. Na podstawie uzyskanego na macierzy obrazu fosforylacji z użyciem narzędzi bioinformatycznych można wnioskować, które kinazy były aktywne w badanych próbkach. Analiza obrazu, kontrola jakości, analiza statystyczna oraz wizualizacja i interpretacja wyników zostały wykonane przy użyciu oprogramowania BioNavigator® (PamGene, Holandia) oraz algorytmu UKA (ang. upstream kinase analysis), który przewiduje różnicę aktywności danej kinazy w warunkach badanych w porównaniu z kontrolą. Algorytm UKA wykorzystuje ogólnie dostępne bazy danych dotyczących relacji kinaza-substrat.

Algorytm UKA generuje następujące wyniki:

- **Statystyka kinazy (ang. kinase statistics):** reprezentuje kierunek efektu: wynik < 0 oznacza hamowanie, wynik > 0 oznacza aktywację danej kinazy w grupie badanej w porównaniu kontrolą. Statystyka kinazy jest medianą statystyki zestawu peptydów, które kinaza może fosforylować. Statystyka zestawu peptydów jest stosunkiem sygnału do szumu peptydów między grupą badaną i kontrolą. Zatem statystyka kinazy reprezentuje logarytmiczną zmianę krotności skalowaną przez szum.
- **Wskaźnik istotności (ang. significance score):** istotność statystyczna dla danej kinazy jest oparta na teście permutacji, w którym próbki są permutowane. Statystyka kinazy jest przeliczana dla każdej permutacji. Wynik istotności jest oparty na różnicy między statystyką kinazy rzeczywistej próbki a permutowanymi próbkami. Wysoki wskaźnik istotności oznacza wysokie prawdopodobieństwo różnicy w aktywności danej kinazy między badaną grupą a kontrolą.
- **Wskaźnik swoistości (ang. specificity score):** swoistość statystyki kinazy jest oparta na teście permutacji, w którym peptydy są permutowane. Statystyka kinazy jest przeliczana dla każdej permutacji. Wskaźnik swoistości jest oparty na różnicy między statystyką kinazy rzeczywistej próbki a wynikami próbek permutowanych. Wysoki wskaźnik swoistości oznacza wysokie prawdopodobieństwo, że obserwowany efekt nie mógł zostać uzyskany przez losowy zestaw peptydów.
- **Wskaźnik kinazy (mediana końcowego wyniku) (ang. kinase score (median final score)):** końcowy wskaźnik zmian aktywności kinazy w badanej grupie w porównaniu do kontroli, bierze pod uwagę wskaźnik istotności i wskaźnik swoistości. Za istotne są uznawane tylko zmiany aktywności kinaz powyżej domyślnego progu wskaźnika kinazy $> 1,3$. Kinazy są uporządkowane według tego wskaźnika.

3.2.12 Analiza metabolizmu energetycznego krążków aorty myszy C57BL/6J

W celu zmierzenia wpływu badanych leków na metabolizm energetyczny krążków aorty wykorzystano technologię Seahorse Extracellular Flux, w oparciu o którą został skonstruowany Analizator Seahorse XFe96 (Agilent, Stany Zjednoczone). Analizator ten pozwala na automatyczny, równoczesny pomiar dwóch głównych szlaków metabolicznych odpowiedzialnych za produkcję ATP w komórkach: glikolizy i oddychania mitochondrialnego. Krążki aorty inkubowane 24 godziny z badanymi lekami analizowano zgodnie z opracowanym wcześniej przez zespół JCET protokołem (57) we współpracy z dr P. Kaczarą i mgr A. Karaś

z JCET. Po krótkce, krążki rozcięto na mniejsze pierścienie około 1mm długości, następnie poddano wstępnej inkubacji w wolnym od wodorowęglanów, buforowanym medium testowym zawierającym 5,5 mM roztwór glukozy i 2 mM roztwór glutaminy (1 godzina, 37°C) w atmosferze bez CO₂. W kolejnych punktach czasowych wykonano pomiary szybkości zużycia tlenu (OCR) odzwierciedlającego oddychanie mitochondrialne i szybkości zewnątrzkomórkowego zakwaszania (ECAR) odzwierciedlającego glikolizę. Przeprowadzono także test stresu mitochondrialnego (ang. mito stress test) poprzez kolejne wstrzyknięcia modulatorów metabolizmu: oligomycyny (10 µg/ml; Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone), FCCP (karbonylocyjanek 4-[trifluorometoksy]fenylohydrazon; 1 µM; Sigma-Aldrich) z pirogronianem sodu (1 mM) oraz rotenonu (5 µM; Sigma-Aldrich) z antymycyną A (5 µM; Sigma-Aldrich). Mito Stress Test umożliwił określenie następujących kluczowych parametrów funkcji mitochondriów: podstawowe oddychanie (ang. basal), przeciek protonów (ang. proton leak), maksymalne oddychanie (ang. maximal respiration), zapasowa pojemność oddechowa (ang. spare respiratory capacity), oddychanie sprzężone z produkcją ATP (ang. ATP-linked OCR) i zużycie tlenu poza mitochondriami (ang. non-mitochondrial OCR).

Wszystkie pomiary znormalizowano do całkowitej zawartości białka w krążkach aorty, które zmierzono przy użyciu kitu BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific). Dane rejestrowano i analizowano przy użyciu oprogramowania Wave (Agilent). Obliczenia parametrów metabolizmu energetycznego przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta (Agilent).

3.2.13 Próba farmakologicznego odwrócenia dysfunkcji śródbłonka naczyniowego wywołanej dabrafenibem

Na podstawie uzyskanych wyników profilowania aktywności kinaz (PamGene) wytypowano dwa potencjalne mechanizmy, mogące odpowiadać za toksyczne działanie dabrafenibu na śródbłonek naczyniowy. (1) Pierwszym mechanizmem, który poddano weryfikacji było zwiększenie aktywności kinaz ROCK lub CAMK2, o których wiadomo, że regulują funkcję śródbłonka naczyniowego (58, 59). W celu zweryfikowania hipotezy, że wywołana przez dabrafenib dysfunkcja śródbłonka jest wynikiem zwiększenia aktywności kinaz ROCK lub CAMK2, inkubowano krążki aorty przez 24 godziny w medium hodowlanym zawierającym jednocześnie dabrafenib i wybrany inhibitor: fasudil (10µM, fasudil hydrochloride, MedChem Express), inhibitor ROCK, KN-93 (1µM, MedChem Express)

lub CAMK-IN-1 (100nM i 1μM, MedChem Express), inhibitory CAMK2. (2) Drugim wytypowanym mechanizmem odpowiadającym za toksyczne działanie dabrafenibu na śródbłonek naczyniowy było zwiększenie produkcji wolnych rodników tlenowych. Dysfunkcję tę próbowano odwrócić poprzez jednoczesną inkubację aort z dabrafenibem oraz apocyniną (100μM, Tocris) – inhibitorem NOX-2, setanaxibem (10μM, TargetMol Chemicals, Stany Zjednoczone) – inhibitorem NOX-1/4 lub MitoTEMPO (30μM i 100μM, TargetMol Chemicals) – antyoksydantem działającym w mitochondriach.

Wpływ zastosowanych związków mających przeciwdziałać dysfunkcji śródbłonka naczyniowego indukowanej przez dabrafenib weryfikowano poprzez ocenę czynności śródbłonka naczyniowego w aortach inkubowanych z dabrafenibem i wybranymi inhibitorami przy pomocy miografu naczyniowego 620M oraz poprzez bezpośredni pomiar produkcji NO z zastosowaniem techniki EPR.

3.2.14 Analiza statystyczna

Do analizy statystycznej wykorzystano oprogramowanie STATISTICA 10 (StatSoft, Inc.) i OriginPro 9 (OriginLab) dla wyników zamieszczonych w I części pracy oraz GraphPad Prism 9 dla wyników zamieszczonych w II części pracy. Test Shapiro-Wilka wykorzystano do sprawdzenia, czy dane mają rozkład normalny. W zależności od rozkładu danych, stosowano testy parametryczne: test t Studenta (dla porównań pomiędzy dwiema grupami), jednoczynnikowa lub dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA (z testem *post hoc* Tukey’a lub Dunnett’a) lub nieparametryczny test Kruskala Wallisa (z testem *post hoc* Dunn’a). Wyniki przedstawiono jako średnia ± SEM. Różnice między średnimi uznawano za istotne, jeśli $p < 0,05$.

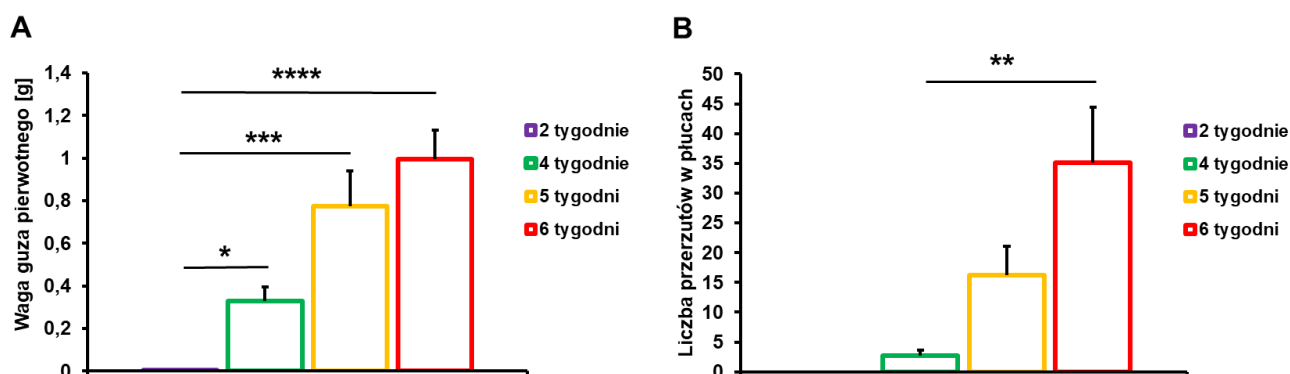
4 WYNIKI

CZĘŚĆ I

4.1 OCENA ZMIAN CZYNNOŚCI ŚRÓDBŁONKA W TOKU ROZWOJU CHOROBY NOWOTWOROWEJ W MYSIM ORTOTOPOWYM MODELU RAKA GRUCZOŁU SUTKOWEGO

4.1.1 Progresja choroby nowotworowej u myszy BALB/c po ortotopowym wszczepieniu komórek 4T1 oceniona na podstawie zmian masy guza pierwotnego i liczby przerzutów w płucach

Obecność guza pierwotnego ($0,004 \pm 0,001$ g) obserwowano od drugiego tygodnia po wszczepieniu komórek nowotworowych 4T1 do gruczołów sutkowych samic myszy BALB/c. Średnia masa guza stopniowo wzrastała w trakcie badania do ostatecznej średniej masy $0,99 \pm 0,1$ g w 6 tygodniu doświadczenia (**Rycina 4 A**). W drugim tygodniu choroby nowotworowej nie stwierdzono natomiast zmian przerzutowych w płucach (**Rycina 4 B**). Jednak średnia liczba przerzutów rozwijających się w płucach wyizolowanych od myszy 4, 5 i 6 tygodni po wszczepieniu komórek 4T1 stopniowo wzrastała, osiągając średnio 35 ± 9 nacieków przerzutowych w 6 tygodniu badania (**Rycina 4 B**).



Rycina 4. Masa guza pierwotnego (A) oraz liczba przerzutów w płucach (B), po 2, 4, 5 i 6 tygodniach od wszczepienia komórek nowotworowych 4T1 myszom BALB/c. Istotność statystyczną oceniono za pomocą testu nieparametrycznego Kruskala–Wallisa z testem *post hoc* Dunn’a. Symbol * oznacza $p < 0,05$; ** oznacza $p < 0,01$; *** oznacza $p < 0,001$; **** oznacza $p < 0,0001$ dla różnicy pomiędzy wskazanymi grupami. Wyniki wyrażono jako średnia $\pm$ SEM, $n = 10\text{--}17$. Rycina na podstawie E.Buczek i wsp., 2018; zmodyfikowano (60).

4.1.2 Zmiany zapalne i ogniska przerzutowe w płucach myszy BALB/c po ortotopowym wszczepieniu komórek 4T1

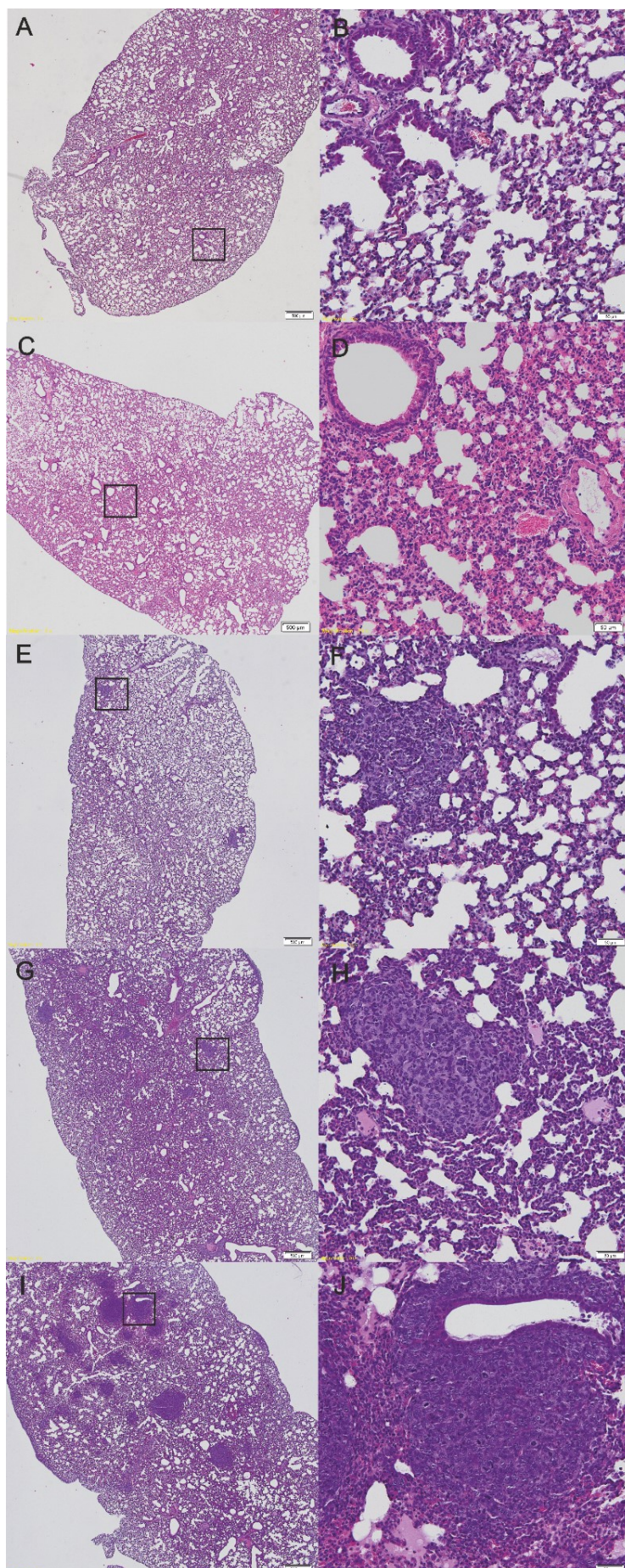
Już 2 tygodnie po wszczepieniu myszom komórek nowotworowych 4T1 wykryto miejscowe nacieki komórek zapalnych do miąższu płuc, zidentyfikowane jako populacja składająca się głównie z granulocytów (**Rycina 5 D**). Jednak na tym etapie w mikroskopowych preparatach przekrojów płuc nie zaobserwowano żadnych skupisk komórek nowotworowych (**Rycina 5 C**). W przeciwieństwie do płuc wyizolowanych od myszy 2 tygodnie po wszczepieniu komórek 4T1, płuca analizowane po 4 tygodniach wykazywały małe, wyraźne ogniska przerzutowe (**Rycina 5 E, F**). Po 5 tygodniach, w miąższu płuc i pod opłucną obserwowano rozproszone miejsca przerzutowe o różnych rozmiarach (**Rycina 5 G, H**). Natomiast w najbardziej zaawansowanym stadium progresji choroby nowotworowej, 6 tygodni po wszczepieniu myszom komórek 4T1, w płucach widoczne były liczne, rozległe, łączące się ogniska przerzutowe (**Rycina 5 I, J**).

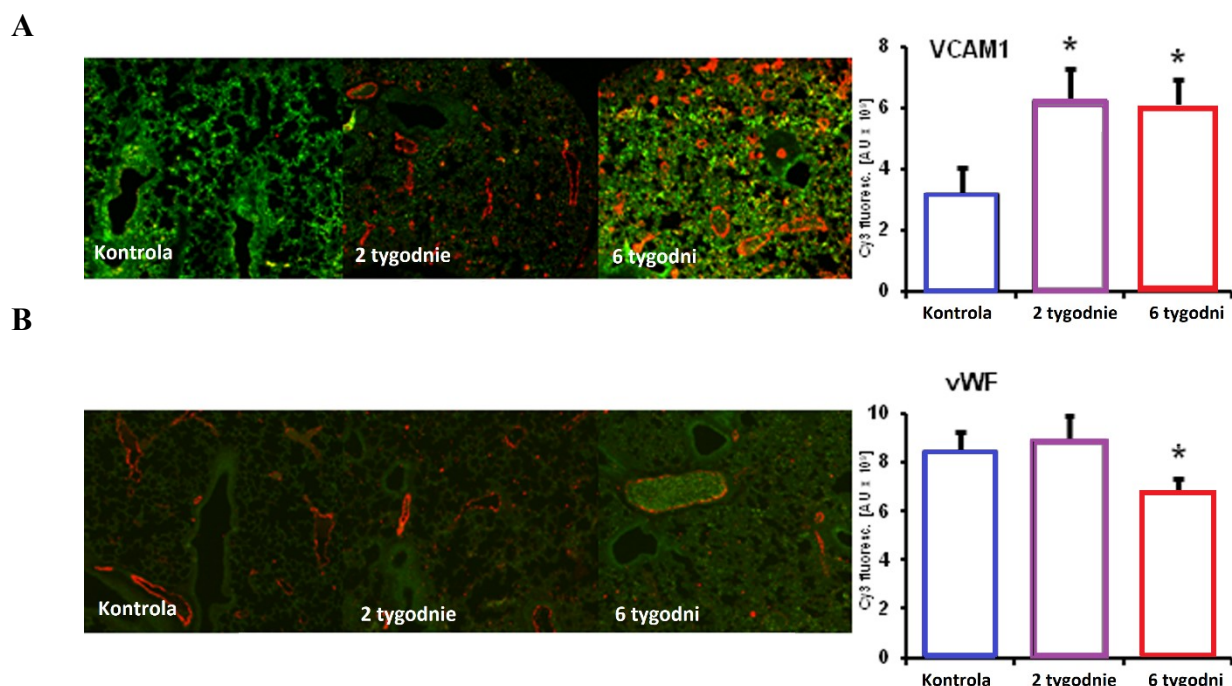
4.1.3 Zmiany ekspresji V-CAM i vWF w płucach myszy BALB/c po ortotopowym wszczepieniu komórek 4T1

Zarówno we wczesnym jak i późnym stadium rozwoju nowotworu naciekanie komórek zapalnych wiązało się ze zwiększoną ekspresją VCAM-1 w naczyniach krwionośnych płuc, co potwierdzono barwieniem immunohistochemicznym (**Rycina 6 A**). Barwienie vWF w płucach nie wykazało istotnej różnicy między myszami 2 tygodnie po wszczepieniu komórek 4T1 a kontrolami, wykazano natomiast spadek ekspresji vWF po 6 tygodniach po wszczepieniu komórek 4T1 (**Rycina 6 B**).

Rycina 5. Histopatologiczna ocena tkanki płuc myszy BALB/c w przekroju poprzecznym, po barwieniu hematoksyliną i eozyną, (reprezentatywne zdjęcia).

Kontrola – prawidłowa tkanka płucna (A, B); płuca 2 tygodnie po wszczepieniu komórek 4T1 z widocznymi miejscami zapalenia, głównie naciekami granulocytów (C, D); płuca grupy 4-tygodniowej z kilkoma małymi ogniskami przerzutowymi (E, F); płuca grupy 5-tygodniowej z widocznymi wieloma, rozproszonymi miejscami przerzutowymi o różnych rozmiarach (G, H); płuca 6 tygodni po wszczepieniu komórek nowotworowych, z licznymi, rozległymi, łączącymi się obszarami przerzutowymi (I, J). Po lewej stronie powiększenie 20×: A, C, E, G, I; po prawej powiększenie wybranego obszaru z ramki 200×: B, D, F, H, J. Badanie wykonane we współpracy z Panią Agnieszką Jasztal z JCET. Rycina na podstawie E.Buczek i wsp., 2018; zmodyfikowano (60).





Rycina 6. Zmiany ekspresji VCAM-1 (A) oraz czynnika von Willebranta (B) ocenione na podstawie immunobarwienia fluorescencyjnego w tkance płucnej pobranej od myszy BALB/c 2 i 6 tygodni po wszczepieniu komórek nowotworowych 4T1. Istotność statystyczną oceniono za pomocą testu nieparametrycznego Kruskala–Wallisa z testem *post hoc* Dunn’a. Wartości podano jako średnią $\pm$ SEM, $n = 5$, symbol * $p \leq 0,05$ w porównaniu z grupą kontrolną. Rycina na podstawie E.Buczek i wsp., 2018; zmodyfikowano (60).

4.1.4 Leukocytoza i inne zmiany parametrów morfologii krwi po ortotopowym wszczepieniu komórek 4T1 u myszy BALB/c

2 tygodnie po wszczepieniu komórek nowotworowych 4T1 stwierdzono łagodne zmiany w morfologii krwi u myszy BALB/c (**Tabela 3**), w tym spadek liczby płytek krwi (PLT), który znormalizował się w kolejnych punktach czasowych oraz wzrost średniej objętości płytek krwi (MPV), który utrzymywał się na podwyższonym poziomie aż do późnego etapu rozwoju choroby nowotworowej. Najbardziej widoczne zmiany w profilu morfologii krwi obserwowano w późnych stadiach choroby i obejmowały one głęboką i postępującą leukocytozę obserwowaną w okresie 4–6 tygodni od wszczepienia myszom komórek nowotworowych 4T1. Chociaż bezwzględna liczba granulocytów (GRA), monocytów (MON) i limfocytów (LYM) wzrosła, zmiany procentowe wskazywały na znaczny wzrost liczby granulocytów, łagodny wzrost liczby monocytów i względny spadek liczby limfocytów. U zwierząt kontrolnych, jak również u myszy we wczesnym stadium choroby nowotworowej (2 tygodnie), dominującą

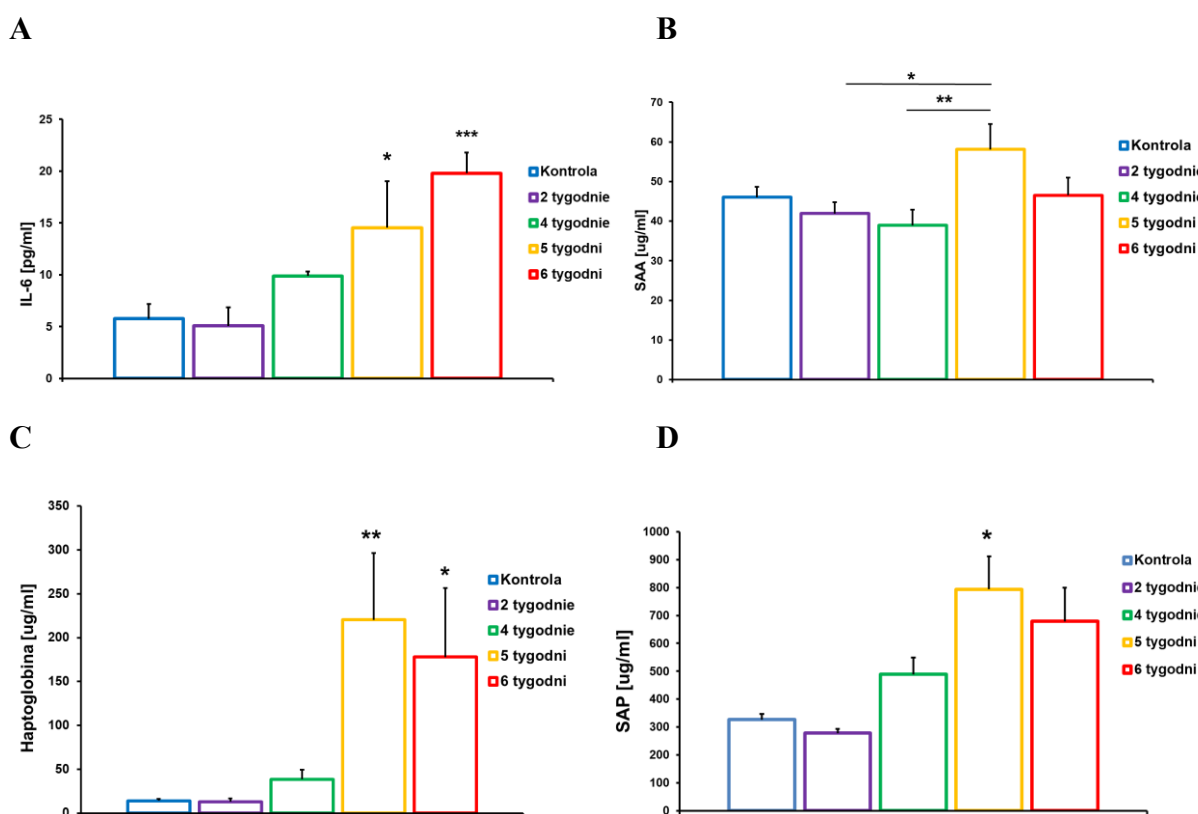
subpopulacją WBC były limfocyty, podczas gdy w zaawansowanych stadiach choroby nowotworowej (4–6 tygodni) najliczniejszą subpopulacją WBC były granulocyty (**Tabela 3**).

	Kontrola	2 tygodnie	4 tygodnie	5 tygodni	6 tygodni
PLT [$K \cdot \mu l^{-1}$]	916.30±47.39	618.75±128.13#	892.81±30.04	1067.25±87.86	964.58±119.81
MPV [fl]	5.21±0.06	5.63±0.13*	5.44±0.06	5.73±0.42	5.82±0.12**
RBC [$M \cdot \mu l^{-1}$]	10.37±0.17	10.50±0.15	10.16±0.22	10.27±0.23	10.72±0.30
MCH [pg]	15.69±0.20	14.67±0.06*	15.28±0.15	15.60±0.27	15.74±0.21
HCT [%]	57.40±0.96	57.92±0.93	56.78±1.12\$	57.63±1.15	62.84±2.01
MCV [fl]	55.33±0.18	55.15±0.31	55.92±0.32	55.10±0.32	58.75±0.70*
WBC [$K \cdot \mu l^{-1}$]	3.87±0.21	2.94±0.26	31.80±6.14	169.35±49.59**	351.50±79.54****
LYM [$K \cdot \mu l^{-1}$]	2.88±0.15	2.65±0.60	9.96±1.26	33.62±8.15**	62.19±11.43****
MON [$K \cdot \mu l^{-1}$]	0.15±0.02	0.15±0.02	3.59±0.76	18.46±5.67**	40.53±8.15****
GRA [$K \cdot \mu l^{-1}$]	0.84±0.08	0.62±0.09	18.46±4.54	117.27±36.28*	224.36±69.17****
LYM [%]	76.14±1.39	75.35±2.00	40.83±5.03****	32.19±4.69****	20.09±1.86****
MON [%]	5.25±0.26	6.69±0.45	10.27±0.83****	10.34±0.64****	11.74±0.98****
GRA [%]	18.61±1.39	17.97±1.71	48.91±4.70*	57.47±4.43***	68.17±2.48****

Tabela 3. Parametry morfologii krwi u myszy BALB/c po ortotopowym wszczepieniu komórek 4T1. PLT, płytki krwi; MPV, średnia objętość płytek krwi; RBC, krwinki czerwone; MCH, średnia hemoglobina komórkowa; HCT, hematokryt; MCV, średnia objętość krwinki czerwonej; WBC, białe krwinki; LYM, limfocyty; MON, monocyty; GRA, granulocyty. Istotność statystyczną oceniono za pomocą testu nieparametrycznego Kruskala–Wallisa z testem *post hoc* Dunn’a. Dane wyrażono jako średnia ± SEM, symbol * oznacza $p < 0,05$ w porównaniu z grupą kontrolną, ** $p < 0,01$ w porównaniu z grupą kontrolną, *** $P < 0,001$ w porównaniu z grupą kontrolną, **** $p < 0,0001$ w porównaniu z grupą kontrolną, # $p < 0,05$ w porównaniu z grupą 5 tygodni, \$ $p < 0,05$ w porównaniu z grupą 6 tygodni, (n=8- 12). Na podstawie E.Buczek i wsp., 2018 (60).

4.1.5 Wzrost stężenia IL-6 i białek ostrej fazy w osoczu po ortotopowym wszczepieniu komórek 4T1 u myszy BALB/c

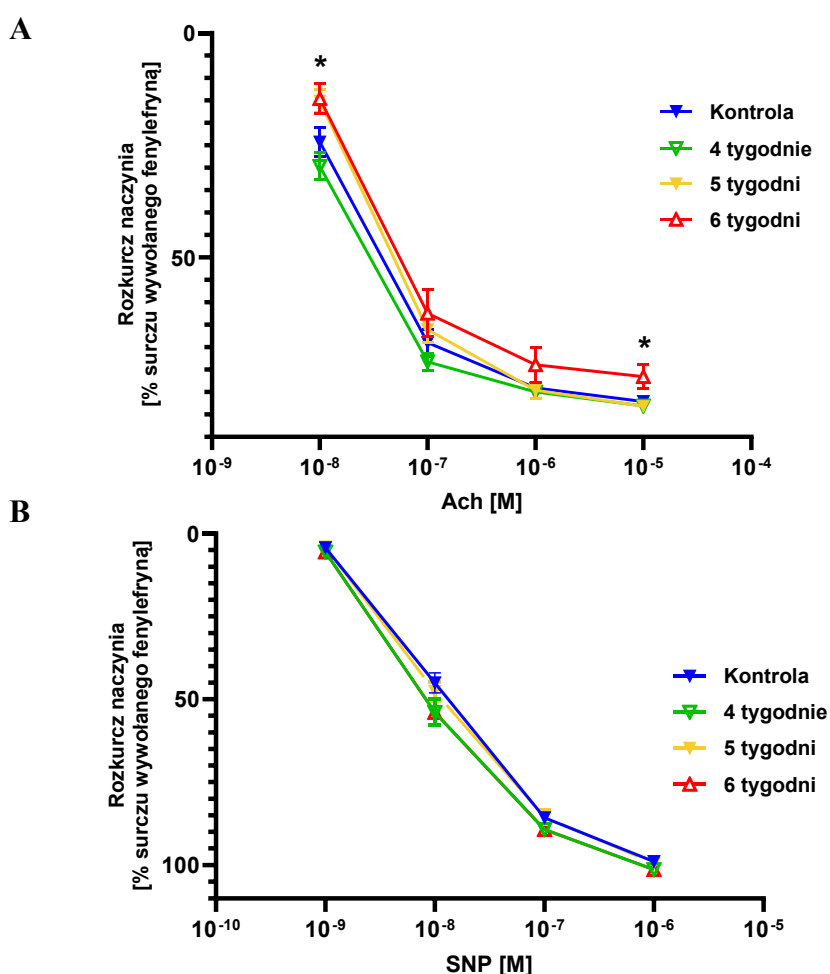
Wraz z rozwojem choroby nowotworowej następował stopniowy wzrost stężenia IL-6 w osoczu u myszy. Po 2 tygodniach od wszczepienia komórek nowotworowych 4T1 stężenie IL-6 w osoczu było porównywalne ze stężeniem u myszy kontrolnych, podczas gdy po 5 i 6 tygodniach od wszczepienia komórek nowotworowych nastąpił znaczący (3- do 4- krotny) wzrost stężenia IL-6 w osoczu w porównaniu z grupą kontrolną (**Rycina 7 A**). Podobne zmiany w osoczu obserwowano w przypadku białek ostrej fazy tj. surowiczego amyloidu A (SAA), haptoglobiny i surowiczego białka amyloidu (SAP), których stężenia wzrastały w zaawansowanych stadiach rozwoju nowotworu (**Rycina 7 B, C, D**).



Rycina 7. Zmiany stężenia IL-6 (A) oraz zmiany stężenia białek ostrej fazy: surowiczego amyloidu A (SAA) (B); haptoglobiny (C); surowiczego białka amyloidu (SAP) (D) w osoczu myszy BALB/c kontrolnych oraz myszy BALB/c po 2, 4, 5 i 6 tygodniach od wszczepienia komórek nowotworowych. Istotność statystyczną oceniono za pomocą testu nieparametrycznego Kruskala–Wallisa z testem *post hoc* Dunn’a. Wyniki wyrażono jako średnia $\pm$ SEM, $n = 6$ –14, symbol * oznacza $p < 0,05$; ** oznacza $p < 0,01$; *** oznacza $p < 0,001$ w porównaniu z grupą kontrolną lub między wskazanymi grupami. Rycina na podstawie E.Buczek i wsp., 2018; zmodyfikowano (60).

4.1.6 Upośledzenie czynności śródbłónka aorty po ortotopowym wszczepieniu komórek 4T1, w zaawansowanym stadium choroby nowotworowej u myszy BALB/c

Czynność śródbłónka naczyniowego aorty została zbadana w kolejnych stadiach rozwoju choroby nowotworowej: 2, 4, 5 oraz 6 tygodni od wszczepienia myszom komórek nowotworowych 4T1. Zależne od śródbłónka naczyniowego odpowiedzi rozkurczowe aorty na Ach były upośledzone w najbardziej zaawansowanym stadium rozwoju nowotworu, czyli 6 tygodni po wszczepieniu komórek 4T1 (**Rycina 8 A**). Nie stwierdzono upośledzenia niezależnych od śródbłónka odpowiedzi aorty na SNP (**Rycina 8 B**).



Rycina 8. Upośledzenie zależnego od śródbłónka rozkurczu aorty 6 tygodni po wszczepieniu komórek nowotworowych 4T1 u myszy BALB/c. Zależne od śródbłónka odpowiedzi na Ach (A) i rozkurcz naczyń niezależny od śródbłónka wywołany przez SNP (B) w krążkach aorty wstępnie skurczonych fenylefryną. Istotność statystyczną oceniono za pomocą testu nieparametrycznego Kruskala–Wallisa z testem *post hoc* Dunn’a. Symbol * oznacza $p < 0,05$ w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki wyrażono jako średnia $\pm$ SEM, $n = 6\text{--}13$ (2–4 krążki od jednej myszy). Rycina na podstawie E.Buczek i wsp., 2018; zmodyfikowano (60).

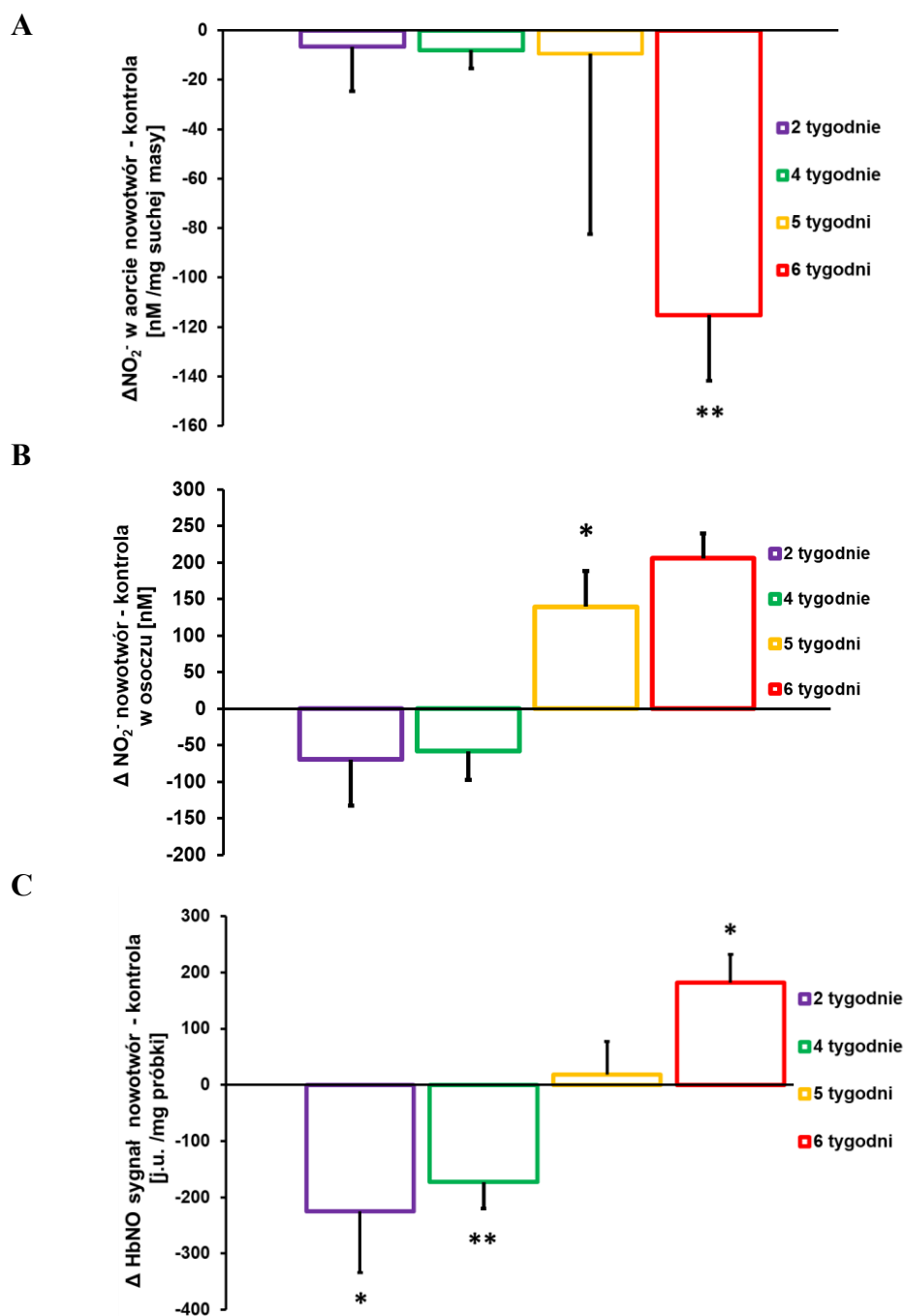
4.1.7 Zmiany produkcji NO w toku rozwoju choroby nowotworowej w aorcie po ortotopowym wszczepieniu komórek 4T1 u myszy BALB/c

Produkcję NO w izolowanych krążkach aorty oceniono na podstawie produkcji azotynów przez śródbłonek naczyniowy. Produkcja azotynów była istotnie statystycznie niższa w aortach izolowanych od myszy 6 tygodni po wszczepieniu komórek nowotworowych, co potwierdza obserwowane w badaniach funkcjonalnych upośledzenie funkcji śródbłonna zależnej od NO (**Rycina 9 A**).

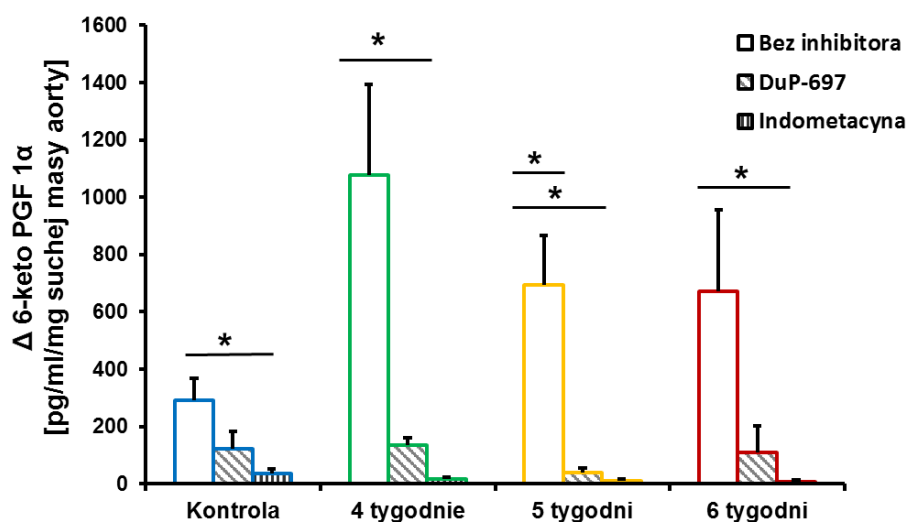
Ponadto oceniono zmiany w ogólnoustrojowej biodostępności NO na podstawie pomiaru stężenia azotynów w osoczu oraz NOHb w erytrocytach (**Rycina 9 B i C**). Po 2 i 4 tygodniach od wszczepienia komórek nowotworowych 4T1 stężenie azotynów w osoczu myszy oraz stężenie NOHb w erytrocytach były niższe (istotnie dla NOHb, $p < 0,05$) w porównaniu z grupami kontrolnymi. Natomiast w zaawansowanym stadium rozwoju choroby nowotworowej stężenia azotynów były zwiększone po 5 ($p < 0,05$) i 6 tygodniach, a NOHb była istotnie zwiększona po 6 tygodniach od wszczepienia komórek nowotworowych 4T1 (**Rycina 9 B i C**).

4.1.8 Zmiany produkcji PGI₂ w aorcie po ortotopowym wszczepieniu komórek 4T1, w toku rozwoju choroby nowotworowej u myszy BALB/c

Na podstawie pomiaru stężenia 6-keto-PGF_{1α}, stabilnego metabolitu PGI₂, zaobserwowano podwyższoną produkcję PGI₂ w aortach myszy, która została wydzielona do buforu, w którym inkubowano krążki aorty po 4, 5 i 6 tygodniach od wszczepienia komórek nowotworowych 4T1 (**Rycina 10**). Zarówno selektywny inhibitor COX-2, DuP-697, jak i nieselektywny inhibitor COX-1 i COX-2, indometacyna, znacząco hamowały uwalnianie PGI₂ z krążków aorty.



Rycina 9. Podstawowa produkcja azotynów w inkubowanych krążkach aorty (A), stężenie azotynów w osoczu (B) i poziom nitrozylohemoglobiny (C) u myszy BALB/c po 2, 4, 5 i 6 tygodniach od wszczepienia komórek nowotworowych 4T1. Wyniki przedstawiono jako Δ (delta) nowotwór minus kontrola, czyli różnica między myszami 2, 4, 5 i 6 tygodni po wszczepieniu komórek nowotworowych 4T1, a grupą kontrolną w danym punkcie czasowym. Istotność statystyczną oceniono za pomocą testów t Studenta. Symbol * oznacza $p < 0,05$; ** oznacza $p < 0,01$ w porównaniu do grupy kontrolnej w danym punkcie czasowym; j.u. jednostki umowne. Wyniki wyrażono jako średnia $\pm$ SEM, $n = 3$ (grupy kontrolne) i $n = 6$ (grupy nowotworowe). Rycina na podstawie E.Buczek i wsp., 2018; zmodyfikowano (60).

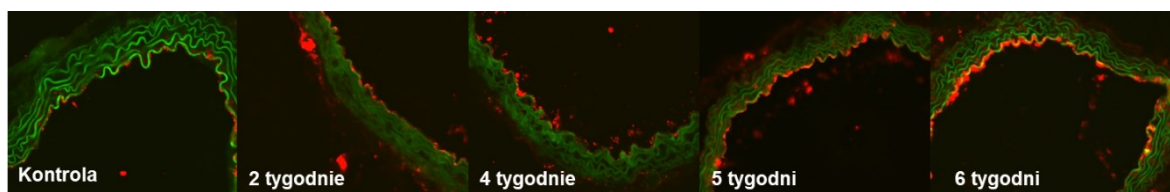


Rycina 10. Wzrost stężenia 6-keto PGF1 α oznaczonego w buforze KH po 30 minutowej inkubacji krążków aorty pobranych od myszy BALB/c po 4, 5 i 6 tygodniach od wszczepienia komórek nowotworowych 4T1 (wyrażone jako delta stężenia po 30 i po 3 minutach). Aorty były inkubowane bez inhibitora i w obecności selektywnego inhibitora COX-2 DuP-697 (1 μ M) lub nieselektywnego inhibitora COX-1 i COX-2 indometacyny (5 μ M). Istotność statystyczną oceniono za pomocą testu nieparametrycznego Kruskala–Wallisa z testem *post hoc* Dunn’a. Wyniki wyrażono jako średnią $\pm$ SEM, n = 5–6, symbol * oznacza p < 0,05. Rycina na podstawie E.Buczek i wsp., 2018; zmodyfikowano (60).

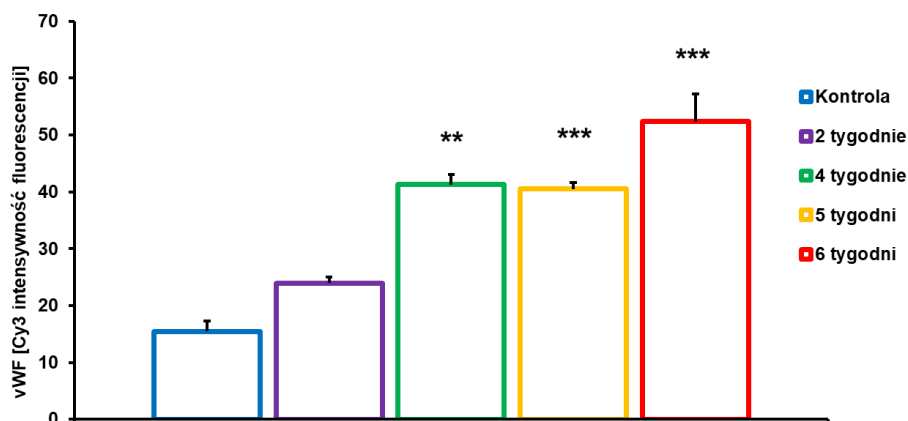
4.1.9 Zmiany w ekspresji czynnika von Willebranda w aorcie po ortotopowym wszczepieniu komórek 4T1, w toku rozwoju choroby nowotworowej u myszy BALB/c

W komórkach śródbłónka aort myszy z chorobą nowotworową zaobserwowano wzrost ekspresji vWF, w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi już 2 tygodnie po wszczepieniu komórek nowotworowych. W późniejszych etapach choroby nowotworowej ekspresja vWF w śródbłónku aorty nadal zwiększała się i była istotnie statystycznie wyższa w okresie 4- 6 tygodni od wszczepienia komórek nowotworowych w porównaniu z grupą kontrolną (Rycina 11 A i B).

A



B

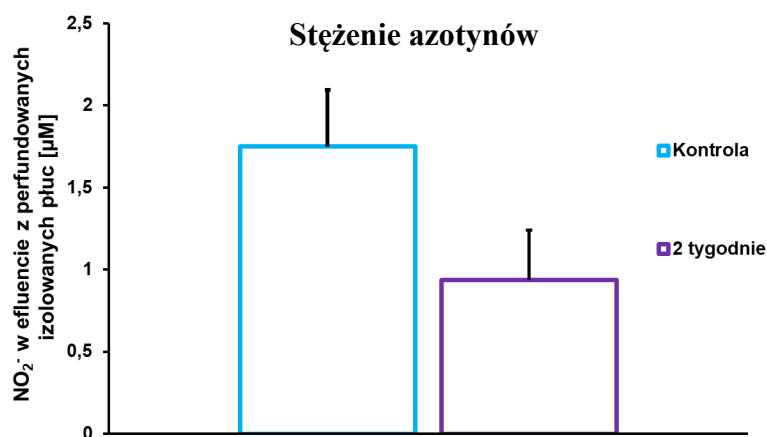


Rycina 11. Wzrost ekspresji czynnika von Willebrandta w aortach pobranych od myszy BALB/c po 2, 4, 5 i 6 tygodniach od wszczepienia komórek nowotworowych 4T1. Reprezentatywne zdjęcia mikroskopowe ekspresji śródbłonkowego czynnika von Willebrandta (vWF) w przekrojach poprzecznych aorty piersiowej (A) i analiza ilościowa wyników (B). Zmiany ekspresji vWF na mikrofotografiach przedstawiających przekroje poprzeczne przez krążki aorty myszy kontrolnych i myszy po 2, 4, 5 i 6 tygodniach od wszczepienia komórek nowotworowych analizowano metodą analizy tekstury Columbus. Istotność statystyczną oceniono za pomocą testu nieparametrycznego Kruskala–Wallisa z testem *post hoc* Dunn’a. Symbol ** oznacza $p < 0,01$; *** oznacza $p < 0,001$ względem grupy kontrolnej. Wyniki wyrażono jako średnią $\pm$ SEM, $n = 4$. Rycina na podstawie E.Buczek i wsp., 2018; zmodyfikowano (60).

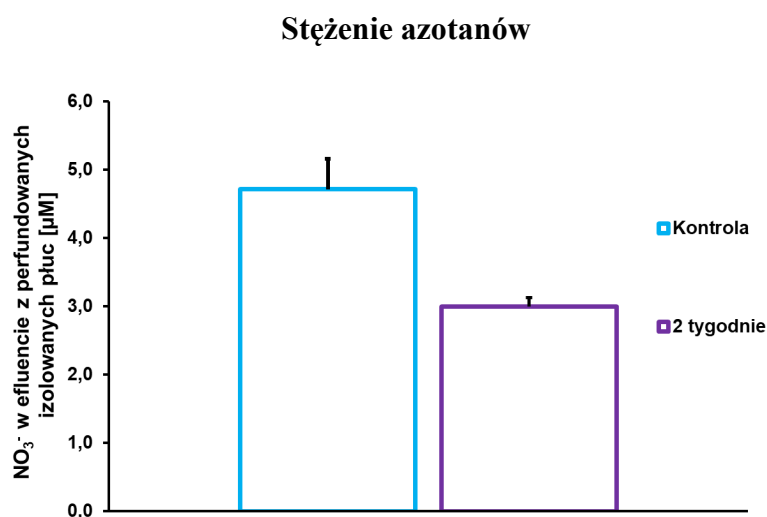
4.1.10 Spadek produkcji azotynów i azotanów w płucach po ortotopowym wszczepieniu komórek 4T1, na wczesnym etapie rozwoju nowotworu u myszy BALB/c

Stężenia zarówno azotynów, jak i azotanów w buforze z izolowanych płuc, perfundowanych w sposób nierecykulacyjny, były niższe u myszy po 2 tygodniach od wszczepienia komórek nowotworowych 4T1 w porównaniu z myszami kontrolnymi (Rycina 12).

A



B



Rycina 12. Stężenie azotynów (A) i azotanów (B) w buforze po perfuzji izolowanych perfundowanych płuc myszy kontrolnych BALB/c oraz perfuzji płuc od myszy BALB/c po 2 tygodniach od wszczepienia komórek nowotworowych 4T1. Wyniki wyrażono jako średnia $\pm$ SEM, $n=3$. Badanie wykonane we współpracy z dr A. Fedorowiczem. Rycina na podstawie wyników E.Buczek i wsp., 2018 (60).

CZEŚĆ II

4.2 OCENA WPŁYWU INHIBITORÓW KINAZ BRAF I MEK NA CZYNNOŚĆ ŚRÓDBŁONKA NACZYNIOWEGO AORTY *IN VIVO* I *EX VIVO* U MYSZY C57BL/6J

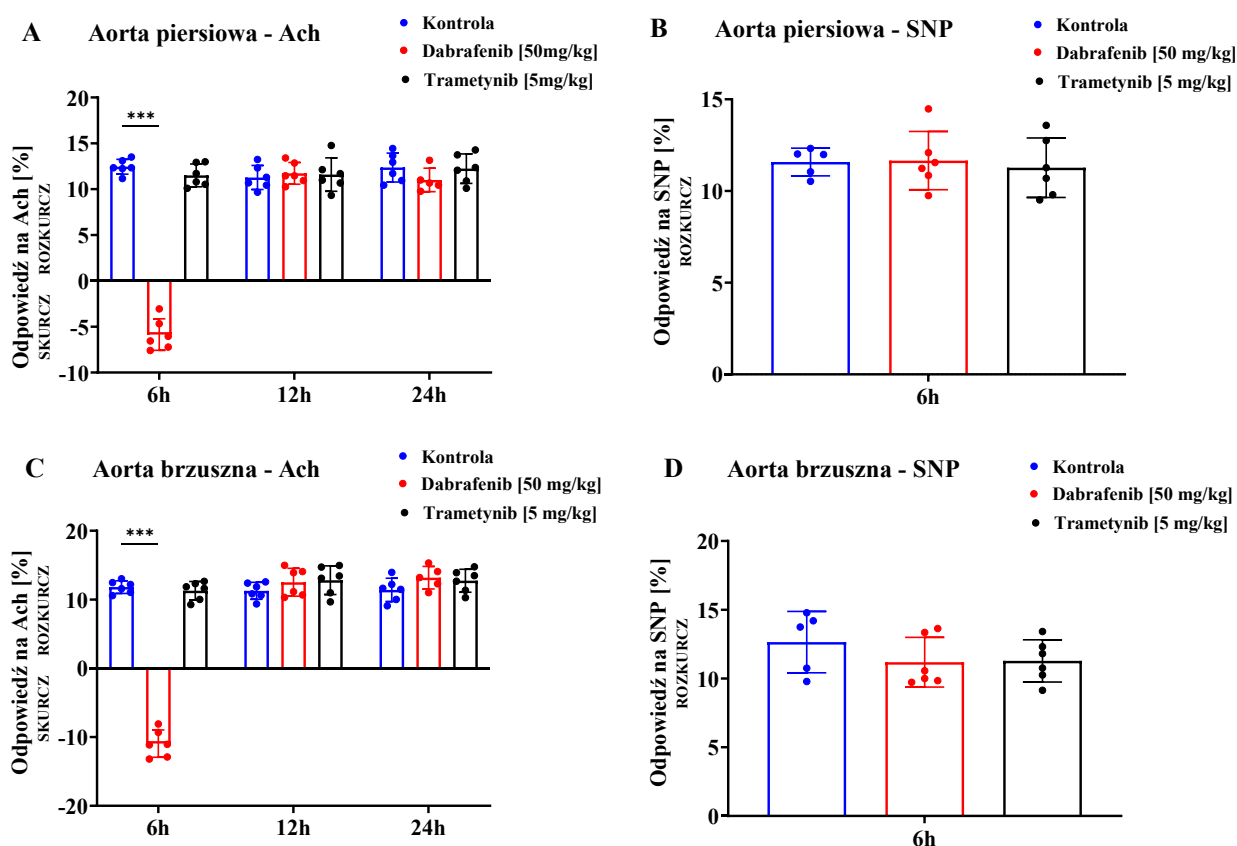
4.2.1 Zmiany czynności śródbłonka naczyniowego po jednorazowym podaniu dabrafenibu *in vivo* u myszy C57BL/6J – badania z wykorzystaniem MRI

Wpływ dabrafenibu i trametynibu na czynność śródbłonka aorty *in vivo* zbadano 6, 12 i 24 godziny po jednorazowym, dootrzewnowym podaniu badanych leków zdrowym myszom C57BL/6J. Funkcja śródbłonka naczyniowego została oceniona na podstawie odpowiedzi rozkurczowej odcinka piersiowego i brzuszego aorty na Ach i SNP za pomocą obrazowania metodą rezonansu magnetycznego – MRI (**Rycina 13**). Zaobserwowano istotne upośledzenie zależnego od śródbłonka naczyniowego rozkurczu odcinka piersiowego i brzuszego aorty w odpowiedzi na Ach 6 godzin po pojedynczym podaniu myszom dabrafenibu (50 mg/kg) (**Rycina 13 A i C**). Dysfunkcja ta miała charakter odwracalny, gdyż po 12 i 24 godzinach od wstrzyknięcia leku upośledzenie rozkurczu nie było już obserwowane. Natomiast nie stwierdzono wpływu na funkcję śródbłonka naczyniowego trametynibu (5 mg/kg) w żadnym punkcie czasowym (**Rycina 13 A, C**). Jednocześnie po 6 godzinach od podania obu leków nie zaobserwowano zmian w odpowiedziach aorty na SNP (**Rycina 13 B, D**).

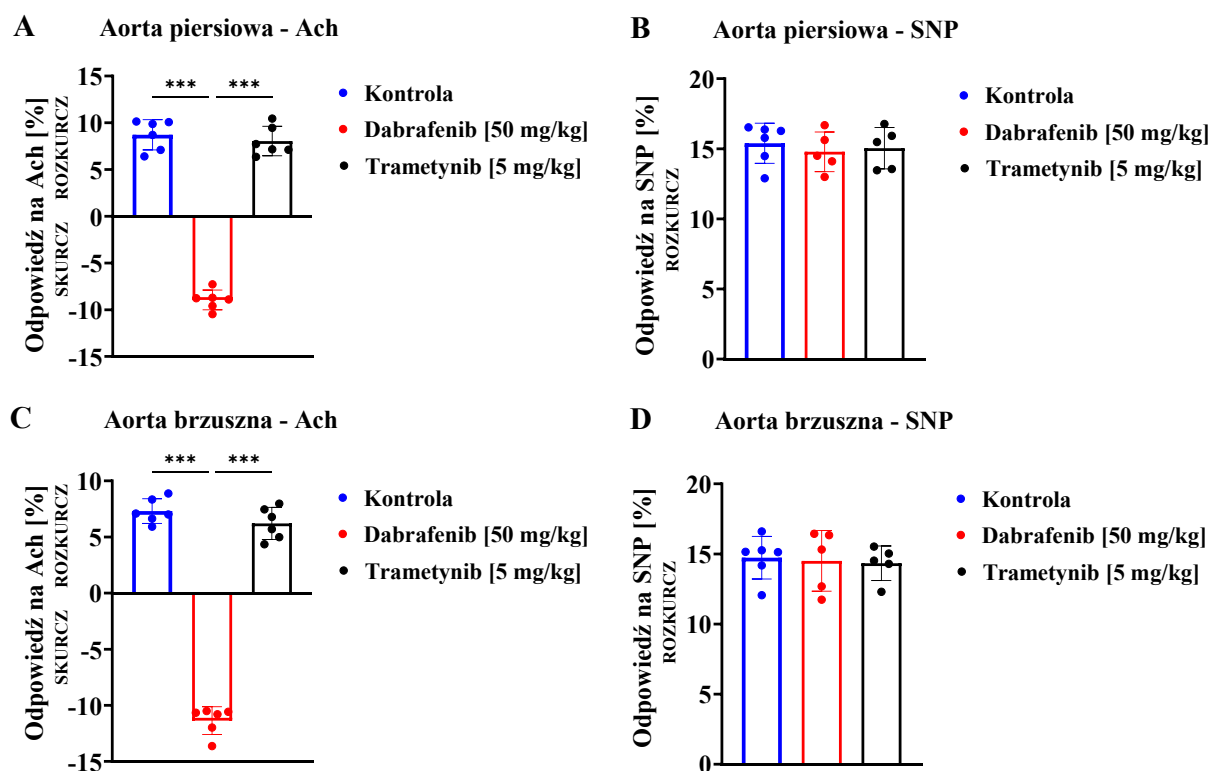
4.2.2 Zmiany czynności śródbłonka *in vivo* u myszy C57BL/6J po 7 dniach podawania dabrafenibu lub trametynibu w paszy – badania z wykorzystaniem MRI

W celu sprawdzenia, czy krótkotrwały efekt dabrafenibu obserwowany 6 godzin po jednorazowym podaniu leku myszom może, w przypadku przedłużonej w czasie ekspozycji myszy na lek, prowadzić do rozwoju dysfunkcji śródbłonka naczyniowego, przeprowadzono doświadczenie, w którym dabrafenib i trametynib podawane były myszom w paszy przez 7 dni. Po 7 dniach podawania leków zaobserwowano upośledzenie zależnego od śródbłonka naczyniowego rozkurczu odcinków piersiowego i brzuszego aorty mysiej *in vivo* w odpowiedzi na Ach u myszy otrzymujących paszę z dabrafenibem. Szkodliwego efektu na śródbłonek naczyniowy nie zaobserwowano jednak u myszy karmionych paszą

z trametynibem (**Rycina 14 A, C**). Jednocześnie nie stwierdzono zmian w odpowiedziach aorty mysiej na SNP (**Rycina 14 B, D**).



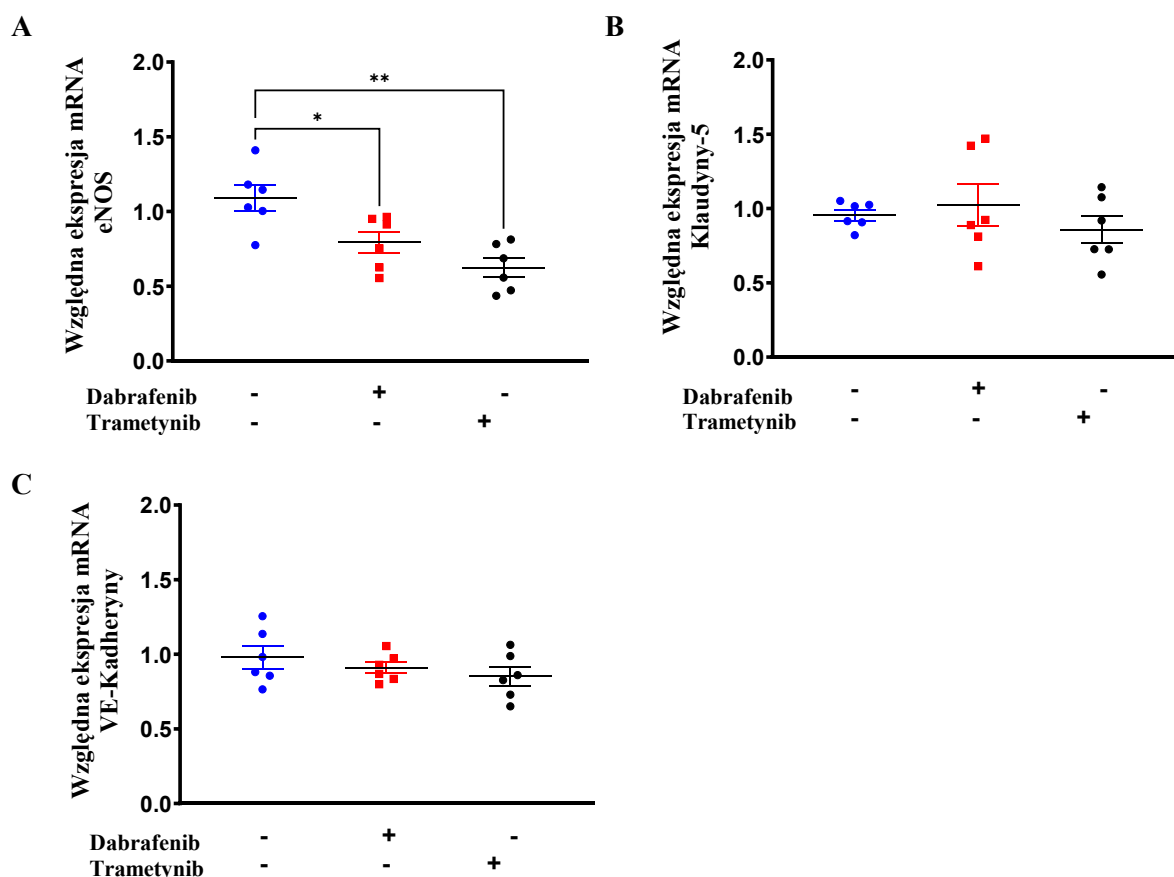
Rycina 13. Wpływ dabrafenibu i trametynibu na czynność śródbłónka naczyniowego piersiowego i brzusznego odcinka aorty myszy C57BL/6J po 6, 12 i 24 godzinach od podania dootrzewnowo w/w leków. Zależny- i niezależny od śródbłónka naczyniowego rozkurcz aorty oceniano *in vivo* za pomocą MRI jako odpowiedź rozkurczową na podanie, odpowiednio, Ach i SNP (A, B) (odcinek piersiowy aorty), oraz (C, D) (odcinek brzuszny aorty). Pomiar MRI wykonano po 6, 12 i 24 godzinach od podania myszom dootrzewnowo badanych leków. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej (A, C) lub jednoczynnikowej (B, D) analizy wariancji ANOVA z testem *post hoc* Tukey'a. Wyniki przedstawiono jako średnią $\pm$ SEM, n=6. Symbol *** oznacza istotność statystyczną przy $p < 0,001$ (Pomiary MRI wykonane we współpracy z Dr A. Bar i Mgr B. Marczyk z JCET, Kraków).



Rycina 14. Wpływ dabrafenibu i trametynibu na czynność śródbłonna naczyniowego odcinków piersiowego i brzusznej aorty u myszy C57BL/6J po 7 dniach podawania leków w paszy. Zależny i niezależny od śródbłonna rozkurcz naczyń oceniano *in vivo* za pomocą MRI jako odpowiedź na podanie Ach i SNP w odcinku piersiowym aorty (A, B) i w odcinku brzusznej (C, D). Pomiary MRI wykonano po 7 dniach podawania myszom dietą AIN-93M z dodatkiem badanych leków. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem *post hoc* Tukey'a. Wyniki przedstawiono jako średnią $\pm$ SEM, $n=6$. Symbol *** oznacza istotność statystyczną przy $p < 0,001$ (Pomiary MRI wykonane we współpracy z Dr A. Bar i Mgr B. Marczyk z JCET, Kraków).

4.2.3 Ekspresja wybranych białek na poziomie mRNA w homogenatach aorty myszy C57BL/6J po 7 dniach podawania dabrafenibu lub trametynibu w paszy

W kolejnych doświadczeniach zbadano wpływ dabrafenibu i trametynibu na ekspresję wybranych genów, których zmiany mogłyby tłumaczyć obserwowane upośledzenie czynności śródbłonna naczyniowego: eNOS oraz białek odpowiedzialnych za utrzymanie połączeń między komórkami śródbłonna naczyniowego i regulację przepuszczalności: VE-kadheryny oraz Klaudyny-5. Stwierdzono istotne statystycznie obniżenie ekspresji eNOS wywołane zarówno przez dabrafenib jak i trametynib (**Rycina 15 A**). Natomiast żaden z badanych leków nie miał wpływu na ekspresję białek związanych z przepuszczalnością śródbłonna naczyniowego (Klaudyny-5 i VE-kadheryny) (**Rycina 15 B i C**).

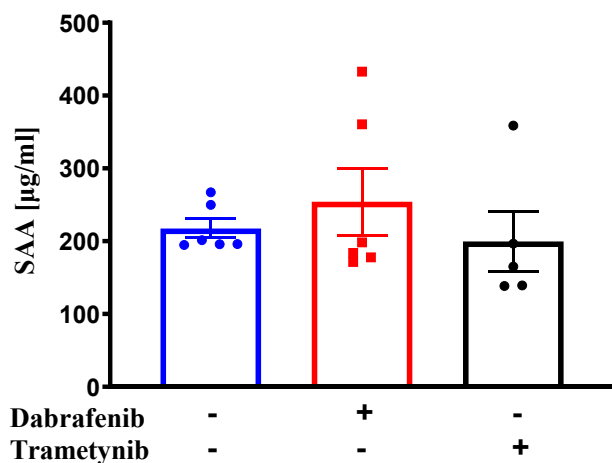


Rycina 15. Ekspresja eNOS, Klaudyny-5 i VE-kadheryny w aortach myszy C57BL/6J karmionych 7 dni paszą zawierającą dabrafenib lub trametinib. Ekspresję wybranych genów mierzono z wykorzystaniem techniki qRT-PCR. Wyniki przedstawiają analizę ekspresji genów na poziomie mRNA dla eNOS (A); Klaudyny-5 (B); VE-Kadheryny (C) w homogenatach aorty piersiowej myszy karmionych 7 dni paszą z badanymi lekami. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem *post hoc* Tukey'a. Wyniki przedstawiono jako średnią $\pm$ SEM, dla $n = 6$. Symbole * i ** oznaczają istotność statystyczną, odpowiednio przy $p < 0,05$ i $p < 0,01$ w porównaniu z grupą kontrolną (Analizy metodą qRT-PCR wykonane we współpracy z Dr A. Gdulą z JCET, Kraków).

4.2.4 Zmiany parametrów morfologii krwi oraz stężenie surowiczego amyloidu A (SAA) w osoczu myszy C57BL/6J po 7 dniach podawania dabrafenibu lub trametinibu w paszy.

W kolejnym etapie badań dotyczących poszukiwania mechanizmu odpowiedzialnego za rozwój dysfunkcji śródbłonna naczyniowego w odpowiedzi na dabrafenib, sprawdzono także wpływ badanych leków na stężenie markera ogólnoustrojowego stanu zapalnego, SAA, w osoczu (**Rycina 16**) oraz na parametry morfologii krwi zwierząt. Nie stwierdzono istotnych zmian w stężeniu SAA ani ilości WBC, które mogłyby świadczyć o wpływie badanych leków na ogólnoustrojową odpowiedź zapalną. Stwierdzono jedynie niewielkie, ale znamienne zmiany w liczbie RBC, stężeniu HGB i średniej objętości krwinki czerwonej MCH u myszy

karmionych paszą z trametynibem w porównaniu do myszy kontrolnych, oraz zmiany w stężeniu HGB i HCT w porównaniu do myszy karmionych paszą z dabrafenibem (**Tabela 4**).



Rycina 16. Stężenie SAA w osoczu myszy C57BL/6J po 7 dniach karmienia paszą zawierającą dabrafenib lub trametynib. Istotność statystyczną oceniono za pomocą testu nieparametrycznego Kruskala–Wallisa z testem *post hoc* Dunn’a. Wyniki wyrażono jako średnią $\pm$ SEM, dla $n = 6$, nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami.

	Kontrola	Dabrafenib	Trametynib
PLT [$K \cdot \mu l^{-1}$]	879,67 $\pm$ 23,69	976,83 $\pm$ 41,17	949,33 $\pm$ 114,61
RBC [$M \cdot \mu l^{-1}$]	8,71 $\pm$ 0,10	8,26 $\pm$ 0,21	7,18 $\pm$ 0,47**
WBC [$K \cdot \mu l^{-1}$]	2,93 $\pm$ 0,23	4,40 $\pm$ 0,52	4,35 $\pm$ 0,41
HCT [%]	40,95 $\pm$ 0,50	38,90 $\pm$ 0,97#	34,17 $\pm$ 1,70**
HGB [$K \cdot \mu l^{-1}$]	12,75 $\pm$ 0,17	12,20 $\pm$ 0,29#	10,62 $\pm$ 0,53**
MCV [fl]	47,00 $\pm$ 0,00	47,00 $\pm$ 0,00	48,00 $\pm$ 1,00
MCH [pg]	14,65 $\pm$ 0,06	14,75 $\pm$ 0,07	14,92 $\pm$ 0,34

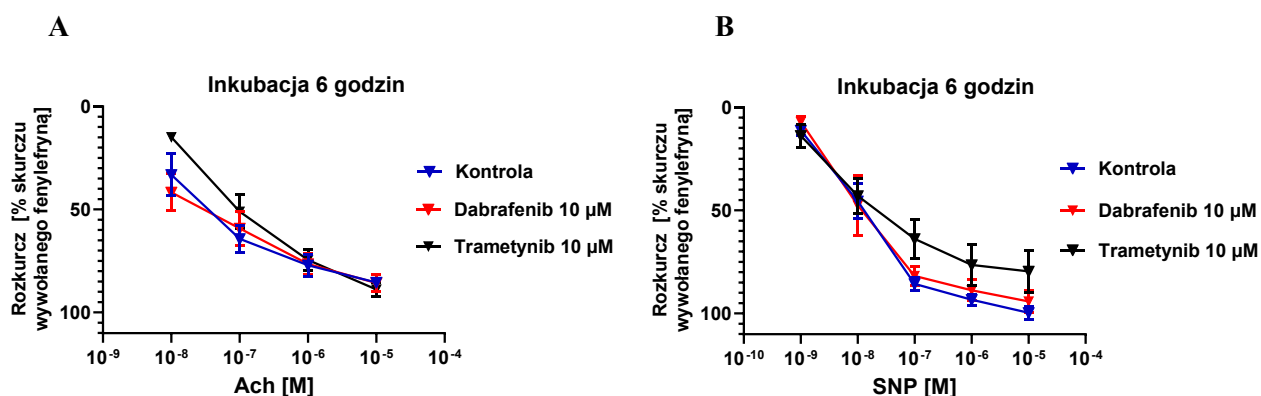
Tabela 4. Parametry morfologii krwi myszy C57BL/6J po 7 dniach karmienia paszą zawierającą dabrafenib lub trametynib. PLT, płytki krwi; RBC, krwinki czerwone; WBC, białe krwinki; HCT, hematokryt; HGB, hemoglobina; MCV, średnia objętość krwinki czerwonej; MCH, średnia hemoglobina komórkowa. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem *post hoc* Tukey’a. Dane wyrażono jako średnia $\pm$ SEM, symbol # oznacza $p < 0,05$ w porównaniu z grupą karmioną trametynibem; symbol ** oznacza $p < 0,01$ w porównaniu z grupą kontrolną.

4.2.5 Wpływ dabrafenibu i trametynibu na czynność śródbłonka naczyniowego *in vivo* u myszy C57BL/6J – podsumowanie wyników

Otrzymane wyniki badań *in vivo* sugerują, że dabrafenib i trametynib różniły się mechanizmami oddziaływania na śródbłonek naczyniowy. Mimo iż oba leki zmniejszały ekspresję eNOS mierzoną na poziomie mRNA, tylko dabrafenib wywołał dysfunkcję śródbłonka widoczną w badaniach czynnościowych jako upośledzenie rozkurczu aorty mysiej w odpowiedzi na Ach. Nie stwierdzono wpływu żadnego z badanych leków na wskaźniki stanu zapalnego (SAA, WBC), ale u zwierząt, którym podawano trametynib, zaobserwowano zmiany parametrów czerwonych krwinek (RBC, HGB, HCT). W celu lepszego zrozumienia mechanizmów oddziaływania dabrafenibu i trametynibu na śródbłonek naczyniowy obserwowanych w doświadczeniach *in vivo*, opracowano model *ex vivo* umożliwiający badanie upośledzenia czynności śródbłonka naczyniowego aorty wywołanego badanymi lekami w izolowanym naczyniu.

4.2.6 Brak wpływu dabrafenibu i trametynibu na czynność śródbłonka w izolowanej aorcie myszy C57BL/6J po 6 godzinach inkubacji

Zbadano odpowiedź rozkurczową aorty zależną i niezależną od śródbłonka naczyniowego po 6 godzinach inkubacji aorty z dabrafenibem i z trametynibem. W przeciwieństwie do obserwowanego po 6 godzinach od podania *in vivo* negatywnego działania dabrafenibu na czynność śródbłonka naczyniowego aorty, w badaniu *ex vivo* nie zaobserwowano upośledzenia zależnej od śródbłonka naczyniowego odpowiedzi rozkurczowej aorty na Ach po 6 godzinach inkubacji z dabrafenibem, jak i trametynibem (**Rycina 17 A**). Zaobserwowano jedynie nieznaczny wpływ trametynibu na niezależny od śródbłonka rozkurcz naczyń w odpowiedzi na SNP, który nie był istotny statystycznie (**Rycina 17 B**).



Rycina 17. Brak wpływu dabrafenibu i trametynibu na czynność śródbłonna w izolowanej aorcie myszy C57BL/6J *ex vivo* po 6 godzinach inkubacji. Wpływ w/w leków na funkcję śródbłonna naczyniowego oceniono przy użyciu miografu 620M. Wpływ dabrafenibu i trametynibu na zależny od śródbłonna rozkurcz krążków aorty po 6 godzinach inkubacji (A). Wpływ w/w leków na niezależną od śródbłonna odpowiedź na SNP (B). Analizę statystyczną przeprowadzono, w zależności od rozkładu danych, przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA lub testu Kruskala-Wallisa, z odpowiednimi testami *post hoc*. Dane wyrażono jako średnia $\pm$ SEM, $n=6$ (po 2 krążki z jednej myszy na grupę).

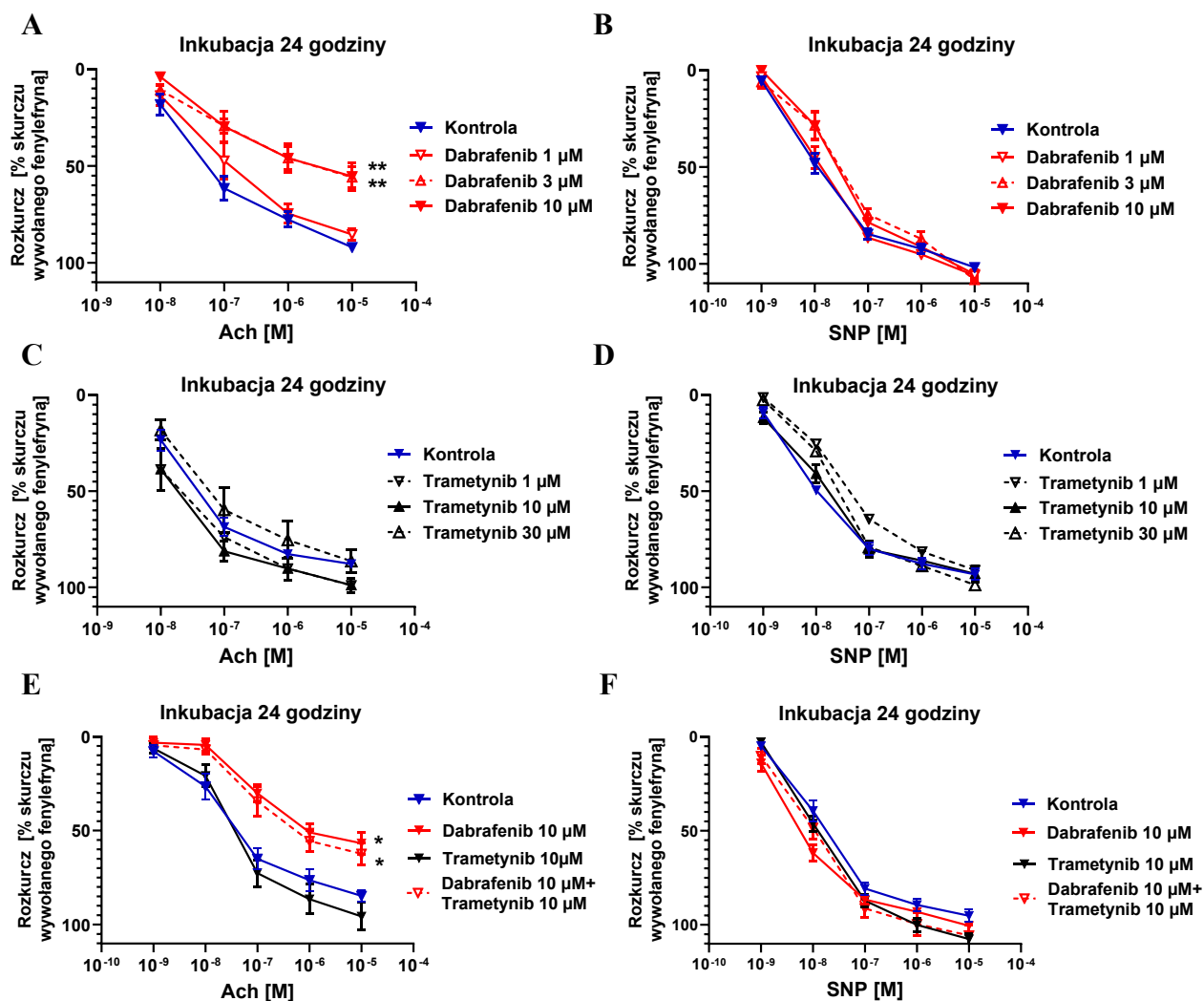
4.2.7 Upośledzenie czynności śródbłonna naczyniowego przez dabrafenib, ale nie przez trametynib po 24 godzinach inkubacji w izolowanej aorcie myszy C57BL/6J

Po wydłużeniu czasu inkubacji krążków aorty mysiej z dabrafenibem i trametynibem do 24 godzin stwierdzono upośledzenie rozkurczu aorty w odpowiedzi na Ach wywołane, analogicznie jak w modelach *in vivo*, jedynie przez dabrafenib (**Rycina 18 A**), ale nie przez trametynib (**Rycina 18 C**). Ponadto, obserwowano upośledzenie zależnego od śródbłonna naczyniowego rozkurczu aorty inkubowanej z kombinacją obu leków (**Rycina 18 E**). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w odpowiedziach na SNP krążków aorty inkubowanych z badanymi lekami (**Rycina 18 B, D, F**).

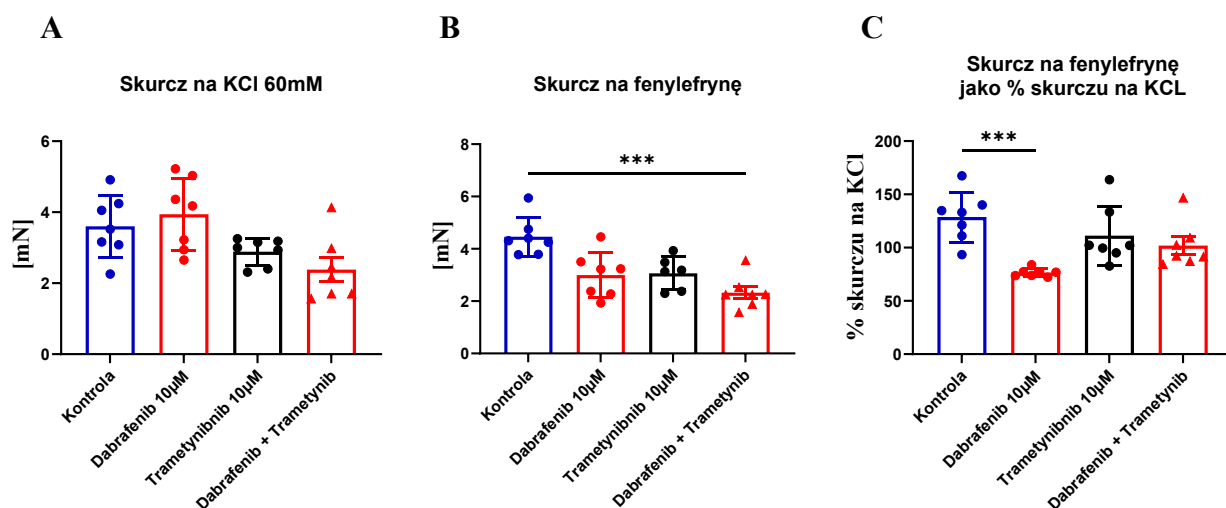
4.2.8 Zmiany w kurczliwości aort w odpowiedzi na chlorek potasu i fenylefrynę, po 24 godzinach inkubacji z dabrafenibem i trametynibem w izolowanej aorcie myszy C57BL/6J

W badaniach czynnościowych z użyciem miografu 620M oceniono także wpływ dabrafenibu i trametynibu na kurczliwość naczyń. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w odpowiedziach krążków aorty inkubowanych z badanymi lekami na KCl, (**Rycina 19**). Natomiast stwierdzono nieznaczne zmniejszenie skurczu maksymalnego w odpowiedzi na fenylefrynę w krążkach aorty inkubowanych 24 godziny z dabrafenibem

i z trametynibem (**Rycina 19 B**) oraz istotnie statystycznie upośledzenie skurczu krążków inkubowanych z ich kombinacją (**Rycina 19 B**). Skurcz krążków aorty w odpowiedzi na fenylefrynę wyrażony jako % skurczu maksymalnego w odpowiedzi na KCl był istotnie zmniejszony w krążkach aorty inkubowanych z dabrafenibem (**Rycina 19 C**).



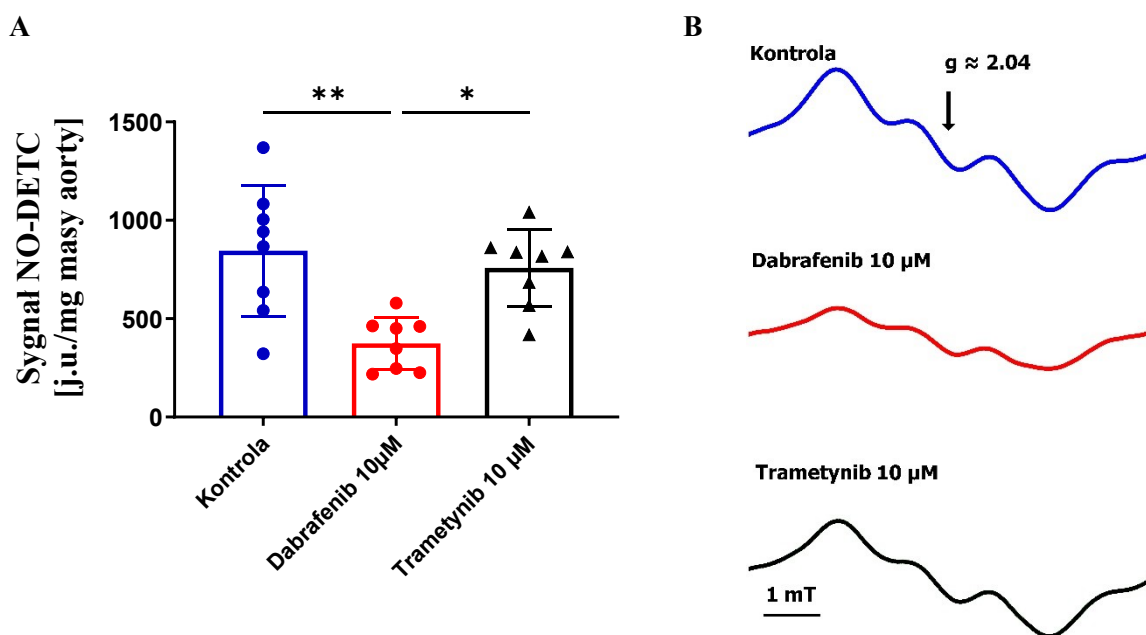
Rycina 18. Wpływ dabrafenibu i trametynibu na czynność śródbłónka naczyniowego izolowanej aorty myszy C57BL/6J *ex vivo* po 24 godzinach inkubacji. Wpływ w/w leków na funkcję śródbłónka naczyniowego oceniono przy użyciu miografu 620M. Wpływ dabrafenibu w stężeniach 1, 3 i 10 μ M na zależny od śródbłónka naczyniowego rozkurcz krążków aorty (A). Wpływ trametynibu w stężeniach 1, 10 i 30 μ M na zależny od śródbłónka rozkurcz krążków aorty (C). Wpływ kombinacji dabrafenibu i trametynibu na zależny od śródbłónka rozkurcz krążków aorty (E). Wpływ badanych leków i ich kombinacji na niezależną od śródbłónka odpowiedź rozkurczową naczyń na SNP (B,D,F). Analizę statystyczną przeprowadzono, w zależności od rozkładu danych, przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA lub testu Kruskala Wallisa, z odpowiednimi testami *post hoc*. Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SEM, n = 6–10 (po 2 krążki od jednej myszy), symbol * oznacza $p < 0,05$; ** oznacza $p < 0,01$ w porównaniu do kontroli.



Rycina 19. Wpływ dabrafenibu, trametynibu i kombinacji tych leków na kurczliwość krążków aorty myszy C57BL/6J *ex vivo* po 24 godzinach inkubacji. Wpływ w/w leków na skurcz oceniono przy użyciu miografu 620M. Odpowiedzi skurczowe naczyń na KCl 60mM (A). Skurcz maksymalny naczyń w odpowiedzi na fenylefrynę 3μM (B). Skurcz krążków aorty w odpowiedzi na fenylefrynę (3μM) wyrażony jako % skurczu maksymalnego na KCl (60 mM) (C). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem *post hoc* Tukey'a. Symbol *** oznacza $p < 0,001$. Wyniki wyrażono jako średnia $\pm$ SEM, $n = 7$ (po 2 krążki aorty od jednej myszy).

4.2.9 Istotny spadek produkcji NO w izolowanych aortach myszy C57BL/6J inkubowanych 24 godziny z dabrafenibem

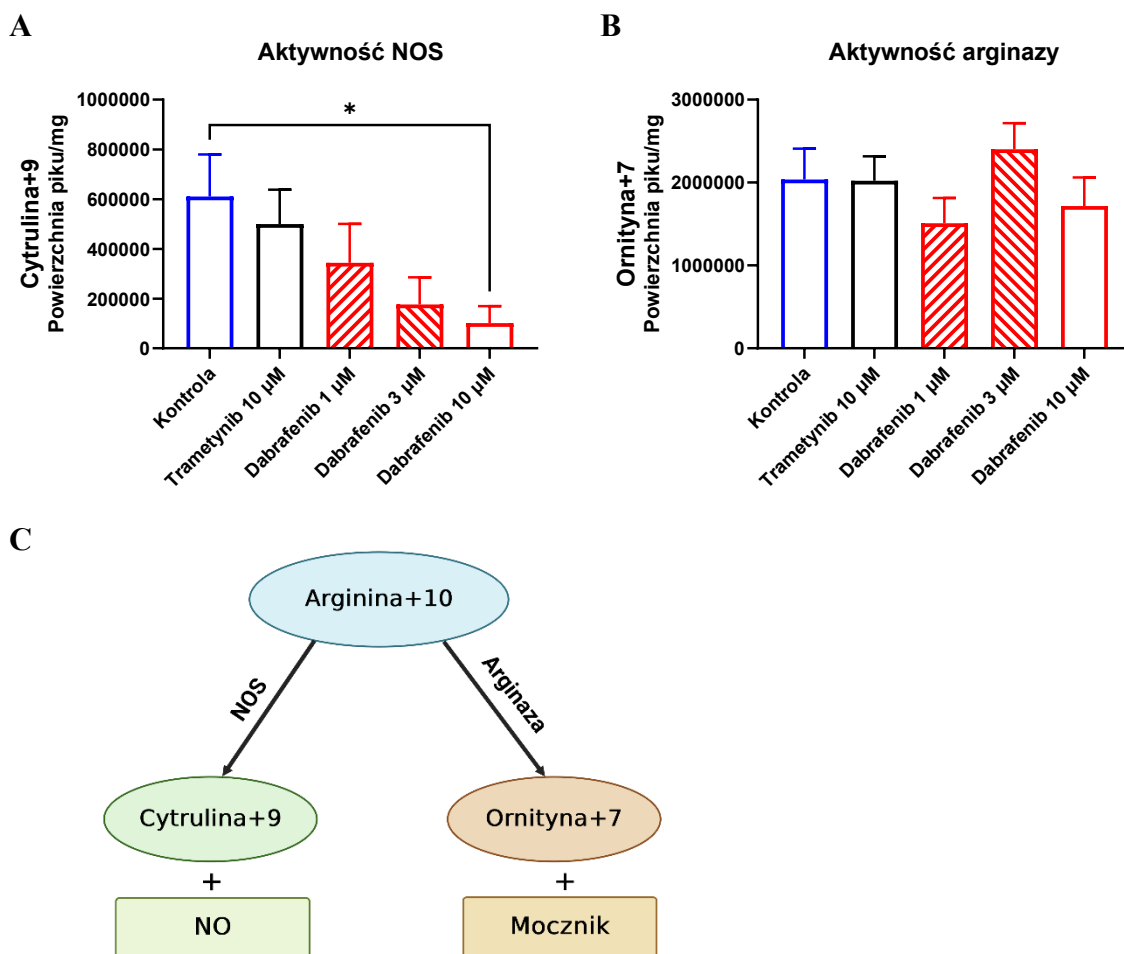
W celu potwierdzenia czy obserwowane po 24 godzinach inkubacji upośledzenie odpowiedzi naczyniorozkurczowej na Ach przez dabrafenib było związane z upośledzeniem produkcji NO, zbadano produkcję NO w izolowanych aortach mysich inkubowanych z dabrafenibem i z trametynibem. Przeprowadzone pomiary wykazały statystycznie istotne upośledzenie produkcji NO wywołane przez dabrafenib, podczas gdy trametynib nie wywoływał takiego efektu (Rycina 20 A, B).



Rycina 20. Produkcja NO w aortach myszy C57BL/6J inkubowanych *ex vivo* przez 24 godziny z dabrafenibem lub trametynibem. Pomiar przeprowadzono z wykorzystaniem elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR). Sygnały NO-DETC z aort inkubowanych z dabrafenibem lub z trametynibem w porównaniu do aort kontrolnych, znormalizowane na masę aort (A). Uśrednione widma EPR dla poszczególnych grup (B). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem *post hoc* Tukey’a. Dane przedstawiają średnie $\pm$ SEM, symbol * oznacza $p < 0,05$; ** oznacza $p < 0,01$ (Pomiary EPR wykonane we współpracy z Dr J. Pyką z JCET).

4.2.10 Aktywność eNOS w aortach myszy C57BL/6J inkubowanych z dabrafenibem lub trametynibem przez 24 godziny

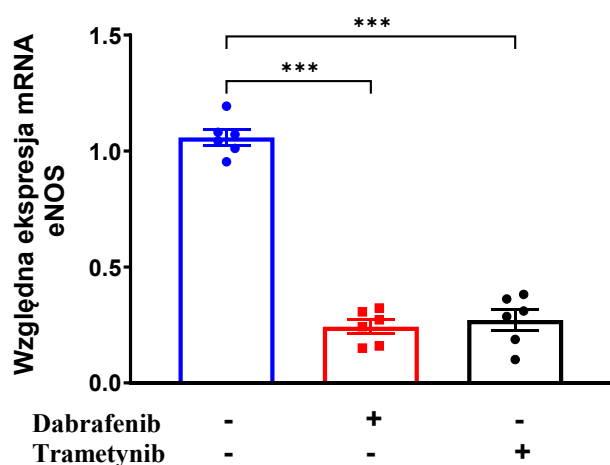
W celu zbadania, czy zmniejszona produkcja NO w aortach myszy C57BL/6J po inkubacji z dabrafenibem była związana ze zmniejszoną aktywnością eNOS, aortę inkubowaną ze znakowaną $^{13}\text{C}_6,^{15}\text{N}_4$ L-argininą (Arginina+10) i zmierzono w medium hodowlanym poziom sygnału pochodzącego od $^{13}\text{C}_6,^{15}\text{N}_3\text{L}$ -Cytruliny (Cytrulina+9) po inkubacji aorty z badanymi lekami. W aortach inkubowanych w obecności dabrafenibu stwierdzono, zależne od stężenia dabrafenibu, zmniejszenie siły sygnału od Cytruliny+9 w stosunku do kontroli, które było istotne statystycznie dla dabrafenibu w stężeniu 10 μM (**Rycina 21 A**). Świadczy to o obniżeniu aktywności eNOS w aortach inkubowanych z dabrafenibem, podczas gdy trametynib nie wpływał na aktywność eNOS. Nie stwierdzono ponadto wpływu dabrafenibu, ani trametynibu na poziom sygnału pochodzącego od $^{13}\text{C}_5,^{15}\text{N}_2\text{L}$ -Ornityny (Ornityny+7), czyli na drugi szlak metabolizmu L-argininy, z udziałem enzymu arginazy (**Rycina 21 B**).



Rycina 21. Ocena aktywności syntazy tlenku azotu w aortach myszy C57BL/6J inkubowanych *ex vivo* 24 godziny z dabrafenibem lub trametynilbem z zastosowaniem analizy metabolomicznej i śledzenia szlaku metabolizmu znakowanej izotopowo L-argininy (Tracer-based metabolomics). Aktywność eNOS oceniona na podstawie metabolizmu znakowanej izotopowo Argininy+10 do Cytruliny+9 (A). Aktywność arginazy, na podstawie metabolizmu znakowanej izotopowo Argininy+10 do Ornityny+7 (B). Schematyczne przedstawienie metabolizmu znakowanej Argininy+10 w komórkach śródbłonna (utworzono w BioRender.com) (C). Poziomy $^{13}\text{C}_6,^{15}\text{N}_3$ L-Cytruliny (Cytrulina+9) oraz $^{13}\text{C}_5,^{15}\text{N}_2$ L-Ornityny (Ornityna+7), znakowanych metabolitów $^{13}\text{C}_6,^{15}\text{N}_4$ L-argininy (Arginina+10), zmierzono techniką LC-MS i znormalizowano na mg masy aorty. Istotność statystyczną oceniono za pomocą testu nieparametrycznego Kruskala–Wallisa z testem *post hoc* Dunn’a. Dane przedstawiają średnie $\pm$ SEM, symbol * oznacza $p < 0,05$. (Pomiary LC-MS wykonano we współpracy z Dr K. Pendian, Leiden Academic Centre for Drug Research, Leiden, Holandia).

4.2.11 Zmiany ekspresji eNOS na poziomie mRNA, w aortach myszy C57BL/6J inkubowanych 24 godziny z dabrafenibem lub trametynibem

W aortach myszy C56BL/6J inkubowanych 24 godziny w obecności dabrafenibu lub trametynibu zmierzono ekspresję śródbłonkowej syntazy tlenku azotu na poziomie mRNA. Ekspresja eNOS na poziomie mRNA była istotnie obniżona zarówno w aortach inkubowanych z dabrafenibem, jak i z trametynibem (**Rycina 22**).

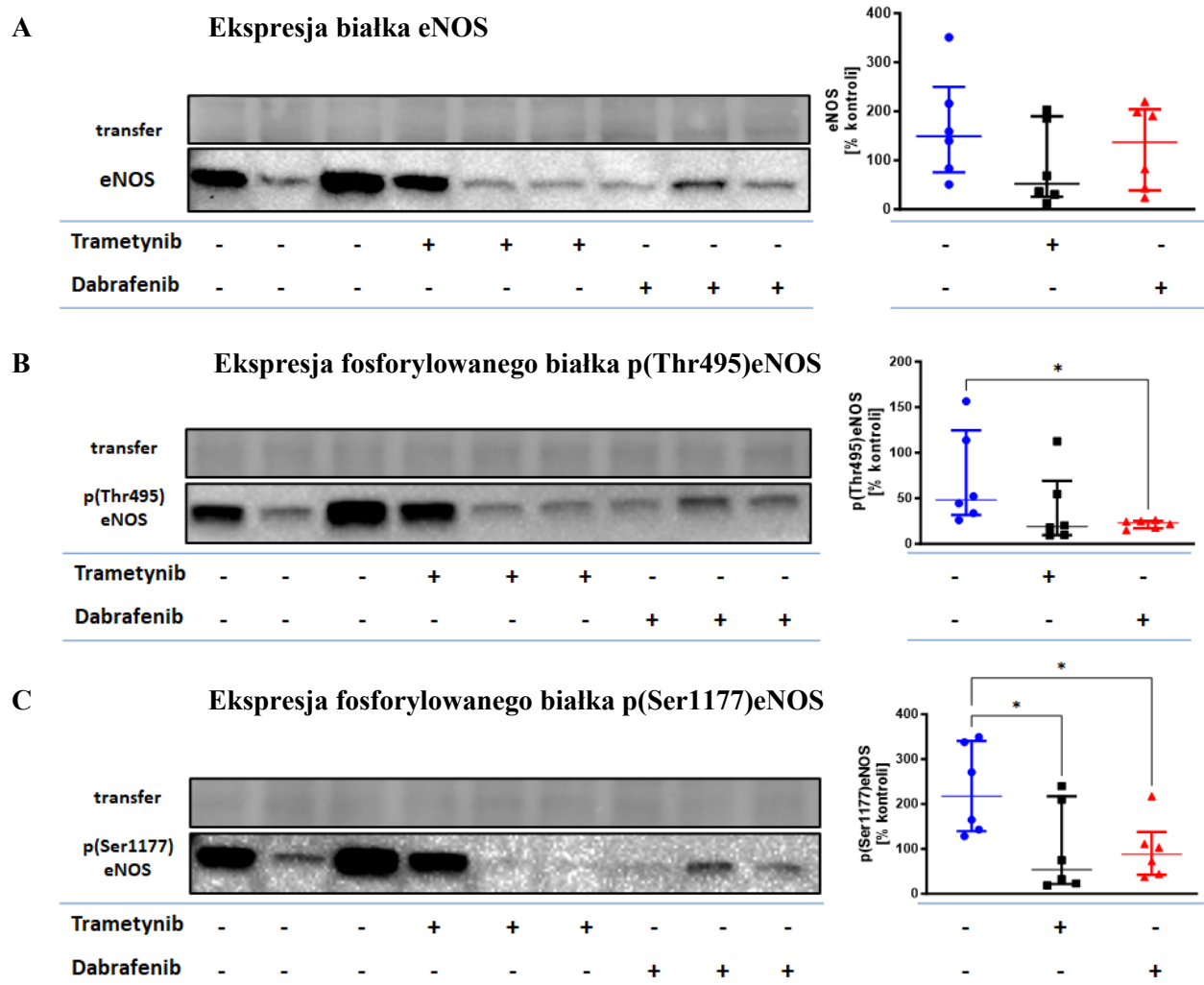


Rycina 22. Ekspresja eNOS na poziomie mRNA w aortach myszy C57BL/6J inkubowanych 24 godziny *ex vivo* z dabrafenibem lub trametynibem. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem *post hoc* Tukey’a. Dane przedstawiają średnie $\pm$ SEM, *** oznacza $p < 0,001$ (Analizy RT-PCR wykonane we współpracy z Dr A. Gdulą z JCET, Kraków).

4.2.12 Zmiany ekspresji eNOS na poziomie białka w aortach myszy C57BL/6J inkubowanych 24 godziny z dabrafenibem lub trametynibem

W aortach myszy C57BL/6J inkubowanych 24 godziny w obecności dabrafenibu lub trametynibu zmierzono także ekspresję eNOS na poziomie białka, która była tylko nieznacznie obniżona w aortach inkubowanych z dabrafenibem i trametynibem (**Rycina 23 A**). Ponadto, zmierzono poziom fosforylacji eNOS wykazując istotnie niższy poziom fosforylacji treoniny 195 (Thr195) w obszarze tego enzymu (p(Thr195)eNOS) w aortach mysich inkubowanych z dabrafenibem (**Rycina 23 B**) co mogłoby wskazywać na większą aktywność eNOS (fosforylacja eNOS-Thr(495) ma hamujący wpływ na aktywność eNOS) (61). Ponadto,

wykazano niższy poziom fosforylacji seryny 1177 (Ser1177) w cząsteczkach eNOS (p(Ser1177)eNOS) zarówno w aortach mysich inkubowanych z dabrafenibem jak i z trametynibem (**Rycina 23 C**), co mogło by wskazywać na niższą aktywność eNOS (61).

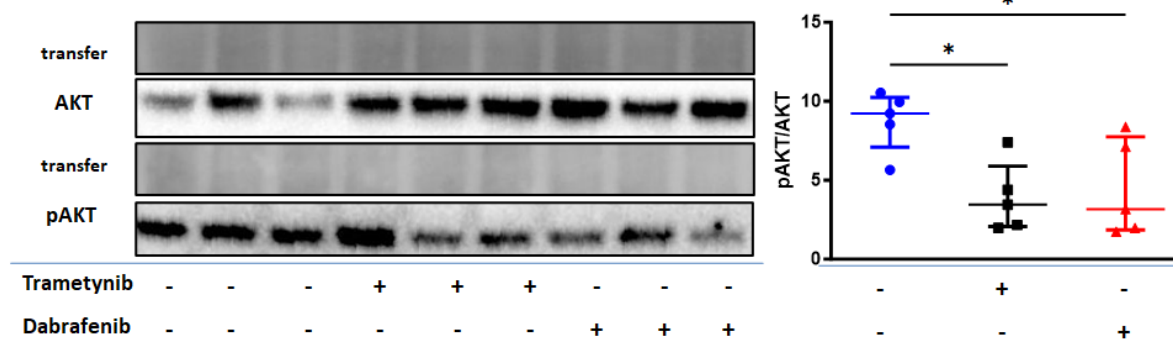


Rycina 23. Ekspresja eNOS w aortach myszy C57BL/6J inkubowanych *ex vivo* przez 24 godziny z dabrafenibem lub trametynibem. Wpływ dabrafenibu i trametynibu na zmiany ekspresji eNOS na poziomie białka (A). Wpływ w/w leków na ekspresję fosforylowanego białka p(Thr495)eNOS (B) i fosforylowanego białka p(Ser1177)eNOS (C). Ekspresję białek zmierzono metodą Western Blot. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem *post hoc* Tukey'a (A, C) oraz testu Kruskala–Wallisa z testem *post hoc* Dunn'a (B). Dane przedstawiają średnie $\pm$ SEM, symbol * oznacza $p < 0,05$.

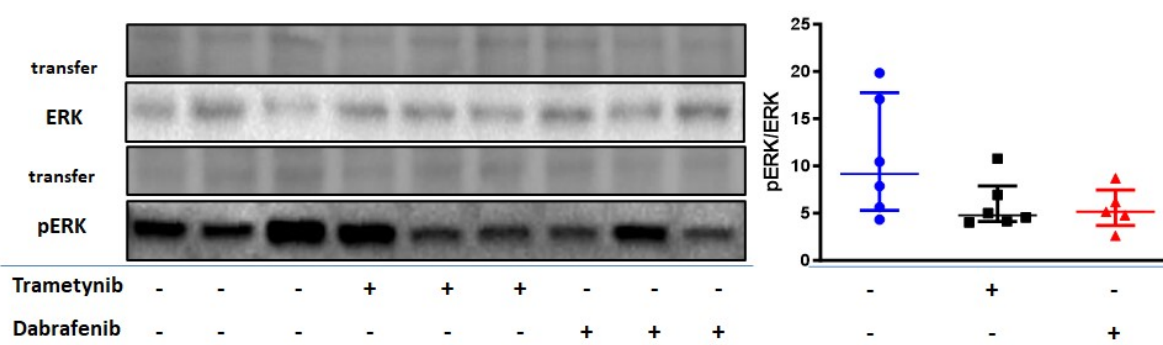
4.2.13 Ekspresja kinaz AKT i ERK na poziomie białka w aortach myszy C57BL/6J inkubowanych 24 godziny z dabrafenibem lub trametynibem

W aortach myszy C57BL/6J inkubowanych 24 godziny z dabrafenibem lub z trametynibem zmierzono także ekspresję kinaz AKT i ERK na poziomie białka oraz poziom ich fosforylacji. Poziom względnej fosforylacji kinazy AKT był istotnie niższy zarówno w aortach mysich inkubowanych z dabrafenibem jak i trametynibem (**Rycina 24 A**). Podobnie, względny poziom fosforylacji kinazy ERK był obniżony zarówno w aortach inkubowanych z dabrafenibem jak i z trametynibem (**Rycina 24 B**).

A Ekspresja białka AKT oraz fosforylowanego białka pAKT



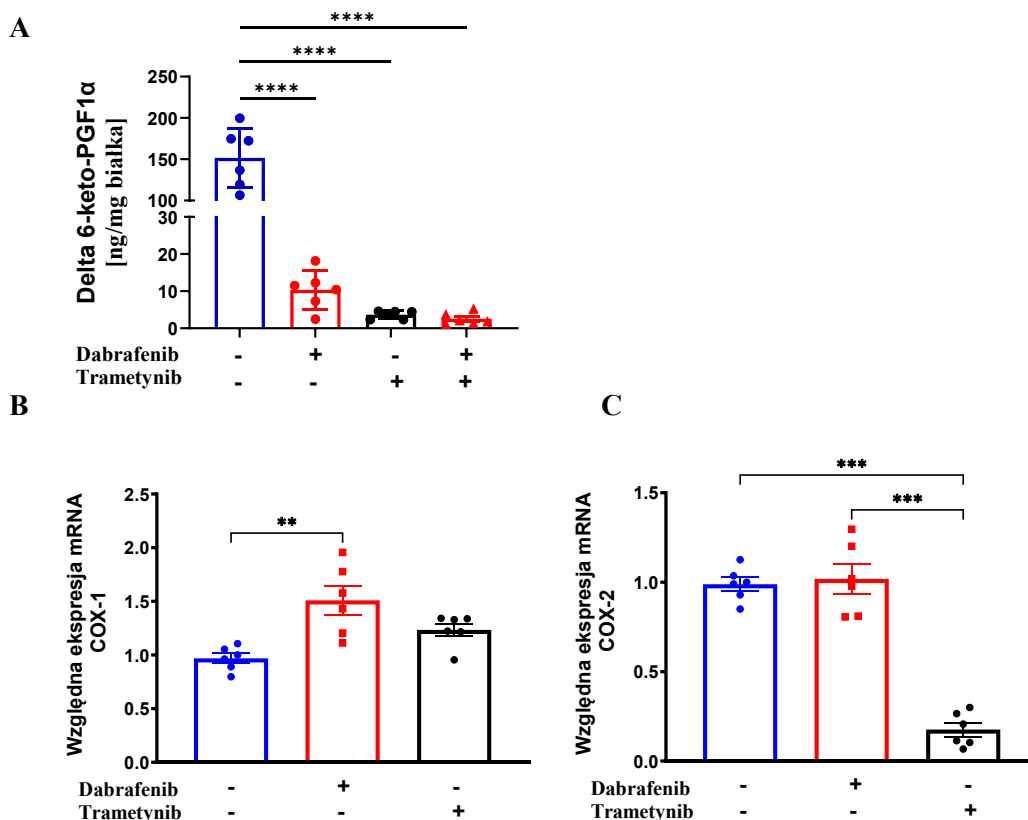
B Ekspresja białka ERK oraz fosforylowanego białka pERK



Rycina 24. Ekspresja na poziomie białka oraz poziom fosforylacji kinaz AKT (A) i ERK (B) w aortach myszy C57BL/6J inkubowanych *ex vivo* 24 godziny z dabrafenibem lub trametynibem. Poziom całkowitej formy kinazy AKT i ERK, oraz względny poziom ich fosforylacji zmierzono metodą Western Blot. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem *post hoc* Tukey'a. Dane przedstawiają średnie $\pm$ SEM, * oznacza $p < 0,05$; $n=5-6$.

4.2.14 Zmiany produkcji PGI₂ oraz zmiany ekspresji COX-1 i COX-2 na poziomie mRNA w aortach myszy C57BL/6J inkubowanych 24 godziny z dabrafenibem lub trametynibem

Produkcję prostacykliny w medium hodowlanym po 24 godzinach inkubacji aort myszy C57BL/6J z dabrafenibem, trametynibem oraz kombinacją obu tych leków zmierzono określając stężenie 6-keto-PGF1 α . Stwierdzono znaczny spadek produkcji PGI₂ w aortach myszy C57BL/6J zarówno pod wpływem dabrafenibu jak i pod wpływem trametynibu, jak i po zastosowaniu kombinacji obu tych leków (**Rycina 25 A**). Następnie sprawdzono wpływ dabrafenibu i trametynibu na ekspresję dwóch izoform COX na poziomie mRNA i wykazano zwiększoną ekspresję COX-1 w aortach myszy C57BL/6J inkubowanych z dabrafenibem (**Rycina 25 B**), oraz zmniejszoną ekspresję mRNA COX-2 w aortach inkubowanych z trametynibem (**Rycina 25 C**).



Rycina 25. Produkcja PGI₂ (A) oraz ekspresja COX-1 i COX-2 w aortach myszy C57BL/6J inkubowanych *ex vivo* z dabrafenibem lub trametynibem (B). Ekspresję białek na poziomie mRNA oceniano techniką qRT-PCR. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu Kruskala–Wallisa z testem *post hoc* Dunn’a (B) oraz jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem *post hoc* Tukey’a (C). Dane przedstawiają średnie $\pm$ SEM, symbol ** oznacza $p < 0,01$; symbol *** oznacza $p < 0,001$; symbol **** oznacza $p < 0,0001$ (pomiarzy qRT-PCR wykonane we współpracy z Dr A.Gdulą z JCET, Kraków).

4.2.15 Aktywność kinaz serynowo-treoninowych w aortach myszy C57BL/6J inkubowanych przez 24 godziny z dabrafenibem, trametynibem oraz kombinacją tych leków

Na podstawie uwidocznionych różnic fosforylacji substratów peptydowych pomiędzy badanymi grupami (**Tabela 5**) przeprowadzono analizę profilu aktywności kinaz (analiza UKA – ang. upstream kinase analysis). W aortach inkubowanych z dabrafenibem zaobserwowano znaczne zwiększenie aktywności kinaz serynowo-treoninowych (STK) w porównaniu z grupą kontrolną. Najbardziej zmienionymi kinazami wskazanymi w analizie UKA były: PRKACA (ang. protein kinase A catalytic subunit α), PRKG2 (ang. protein kinase, cGMP-dependent, type II), PKN1 (ang. protein kinase N1), RPS6KA5 (ang. ribosomal protein S6 kinase α -5), CAMK2A (ang. Calcium/calmodulin dependent protein kinase II α), PRKG1 (ang. protein kinase cGMP-dependent 1), PRKX (ang. protein kinase CAMP-Dependent X-Linked catalytic subunit), CAMK2D (ang. Calcium/calmodulin dependent protein kinase II δ), CAMK4 (ang. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV), CAMK2G (ang. Calcium/calmodulin dependent protein kinase II γ) (**Rycina 26 A, B**). W sumie w aortach inkubowanych z dabrafenibem w porównaniu do kontrolnych analiza UKA wykazała możliwą zmianę aktywności (wskaźnik kinazy $>1,3$) 50 kinaz serynowo – treoninowych (**Tabela 6, Rycina 28**).

W aortach inkubowanych z samym trametynibem zaobserwowano tylko niewielki efekt w porównaniu z grupą kontrolną, mogący świadczyć o zmniejszeniu aktywności szeregu kinaz STK, takich jak RPS6KA6 (ang. ribosomal protein S6 kinase A6), RPS6KA1 (ang. ribosomal protein S6 kinase A1), MAPK12 (ang. mitogen-activated protein kinase 12), MAPK13 (ang. mitogen-activated protein kinase 13), CHEK1 (ang. checkpoint kinase 1), RAF1 (ang. rapidly accelerated fibrosarcoma-1 serine/threonine protein kinase), MAPK1 (ang. mitogen-activated protein kinase 1), MAPK14 (ang. mitogen-activated protein kinase 14), DCLK2 (ang. doublecortin like kinase 2), czy MAPK3 (ang. mitogen-activated protein kinase 3) (**Rycina 26 C, D**).

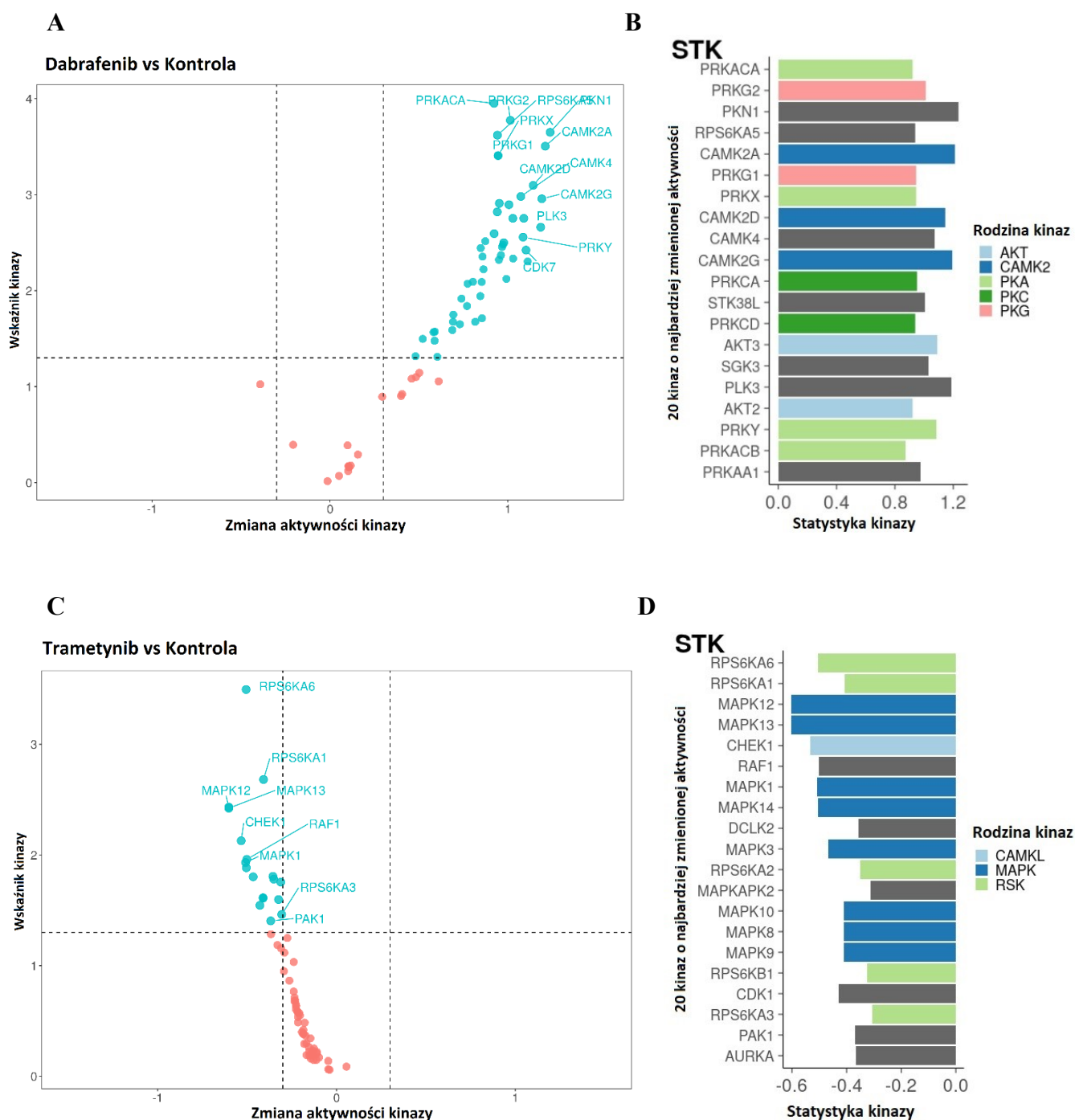
W aortach inkubowanych z kombinacją obu leków (dabrafenib + trametynib) stwierdzono zmiany w dużej części podobne do tych wywołanych przez sam dabrafenib, tzn. istotne zwiększenie aktywności STK (17 miejsc fosforylacji, z których 9 nakładało się z efektem samego dabrafenibu). Kluczowe kinazy wskazane na podstawie tych miejsc fosforylacji były następujące: ROCK2 (ang. Rho-associated protein kinase 2),

SGK3 (ang. Serum/glucocorticoid-regulated kinase 3), PRKG1 (ang. protein kinase cGMP-dependent 1), STK38L (ang. serine/threonine-protein kinase 38-like), CAMK4 (ang. calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV), PRKG2 (ang. protein kinase cGMP-dependent 2), PSKH1 (ang. protein serine kinase H1), PRKX (ang. protein kinase cAMP-dependent X-linked catalytic subunit), PRKACA (ang. protein kinase A catalytic subunit) i PRKCA (ang. protein kinase C Alpha) (**Rycina 27 A, B**).

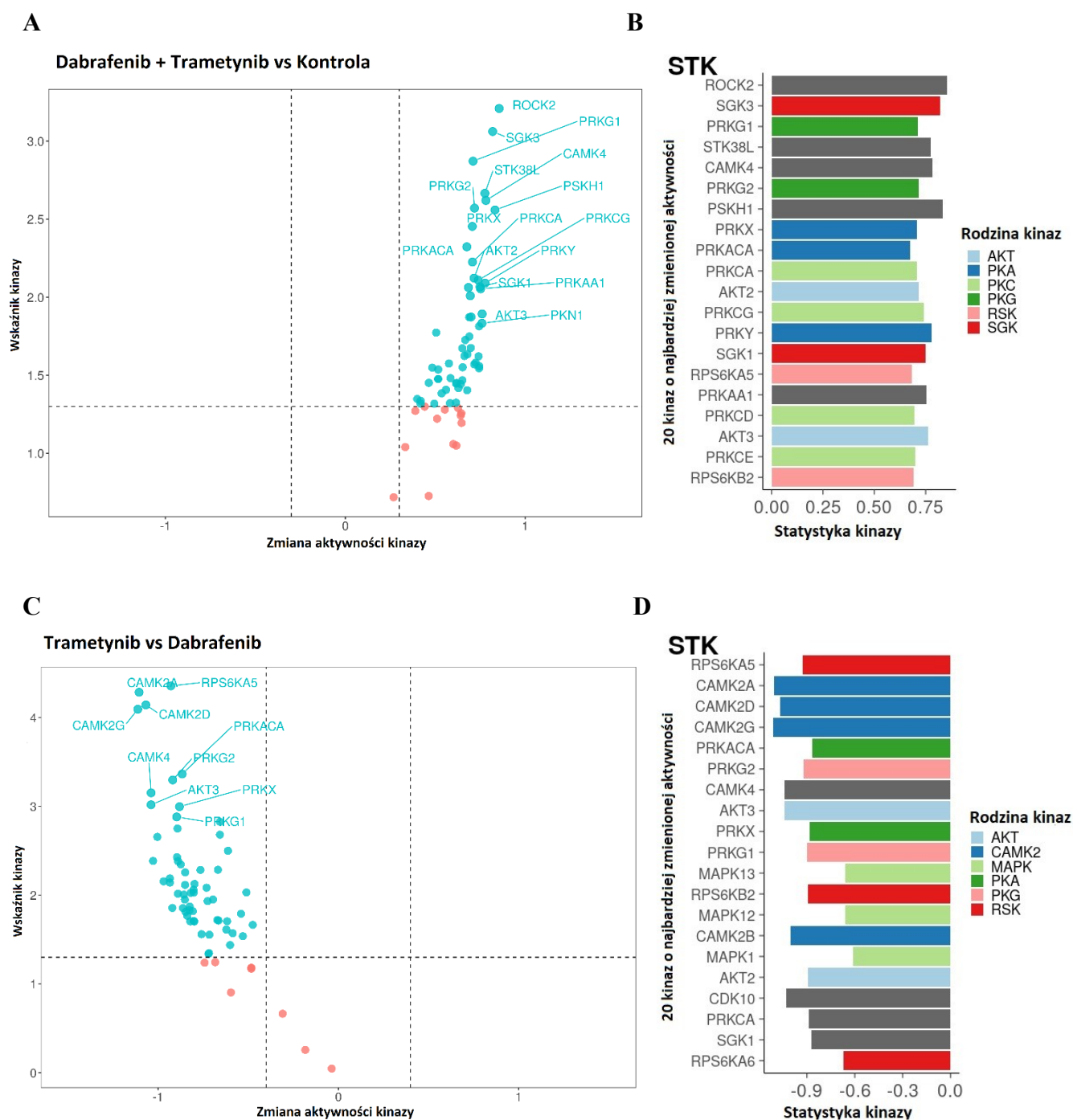
Jako ostatnią analizę, przeprowadzono analizę aort inkubowanych z trametynibem w porównaniu do aort inkubowanych z dabrafenibem, która ujawniła istotne zmniejszenie aktywności STK (31 miejsc fosforylacji) w aortach inkubowanych z trametynibem w porównaniu do aort inkubowanych z dabrafenibem. Kluczowe kinazy wskazane w analizie UKA na podstawie tych miejsc fosforylacji były następujące: RPS6KA5 (ang. ribosomal protein S6 kinase A5), CAMK2A (ang. calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha), CAMK2D (ang. calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta), CAMK2G (ang. calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit gamma), PRKACA (ang. protein kinase A catalytic subunit), PRKG2 (ang. cGMP- dependent protein kinase 2), CAMK4 (ang. calcium/calmodulin -dependent protein kinase type IV), AKT3 (ang. isoform 3 of AKT kinase), PRKX (ang. cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit X) i PRKG1 (ang. cGMP- dependent protein kinase 1) (**Rycina 27 C, D**).

Porównywane grupy	Ilość miejsc fosforylacji	
	Zmiana „w górę”	Zmiana „w dół”
Dabrafenib vs Kontrola*	13	4
Trametynib vs Kontrola*	0	1
Dab.+Tram. vs Kontrola*	17	0
Trametynib vs Dabrafenib [#]	0	31

Tabela 5. Podsumowanie różnic profilu fosforylacji substratów kinaz serynowo-treoninowych pomiędzy poszczególnymi grupami eksperymentalnymi. Symbol * oznacza istotność statystyczną $p < 0,05$ uzyskaną po zastosowaniu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem *post hoc* Dunnett’a, symbol # oznacza istotność statystyczną $p < 0,05$ uzyskaną po zastosowaniu dwustronnego testu T-Studenta.



Rycina 26. Profil aktywności kinaz STK na podstawie analizy UKA w aortach myszy C57BL/6J *ex vivo* inkubowanych z dabrafenibem w porównaniu do kontrolnych (A, B) oraz w aortach inkubowanych z trametynilbem w porównaniu do kontrolnych (C, D). Wykresy na podstawie wskaźnika kinaz (B, D), służące do identyfikacji wielkości efektu i kierunku 20 kinaz o najbardziej zmienionej aktywności w stosunku do kontroli. Kolory na wykresach (B, D) zostały przypisane do poszczególnych rodzin kinaz STK. Ponadto, rodzina kinaz reprezentowana tylko przez 1 kinazę na wykresach (B, D) jest oznaczona kolorem szarym.



Rycina 27. Profil aktywności kinaz STK na podstawie analizy UKA w aortach myszy C57BL/6J inkubowanych *ex vivo* łącznie z dabrafenibem i trametylibem w porównaniu do kontrolnych (A, B) oraz w aortach inkubowanych z trametylibem w porównaniu do aort inkubowanych z dabrafenibem (C, D). Wykresy na podstawie wskaźnika kinaz (B, D), służące do identyfikacji wielkości i kierunku zmiany efektu 20 kinaz o najbardziej zmienionej aktywności w stosunku do kontroli. Kolory na wykresach (B,D) zostały przypisane do poszczególnych rodzin kinaz STK. Ponadto, rodzina kinaz reprezentowana tylko przez 1 kinazę na wykresach (B, D) jest oznaczona kolorem szarym.

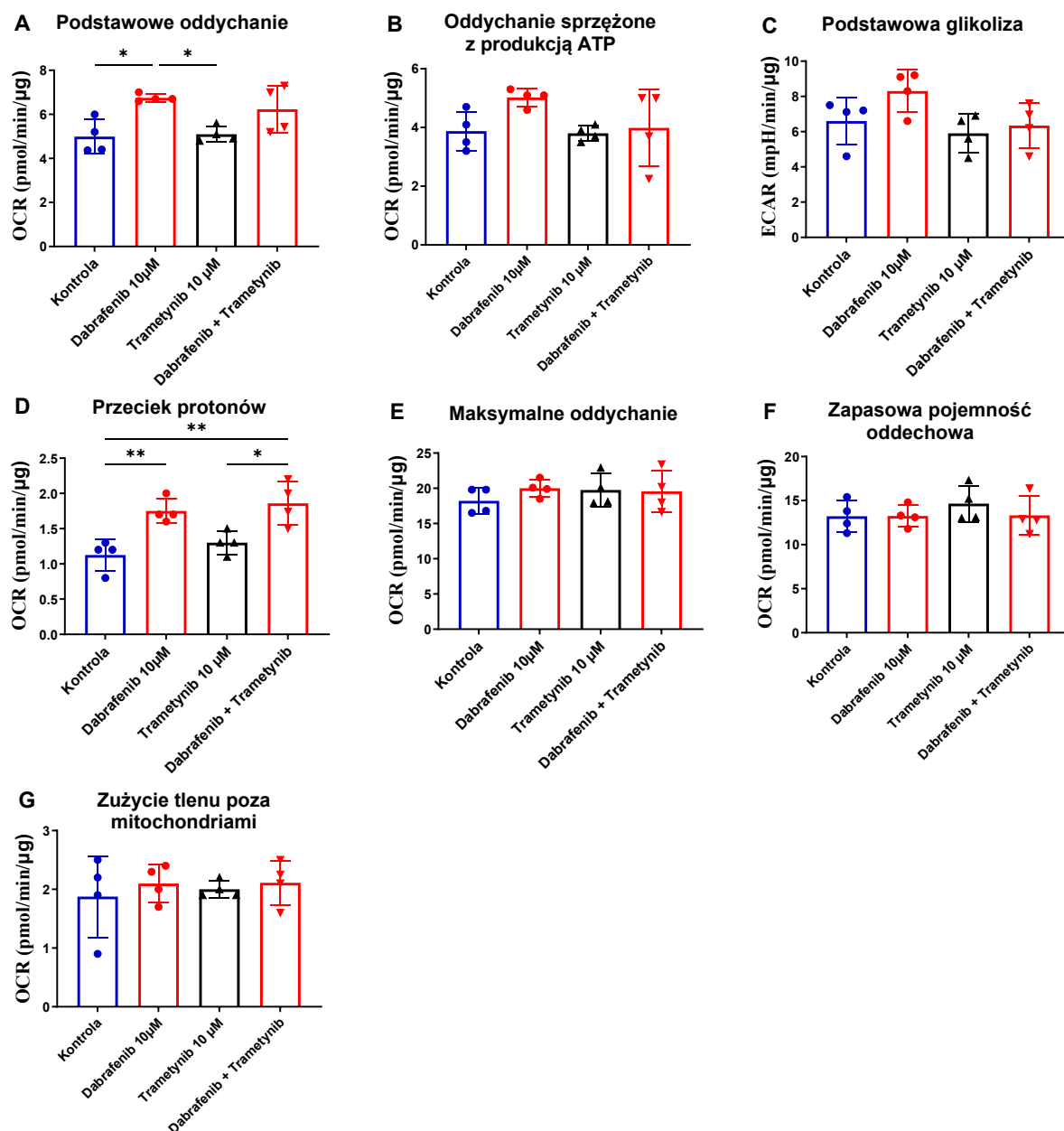
Kinaza	Rodzina kinaz	Wskaźnik kinazy
PRKACA	PKA	3.95078197732982
PRKG2	PKG	3.77469071827414
PKN1	PKN	3.64975198166584
RPS6KA5	RSK	3.61978875828839
CAMK2A	CAMK2	3.50456429759926
PRKG1	PKG	3.40671393297954
PRKX	PKA	3.40671393297954
CAMK2D	CAMK2	3.09691001300806
CAMK4	CAMK1	2.98129950133376
CAMK2G	CAMK2	2.95687704878702
PRKCA	PKC	2.90938929217159
STK38L	NDR	2.8955128886876
PRKCD	PKC	2.82044820883481
AKT3	AKT	2.7535014192042
SGK3	SGK	2.7535014192042
PLK3	PLK	2.6607473659673
AKT2	AKT	2.59380057633669
PRKY	PKA	2.55720677406023
PRKACB	PKA	2.51541547071716
PRKAA1	CAMKL	2.49976352517436
SGK1	SGK	2.47990967188716
PRKCG	PKC	2.45593195564972
RPS6KB2	RSK	2.44369749923271
CDK7	CDK	2.42250820016278
PRKCH	PKC	2.36977558924757
PRKCB	PKC	2.35418488170336
PSKH1	PSK	2.33407799038577
ROCK2	DMPK	2.32125822205994
CDK10	CDK	2.30453244644831
PRKCE	PKC	2.22184874961636
CAMK2B	CAMK2	2.12262865413023
PIM2	PIM	2.09172950050428
AKT1	AKT	2.09001630506016
PRKCQ	PKC	2.07160414774329
SGK2	SGK	1.94355254152508
CHEK2	RAD53	1.91649738016973
RPS6KA3	RSK	1.83995186044712
RPS6KA2	RSK	1.74997055030907
IKBKE	IKK	1.71264622728525
PRKAB1	NA	1.67514161180113
AURKA	AUR	1.67473069826693
PRKD1	PKD	1.64990711454189

PIM1	PIM	1.58905414131223
CSNK1A1	CK1	1.57264374424108
PRKCI	PKC	1.56747965864107
MTOR	PIKK	1.49708150397005
RPS6KB1	RSK	1.47781668238131
DCLK2	DCAMKL	1.31626872138111
MAPKAPK3	MAPKAPK	1.3103005403594

Tabela 6. Lista kinaz STK o zwiększonej aktywności w aortach myszy C57BL/6J inkubowanych *ex vivo* przez 24 godziny z dabrafenibem w porównaniu do aort kontrolnych. Wszystkie kinazy wskazane w UKA powyżej domyślnego progu (wskaźniku kinazy > 1,3), wraz z przynależnością do rodziny filogenetycznej kinaz.

4.2.16 Wpływu dabrafenibu, trametynibu oraz ich kombinacji na metabolizm mitochondrialny w aortach myszy C57BL/6

W krążkach aorty myszy C57BL/6J inkubowanych z dabrafenibem stwierdzono istotnie zwiększony poziom podstawowej konsumpcji tlenu (OCR) w porównaniu do krążków aorty z grup kontrolnych oraz inkubowanych z trametynibem (**Rycina 29 A**). W krążkach inkubowanych z dabrafenibem zaobserwowano także nieznacznie podwyższony poziom konsumpcji tlenu sprzężonej z produkcją ATP (**Rycina 29 B**) oraz glikolizy (**Rycina 29 C**). Ponadto dabrafenib sam, jak i w kombinacji z trametynibem, spowodował istotny wzrost przecieku protonów w krążkach aorty (**Rycina 29 D**). Nie wykazano wpływu badanych leków na pozostałe parametry funkcji mitochondriów takie jak: maksymalne oddychanie, zapasową pojemność oddechową, zużycie tlenu poza mitochondriami (**Rycina 29 E, F, G**).



Rycina 29. Profil zmian metabolizmu energetycznego w krążkach aorty myszy C57BL/6J inkubowanych *ex vivo* przez 24 godziny z dabrafenibem, trametylibem oraz kombinacją obu leków. Pomiary wykonano za pomocą analizatora Seahorse XFe96. Szybkość zużycia tlenu (ang. oxygen consumption rate, OCR) dzwierciadla oddychanie mitochondrialne, szybkość zewnątrzkomórkowego zakwaszania (ang. extra-cellular acidification rate, ECAR) odzwierciadla glikolizę. Na podstawie zmian OCR określono następujące parametry funkcji mitochondriów: podstawowe oddychanie (A), konsumpcję tlenu sprzężoną z produkcją ATP (B), przeciek protonów (D), maksymalne oddychanie (E), zapasowa pojemność oddechowa (F) i zużycie tlenu poza mitochondriami (G). Na podstawie ECAR określono podstawową glikolizę (C). Pomiary OCR i ECAR znormalizowano do ilości białka oznaczonego w krążkach aorty po zakończeniu doświadczenia. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem *post hoc* Tukey'a. Dane przedstawiają średnie $\pm$ SEM, $n=4$, symbol * oznacza $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Każdy punkt danych reprezentuje średnią z 3 niezależnych pomiarów (analizy Seahorse wykonane we współpracy z Dr P. Kaczarą i Mgr A.Karaś z JCET, Kraków).

4.2.17 Działanie dabrafenibu i trametynibu na czynność śródbłónka *ex vivo* w aorcie myszy C57BL/6J – podsumowanie

Otrzymane wyniki doświadczeń w izolowanej mysiej aorcie, potwierdziły obserwacje z badań *in vivo*, że to inhibitor BRAF dabrafenib powodował dysfunkcję śródbłónka naczyniowego, widoczną w tym modelu po 24 godzinach inkubacji aorty w obecności leku, podczas gdy inhibitor MEK, trametynib, nie wywoływał takiego efektu. Jednocześnie to właśnie dabrafenib wywoływał upośledzenie produkcji NO, wpływał na komórkowy metabolizm energetyczny i aktywację licznych kinaz serynowo-treoninowych, co pozwala wnioskować, że to głównie dabrafenib, a nie trametynib odpowiada za obserwowaną u pacjentów toksyczność naczyniową w następstwie leczenia kombinacją tych leków. Równocześnie, niespójne z tymi wynikami wydawały się wyniki wskazujące, że zarówno dabrafenib jak i trametynib w podobnym stopniu zmniejszają ekspresję eNOS i fosforylację p(Ser1177)eNOS, a dabrafenib dodatkowo zmniejsza hamującą aktywność tego enzymu fosforylację p(Thr495)eNOS. Analiza z wykorzystaniem metody Western Blot wykazała zmniejszenie fosforylacji AKT pod wpływem dabrafenibu i trametynibu, podczas gdy w profilu aktywności STK wykazano aktywację tej kinazy przez dabrafenib. Ponadto oba leki, dabrafenib jak i trametynib w podobnym, stopniu i znacząco hamowały produkcję prostacykliny w mysiej aorcie.

W dalszych badaniach podjęto próby farmakologicznego przeciwdziałania dysfunkcji śródbłónka wywołanej przez dabrafenib. Spośród kinaz, których zwiększoną aktywność wykazano w aortach inkubowanych z dabrafenibem w porównaniu do kontroli, wytypowano kinazy ROCK i CAMK2 jako potencjalnie związane z obserwowaną indukcją dysfunkcji śródbłónka. Ponadto prawdopodobnym mechanizmem upośledzenia czynności śródbłónka, mogła być także zwiększona produkcja reaktywnych form tlenu (choć nie zmierzona bezpośrednio, ze względu na ograniczenia metodyczne bezpośrednich pomiarów ROS z wykorzystaniem metodologii EPR).

W celu zweryfikowania hipotez, że nadmierna aktywacja ROCK i CAMK2 oraz produkcja ROS mogą odpowiadać za wywołane przez dabrafenib upośledzenie czynności śródbłónka naczyniowego, przeprowadzono kolejne doświadczenia, w których oceniano czynność śródbłónka oraz produkcję NO w izolowanych mysich aortach inkubowanych przez 24 godziny z dabrafenibem, w obecności wybranych inhibitorów kinaz ROCK i CAMK2

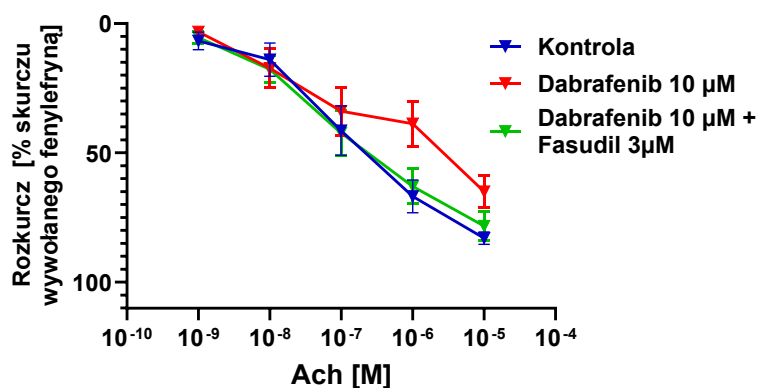
oraz inhibitorów wybranych enzymów produkujących wolne rodniki tlenowe lub zmiataczy ROS.

4.2.18 Wpływ inhibitora ROCK – fasudilu na upośledzenie czynności śródbłónka w aorcie myszy C57BL/6J *ex vivo* wywołane przez dabrafenib

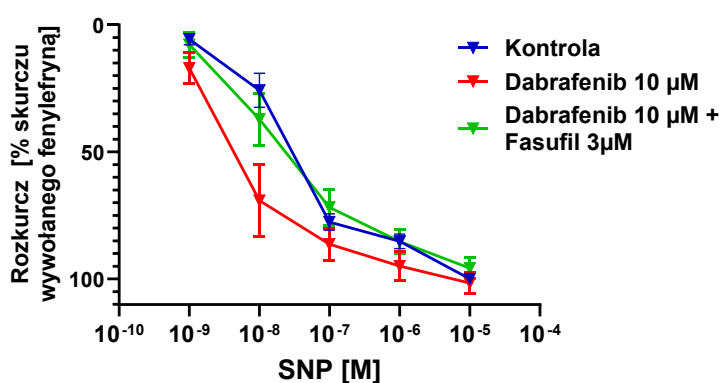
W celu sprawdzenia, czy dysfunkcję śródbłónka wywołaną przez dabrafenib można odwrócić poprzez zahamowanie kinazy ROCK, inkubowano aorty jednocześnie z dabrafenibem (10 μ M) i fasudilem (3 i 10 μ M) – inhibitorem ROCK przez 24 godziny. Następnie w aortach tych oceniono czynność naczyniorozkurczową śródbłónka naczyniowego pod wpływem Ach oraz bezpośrednią produkcję NO. Fasudil w stężeniu 3 μ M przeciwdziałał upośledzeniu przez dabrafenib odpowiedzi rozkurczowej krążków aorty na Ach. Rozkurcz krążków inkubowanych z dabrafenibem i fasudilem był zbliżony do odpowiedzi kontrolnych krążków aorty (**Rycina 30 A**). W tej serii doświadczeń nie stwierdzono jednak statystycznie istotnych różnic pomiędzy odpowiedziami krążków kontrolnych, a rozkurczem zarówno krążków inkubowanych z samym dabrafenibem jak i z dabrafenibem i fasudilem (**Rycina 30 A**). Nie stwierdzono także istotnych statystycznie różnic w odpowiedziach rozkurczowych krążków aorty na SNP (**Rycina 30 B**). Co ciekawe stwierdzono, że dabrafenib wywołał zwiększenie skurczu krążków aorty w odpowiedzi na KCl, a fasudil w stężeniu 3 μ M odwracał ten efekt, przywracając wielkość skurczu do poziomu krążków kontrolnych (**Rycina 31 A**). Fasudil w stężeniu 10 μ M hamował skurcz krążków aorty uniemożliwiając badanie czynności śródbłónka z wykorzystaniem miografu.

Natomiast pomiar produkcji NO w aortach myszy metodą pułapkowania spinowego EPR wykazał, że fasudil (zarówno w stężeniu 3 i 10 μ M) przeciwdziałał zmniejszeniu produkcji NO wywołanemu przez dabrafenib. W aortach inkubowanych w obecności dabrafenibu i fasudilu, wykazano mniejszy spadek sygnału NO-DETC w porównaniu do aort kontrolnych, niż w aortach inkubowanych z samym dabrafenibem, różnica ta nie była jednak istotna statystycznie (**Rycina 32 A, B**).

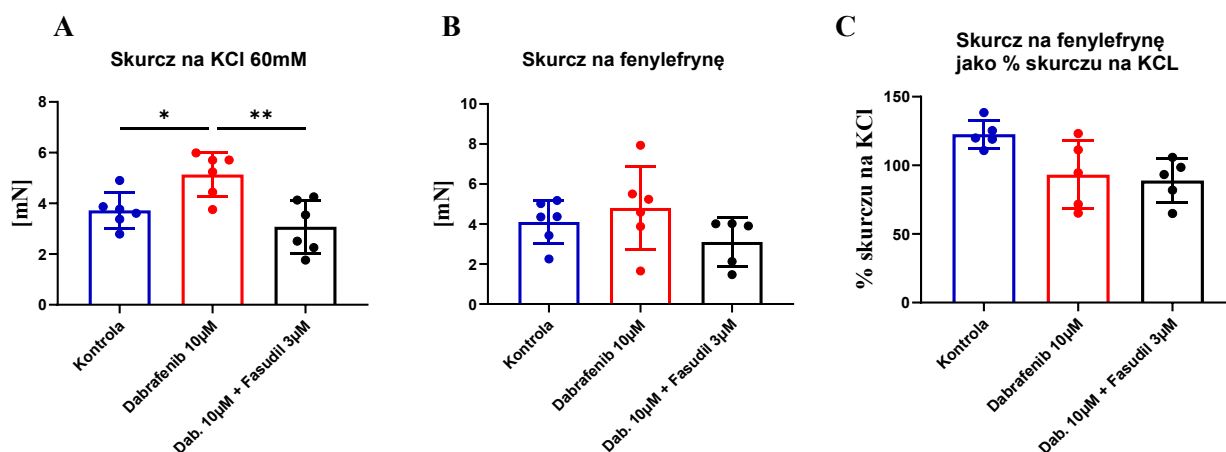
A



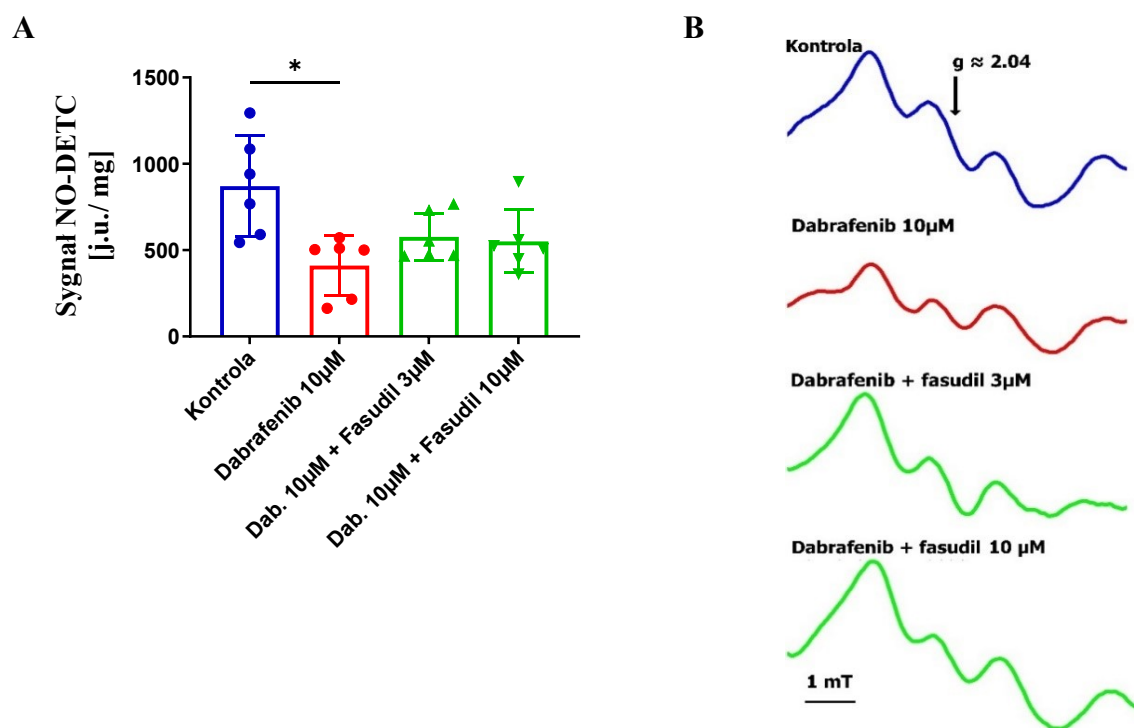
B



Rycina 30. Czynność śródbłonna naczyniowego w aorcie myszy C57BL/6J inkubowanej *ex vivo* z dabrafenibem i inhibitorem kinazy ROCK – fasudilem przez 24 godziny. Ocenę czynności śródbłonna naczyniowego aorty przeprowadzono z wykorzystaniem klasycznego miografu 620M. Wpływ dabrafenibu (10μM) oraz kombinacji dabrafenibu (10μM) i fasudilu (3μM) na zależny od śródbłonna rozkurcz krążków aorty w odpowiedzi na Ach (A). Wpływ w/w związków na niezależną od śródbłonna odpowiedź rozkurczową naczyń na SNP (B). Analizę statystyczną przeprowadzono, w zależności od rozkładu danych, przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA lub testu Kruskala Wallisa, z odpowiednimi testami *post hoc*. Dane przedstawiają średnie ± SEM, n=6.



Rycina 31. Odpowiedzi skurczowe izolowanej aorty myszy C57BL/6J inkubowanej *ex vivo* z dabrafenibem i inhibitorem kinazy ROCK – fasudilem przez 24 godziny. Wpływ dabrafenibu oraz kombinacji dabrafenibu i fasudilu na skurcz oceniono przy użyciu miografu 620M. Odpowiedzi skurczowe naczyń na KCl 60mM (A). Skurcz maksymalny naczyń w odpowiedzi na fenylefrynę 3μM (B). Skurcz krążków aorty w odpowiedzi na fenylefrynę (3μM) wyrażony jako % skurczu maksymalnego na KCl (60 mM) (C). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem *post hoc* Tukey’a. Symbol * oznacza $p < 0,05$; ** oznacza $p < 0,01$. Wyniki wyrażono jako średnia $\pm$ SEM, $n = 6$ (po 2 krążki aorty od jednej myszy).



Rycina 32. Wpływ inhibitora kinazy ROCK - fasudilu na produkcję NO przez śródbłonek naczyniowy izolowanej aorty myszy C57BL/6J inkubowanej *ex vivo* z dabrafenibem przez 24 godziny. Do pomiaru NO zastosowano technikę EPR. Wpływ dabrafenibu (10μM) oraz kombinacji dabrafenibu (10μM) i fasudilu (3μM) na sygnał NO-DETC (A) Uśrednione widma EPR dla poszczególnych grup (B). Istotność statystyczną oceniono za pomocą testu nieparametrycznego Kruskala–Wallisa z testem *post hoc* Dunn’a. Dane przedstawiają średnie $\pm$ SEM, $n=6$, symbol * oznacza $p < 0,05$ (Pomiary EPR wykonane we współpracy z Dr J. Pyką z JCET).

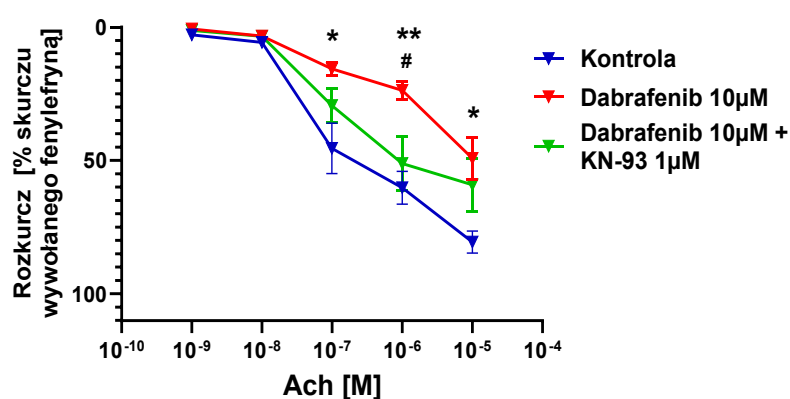
4.2.19 Wpływ inhibitora CAMK2 – KN-93 na upośledzenie czynności śródbłonka w aorcie myszy C57BL/6J ex vivo wywołane przez dabrafenib

W celu sprawdzenia, czy dysfunkcji śródbłonka naczyniowego aorty myszy C57BL/6J wywołanej przez dabrafenib można przeciwdziałać poprzez zahamowanie kinazy CAMK2, inkubowano aorty mysie przez 24 godziny, w obecności dabrafenibu (10 μ M) oraz KN-93 (1 μ M) będącego inhibitorem CAMK2, blokującym wiązanie wapnia/kalmoduliny (Ca^{2+} /CaM) do domeny regulacyjnej kinazy (62).

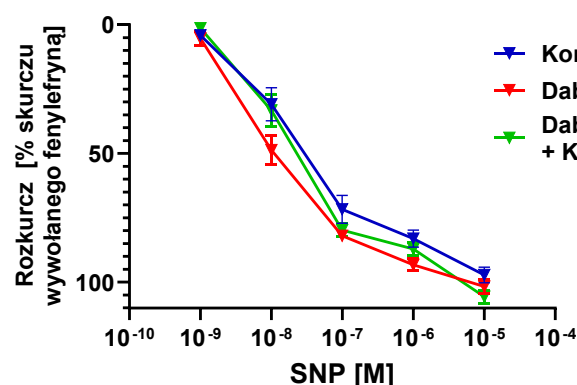
W badaniu czynności śródbłonka stwierdzono istotne statystycznie pogorszenie czynności śródbłonka aort inkubowanych z dabrafenibem. Natomiast obecność inhibitora kinazy CAMK2 – KN-93 spowodowała poprawę odpowiedzi rozkurczowej krążków aorty w odpowiedzi na Ach w porównaniu do krążków inkubowanych z samym dabrafenibem, która była statystycznie istotnie silniejsza dla stężenia Ach 1 μ M (**Rycina 33 A**). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w odpowiedziach rozkurczowych krążków aorty we wszystkich badanych grupach w odpowiedzi na SNP (**Rycina 33 B**).

Natomiast badanie produkcji NO w aortach myszy C57BL/6J nie wykazało skuteczności KN-93 w odwracaniu upośledzenia produkcji NO wywołanej przez dabrafenib (**Rycina 34**). W aortach inkubowanych z dabrafenibem (10 μ M) w obecności KN-93 (1 μ M), wykazano istotny spadek sygnału NO-DETC, w porównaniu do kontroli, podobny do aort inkubowanych z samym dabrafenibem (**Rycina 34 A, B**).

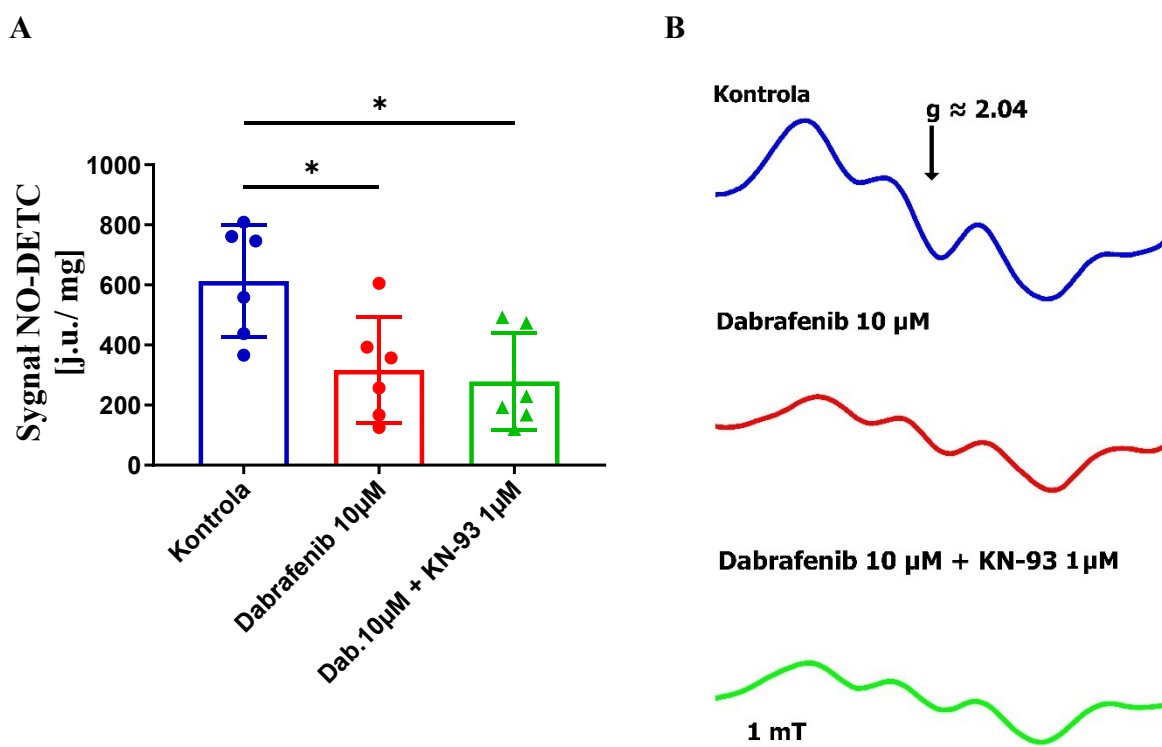
A



B



Rycina 33. Wpływ inhibitora kinazy CAMK2 – KN-93 na czynność śródbłónka naczyniowego izolowanej aorty myszy C57BL/6J po 24 godzinach inkubacji *ex vivo* z dabrafenibem. Ocenę czynności śródbłónka naczyniowego aorty przeprowadzono z wykorzystaniem klasycznego miografu 620M. Wpływ dabrafenibu (10µM) oraz kombinacji dabrafenibu (10µM) i KN-93 (1 µM) na zależny od śródbłónka rozkurcz krążków aorty w odpowiedzi na Ach (A). Wpływ w/w związków na niezależną od śródbłónka odpowiedź rozkurczową naczyń na SNP (B). Analizę statystyczną przeprowadzono, w zależności od rozkładu danych, przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA lub testu Kruskala Wallisa, z odpowiednimi testami *post hoc*. Wyniki przedstawiono jako średnia ± SEM, n = 6 (po 2 krążki od jednej myszy na grupę), symbol * oznacza $p < 0,05$; ** oznacza $p < 0,01$ w porównaniu do kontroli, # oznacza $p < 0,05$ w porównaniu do grupy dabrafenib + KN-93.



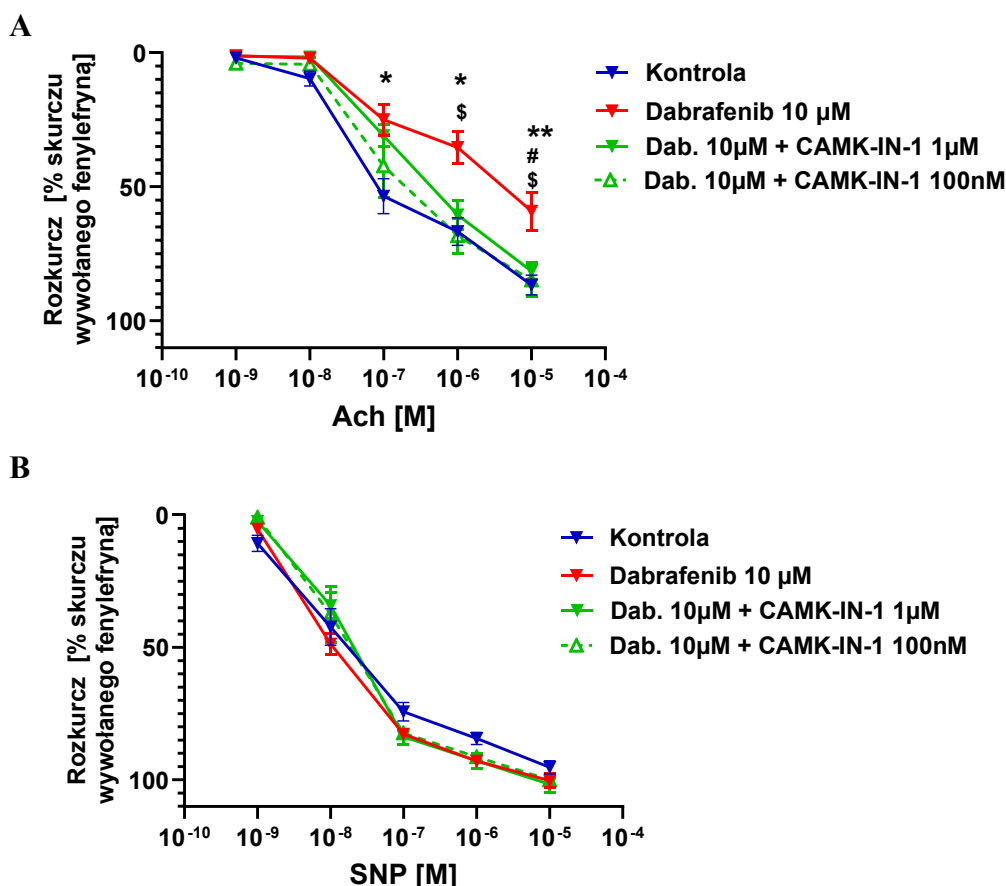
Rycina 34. Wpływ inhibitora CAMK2 – KN-93 na produkcję NO w izolowanej aorcie myszy C57BL/6J po 24 godzinach inkubacji *ex vivo* z dabrafenibem. Do pomiaru NO zastosowano technikę EPR. Wpływ dabrafenibu (10 μM) oraz kombinacji dabrafenibu (10 μM) i KN-93 (1 μM) na sygnał NO- DETC (A). Uśrednione widma EPR dla poszczególnych grup (B). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem *post hoc* Tukey’a. Wyniki przedstawiono jako średnia ± SEM, n=6, symbol * oznacza $p < 0,05$ w porównaniu do grupy kontrolnej (Pomiary EPR wykonane we współpracy z Dr J. Pyką z JCET).

4.2.20 Wpływ inhibitora CAMK2 – CAMK-IN-1 na upośledzenie czynności śródbłonka w aorcie myszy C57BL/6J *ex vivo* wywołane przez dabrafenib

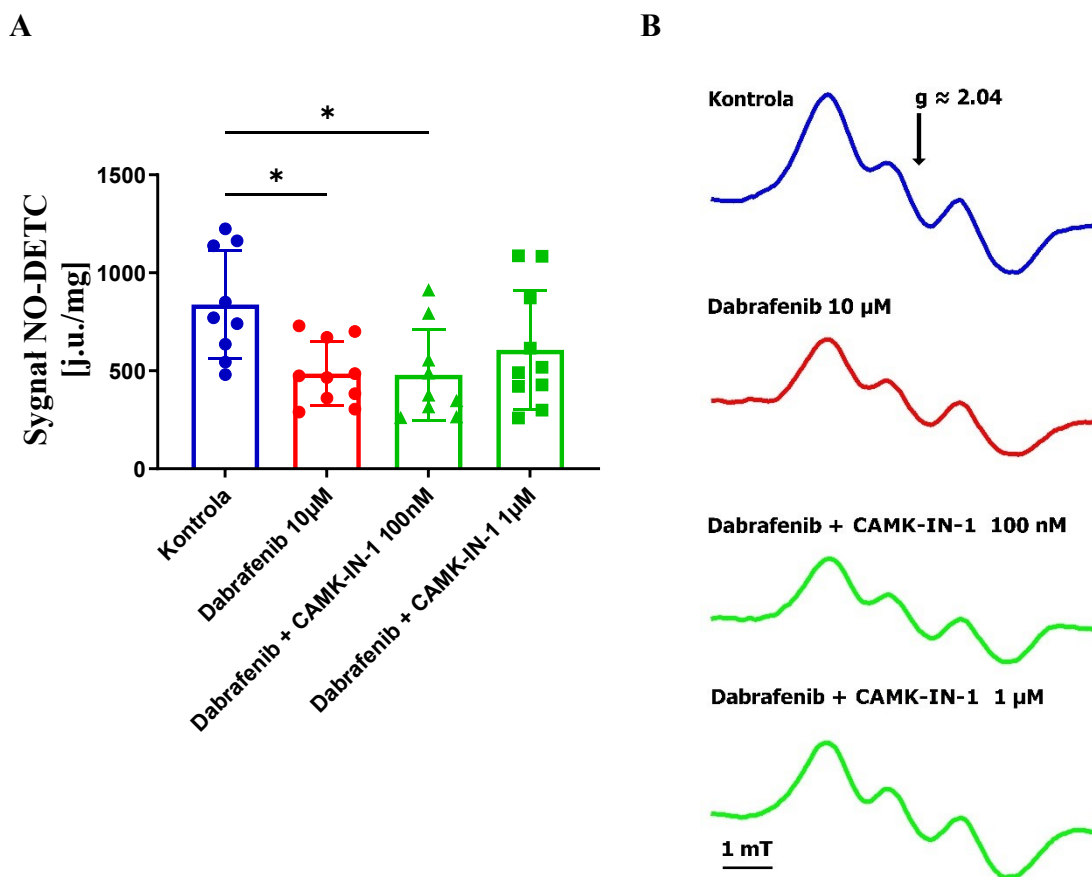
W związku z jedynie częściową poprawą czynności śródbłonka naczyniowego po zastosowaniu inhibitora kinazy CAMK2 – KN-93 (**Ryciny 33 i 34**), wypróbowano działanie innego inhibitora kinazy CAMK2, o odmiennym mechanizmie działania. Inhibitorem tym był związek CAMK-IN-1, który hamuje działanie kinazy CAMK2 przez zablokowanie miejsca wiązania ATP w jej obszarze. W aortach inkubowanych jednocześnie w obecności dabrafenibu (10 μM) oraz inhibitora CAMK-IN-1 (w stężeniu 100 nM oraz 1 μM) zaobserwowano istotnie większą odpowiedź rozkurczową na Ach w porównaniu do odpowiedzi krążków aorty inkubowanych z samym dabrafenibem (**Rycina 35 A**). Odpowiedzi rozkurczowe krążków aorty inkubowanych z dabrafenibem w obecności CAMK-IN-1 były zbliżone do odpowiedzi

krążków kontrolnych. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w odpowiedziach rozkurczowych na SNP (**Rycina 35 B**).

Natomiast badanie produkcji NO w aortach, metodą pułapkowania spinowego EPR, nie wykazało znamiennej statystycznie działania inhibitora CAMK-IN-1 (1 μ M), na upośledzenie wytwarzania NO wywołane przez dabrafenib (**Rycina 36 A, B**).



Rycina 35. Wpływ inhibitora kinazy CAMK2 – CAMK-IN-1 na czynność śródbłónka naczyniowego izolowanej aorty myszy C57BL/6J po inkubacji *ex vivo* z dabrafenibem przez 24 godziny. Ocenę czynności śródbłónka naczyniowego aorty przeprowadzono z wykorzystaniem klasycznego miografu 620M. Wpływ dabrafenibu (10 μ M) oraz kombinacji dabrafenibu (10 μ M) i CAMK-IN-1 (100 nM lub 1 μ M) na zależny od śródbłónka rozkurcz krążków aorty w odpowiedzi na Ach (A). Wpływ w/w związków na niezależną od śródbłónka odpowiedź rozkurczową naczyń na SNP (B). Analizę statystyczną przeprowadzono, w zależności od rozkładu danych, przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA lub testu Kruskala Wallisa, z odpowiednimi testami *post hoc*. Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SEM, n = 5-11 (po 2 krążki od jednej myszy), symbol: * oznacza $p < 0,05$; a symbol ** $p < 0,01$ w porównaniu do grupy kontrolnej, symbol # oznacza $p < 0,05$ w porównaniu do grupy dabrafenib + CAMK-IN-1 1 μ M, symbol \$ oznacza $p < 0,05$ w porównaniu do grupy dabrafenib + CAMK-IN-1 100 nM.



Rycina 36. Wpływ CAMK-IN-1 na produkcję NO w izolowanej aorcie myszy C57BL/6J po 24 godzinach inkubacji *ex vivo* z dabrafenibem Do pomiaru NO zastosowano technikę EPR. Wpływ dabrafenibu (10µM) oraz kombinacji dabrafenibu (10µM) i CAMK-IN-1 (100nM lub 1µM) na sygnał NO-DETC (A). Uśrednione widma EPR dla poszczególnych grup (B). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem *post hoc* Tukey’a. Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SEM, $n = 9-10$, * oznacza $p < 0,05$ (Pomiary EPR wykonane we współpracy z Dr J. Pyką z JCET).

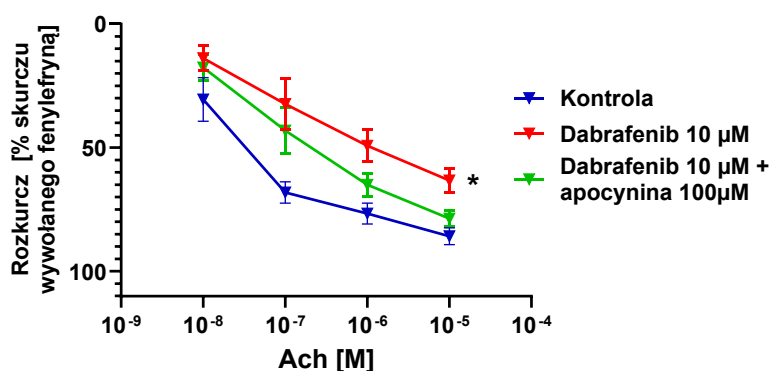
4.2.21 Wpływ inhibitora NOX-2 – apocyniny na upośledzenie czynności śródbłónka w aorcie myszy C57BL/6J *ex vivo* wywołane przez dabrafenib

W celu sprawdzenia czy zahamowanie NOX-2 może wpłynąć na odwrócenie dysfunkcji śródbłónka naczyniowego wywołanej przez dabrafenib, inkubowano krążki aorty jednocześnie z dabrafenibem (10 µM) i inhibitorem NOX-2 – apocyniną (100 µM). W badaniu czynności śródbłónka stwierdzono istotne statystycznie pogorszenie czynności śródbłónka aort inkubowanych z samym dabrafenibem w porównaniu do krążków kontrolnych. Zaobserwowano wyraźną poprawę odpowiedzi rozkurczowej na Ach krążków aorty inkubowanych z dabrafenibem w obecności apocyniny w porównaniu do odpowiedzi krążków

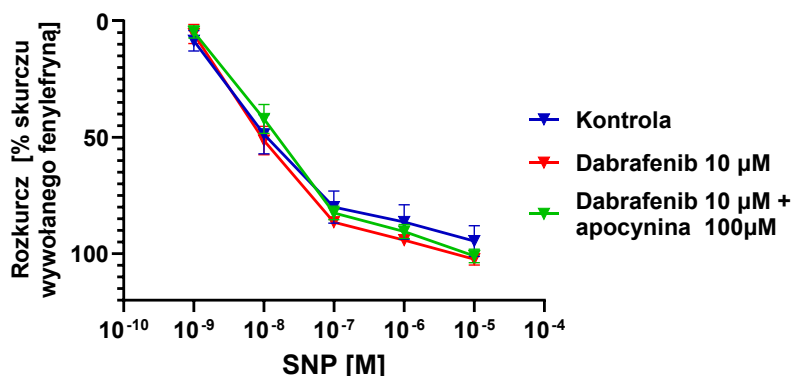
aorty inkubowanych z samym dabrafenibem, jednak nie stwierdzono istotności statystycznej różnic pomiędzy tymi grupami (**Rycina 37 A**). Nie stwierdzono także istotnych statystycznie różnic w odpowiedziach rozkurczowych krążków na SNP (**Rycina 37 B**).

Badanie produkcji NO w aortach mysich wykazało, że apocynina przeciwdziałała upośledzeniu produkcji NO wywołanemu przez dabrafenib. W naczyniach inkubowanych z dabrafenibem (10 μ M) w obecności apocyniny (100 μ M) sygnał NO-DETC był zbliżony do poziomu sygnału w aortach kontrolnych (**Rycina 38 A, B**).

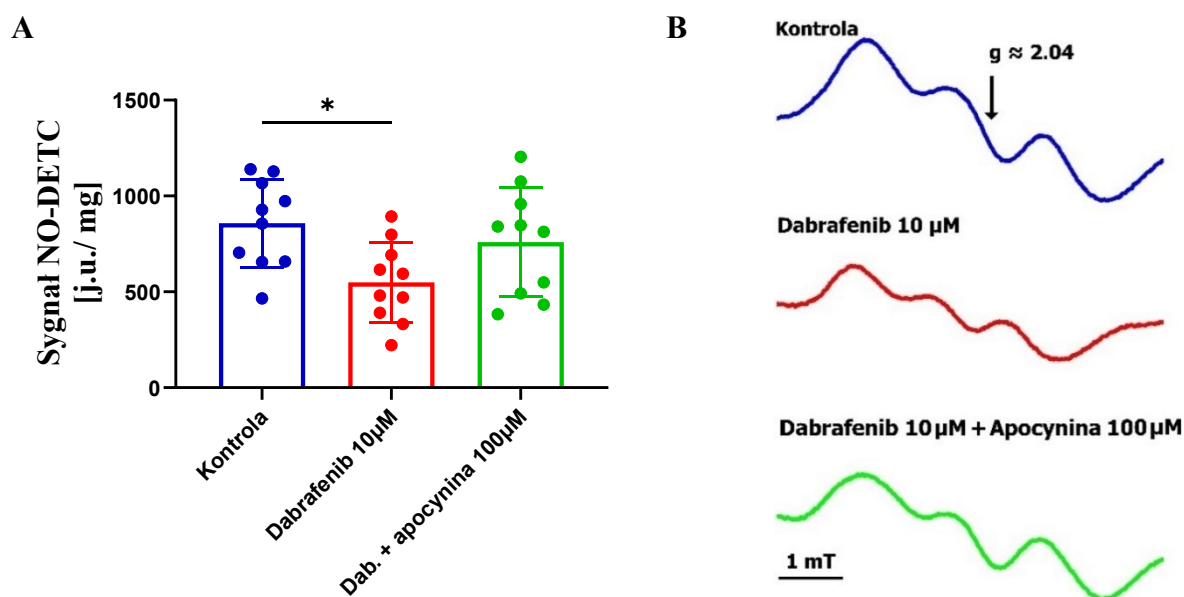
A



B



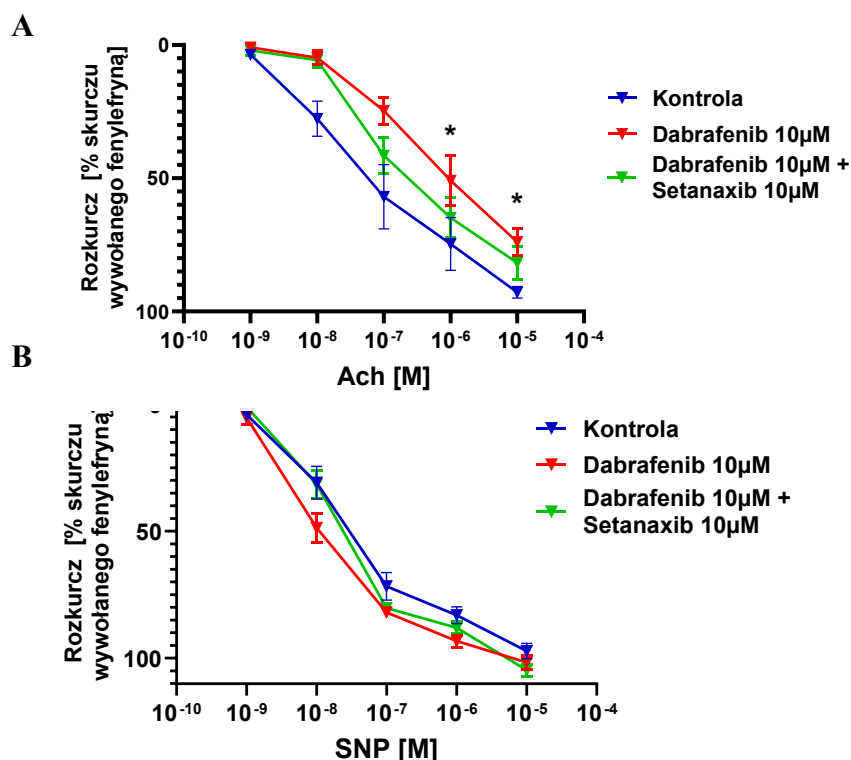
Rycina 37. Wpływ apocyniny na funkcję śródbłónka naczyniowego aorty myszy C57BL/6J po inkubacji z dabrafenibem *ex vivo* przez 24 godziny. Ocenę czynności śródbłónka naczyniowego aorty przeprowadzono z wykorzystaniem klasycznego miografu 620M. Wpływ dabrafenibu (10 μ M) oraz kombinacji dabrafenibu (10 μ M) i apocyniny (100 μ M) na zależny od śródbłónka rozkurcz krążków aorty w odpowiedzi na Ach (A). Wpływ w/w związków na niezależną od śródbłónka odpowiedź rozkurczową naczyń na SNP (B). Analizę statystyczną przeprowadzono, w zależności od rozkładu danych, przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA lub testu Kruskala Wallisa, z odpowiednimi testami *post hoc*. Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SEM, n = 6 (po 2 krążki od jednej myszy), symbol * oznacza $p < 0,05$ w porównaniu do grupy kontrolnej.



Rycina 38. Wpływ apocyniny na produkcję NO w izolowanej aorcie myszy C57BL/6J po 24 godzinach inkubacji *ex vivo* z dabrafenibem. Do pomiaru NO zastosowano technikę EPR. Wpływ dabrafenibu (10μM) oraz kombinacji dabrafenibu (10μM) i apocyniny (100μM) na sygnał NO-DETC (A). Uśrednione widma EPR dla poszczególnych grup (B). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem *post hoc* Tukey'a. Wyniki przedstawiono jako średnia ± SEM, n = 10 (A, B) i n = 6 (C), symbol * oznacza p < 0,05 w porównaniu z grupą kontrolną (Pomiary EPR wykonane we współpracy z Dr J. Pyką z JCET).

4.2.22 Wpływ inhibitora NOX-1/NOX-4 – setanaxibu na upośledzenie czynności śródbłonna w aorcie myszy C57BL/6J *ex vivo* wywołane przez dabrafenib

W celu sprawdzenia potencjalnego udziału izoform NOX-1 i NOX-4 oksydazy NADPH w wywołaniu dysfunkcji śródbłonna naczyniowego przez dabrafenib sprawdzono także wpływ setanaxibu, będącego podwójnym inhibitorem NOX-1 i NOX-4, znanego z działania obniżającego produkcję ROS. Stwierdzono poprawę odpowiedzi rozkurczowej na Ach krążków aorty mysiej inkubowanych z dabrafenibem w obecności setanaxibu w porównaniu do odpowiedzi krążków inkubowanych z samym dabrafenibem. Jednakże, pomimo wyraźnej tendencji w kierunku poprawy czynności rozkurczowej badanych naczyń w obecności setanaxibu, nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy tymi grupami (**Rycina 39 A**). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w odpowiedziach rozkurczowych na SNP (**Rycina 39 B**).



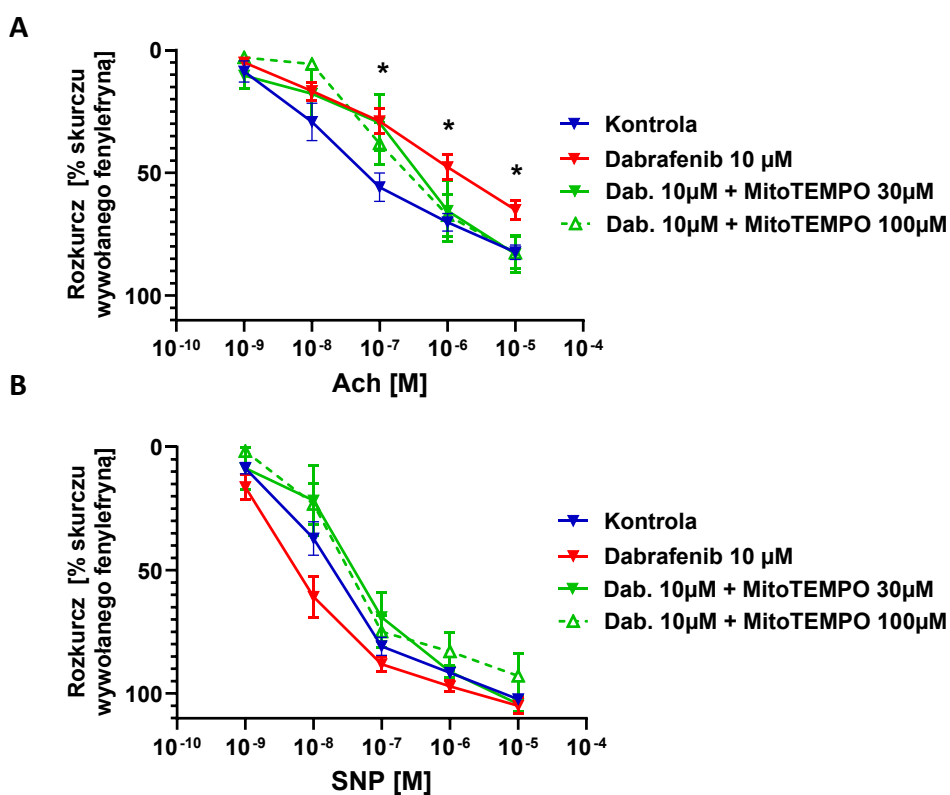
Rycina 39. Wpływ setanaxibu na czynność śródbłonna naczyniowego izolowanej aorty myszy C57BL/6J po 24 godzinach inkubacji *ex vivo* z dabrafenibem. Ocenę czynności śródbłonna naczyniowego aorty przeprowadzono z wykorzystaniem klasycznego miografu 620M. Wpływ dabrafenibu (10μM) oraz kombinacji dabrafenibu (10μM) i inhibitora NOX-1 i NOX-4 setanaxibu (10 μM) na zależny od śródbłonna rozkurcz krążków aorty w odpowiedzi na Ach (A). Wpływ w/w związków na niezależną od śródbłonna odpowiedź rozkurczową naczyń na SNP (B). Analizę statystyczną przeprowadzono, w zależności od rozkładu danych, przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA lub testu Kruskala Wallisa, z odpowiednimi testami *post hoc*. Wyniki przedstawiono jako średnia ± SEM, n = 5-10 (po 2 krążki od jednej myszy), symbol * oznacza $p < 0,05$ w porównaniu do grupy kontrolnej.

4.2.23 Wpływ przeciwutleniacza o działaniu mitochondrialnym – MitoTEMPO na upośledzenie czynności śródbłonna w aorcie myszy C57BL/6J *ex vivo* wywołane przez dabrafenib

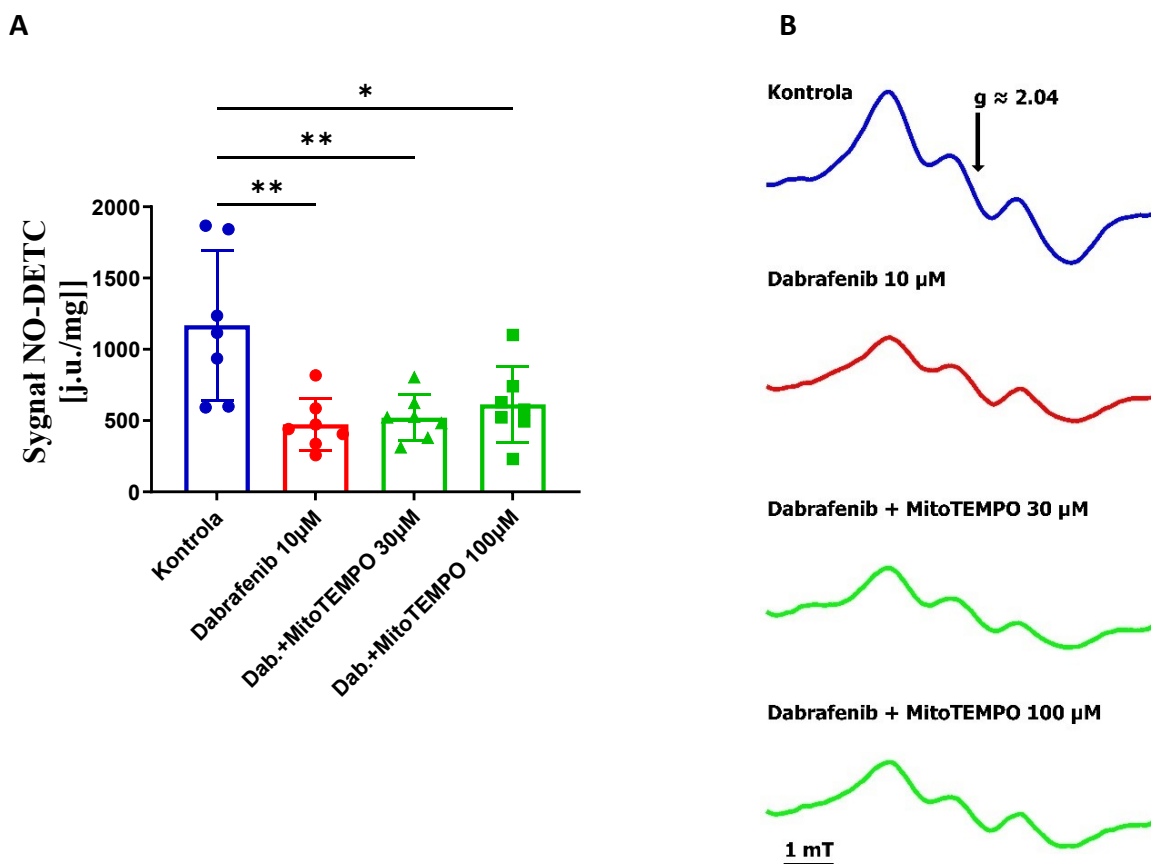
W celu sprawdzenia udziału wolnych rodników pochodzenia mitochondrialnego jako jednego z potencjalnych mechanizmów indukowania dysfunkcji śródbłonna naczyniowego przez dabrafenib (10 μM), oceniono działanie przeciwutleniacza ukierunkowanego na mitochondria – MitoTEMPO, w stężeniu 30 i 100 μM, na czynność śródbłonna (**Rycina 40**) oraz produkcję NO (**Rycina 41**). Wykazano istotną statystycznie poprawę odpowiedzi na Ach krążków aorty inkubowanych jednocześnie z dabrafenibem i MitoTEMPO w porównaniu do naczyń inkubowanych z samym dabrafenibem (**Rycina 40 A**). Różnica rozkurczu krążków aorty inkubowanych z dabrafenibem w obecności MitoTEMPO w porównaniu do krążków

inkubowanych z samym dabrafenibem była na granicy istotności statystycznej (**Rycina 40 A**). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w odpowiedziach rozkurczowych na SNP (**Rycina 40 B**).

Natomiast badanie produkcji NO w aortach wykazało, że MitoTEMPO nie przeciwdziałało upośledzeniu produkcji NO wywołanemu przez dabrafenib (**Rycina 41 A, B**). W aortach inkubowanych z dabrafenibem (10 μ M) w obecności MitoTEMPO (30 i 100 μ M), wykazano bowiem istotne statystycznie obniżenie sygnału NO- DETC w porównaniu do kontroli, podobnie jak w aortach inkubowanych z samym dabrafenibem (**Rycina 41 A, B**).



Rycina 40. Wpływ MitoTEMPO na czynność śródbłónka naczyniowego w izolowanej aorcie myszy C57BL/6J po 24 godzinach inkubacji *ex vivo* z dabrafenibem. Ocenę czynności śródbłónka naczyniowego aorty przeprowadzono z wykorzystaniem klasycznego miografu 620M. Wpływ dabrafenibu (10 μ M) oraz kombinacji dabrafenibu (10 μ M) i MitoTEMPO (30 μ M lub 100 μ M) na zależny od śródbłónka rozkurcz krążków aorty w odpowiedzi na Ach (A). Wpływ w/w związków na niezależną od śródbłónka odpowiedź rozkurczową naczyń na SNP (B). Analizę statystyczną przeprowadzono, w zależności od rozkładu danych, przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA lub testu Kruskala Wallisa, z odpowiednimi testami *post hoc*. Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SEM, n=5-10 (po 2 krążki od jednej myszy), symbol * oznacza $p < 0,05$ w porównaniu do grupy kontrolnej. Dla odpowiedzi na Ach 10^{-5} M $p=0,0883$ dla Dab. 10 μ M + MitoTEMPO 30 μ M vs Dab. 10 μ M; $p=0,0752$ dla Dab. 10 μ M+ MitoTEMPO 100 μ M vs Dab. 10 μ M.



Rycina 41. Wpływ MitoTEMPO na produkcję NO w izolowanej aorcie myszy C57BL/6J po 24 godzinach inkubacji *ex vivo* z dabrafenibem. Do pomiaru NO zastosowano technikę EPR. Wpływ dabrafenibu (10µM) oraz kombinacji dabrafenibu (10µM) i MitoTEMPO (30µM lub 100µM) na sygnał NO-DETC (A). Uśrednione widma EPR dla poszczególnych grup (B). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem *post hoc* Tukey'a. Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ SEM, n=7, symbol * oznacza $p < 0,05$; symbol ** oznacza $p < 0,01$ w porównaniu do grupy kontrolnej (Pomiary EPR wykonane we współpracy z Dr J. Pyką z JCET).

5 DYSKUSJA

W przedstawionej pracy doktorskiej, wykorzystując w istotnym stopniu badania *in vivo* w modelach mysich, zbadano dwa różne aspekty rozwoju dysfunkcji śródbłónka naczyniowego, które dotyczą pacjentów onkologicznych. Rozwój dysfunkcji śródbłónka w odpowiedzi na toczący się w organizmie proces chorobowy zbadano w mysim modelu nowotworu gruczołu sutkowego. Natomiast do oceny dysfunkcji śródbłónka w odpowiedzi na leki przeciwnowotworowe, która jest znanym zagadnieniem, dobrze przebadanym w przypadku leków takich jak doksorybicyna czy daunorubicyna, stosowanych w leczeniu raka piersi (29, 63–65), wybrano stosunkowo nowe leki, inhibitory kinaz BRAF i MEK, które są stosowane w terapii celowanej, a których mechanizmy toksycznego działania są dużo słabiej poznane.

Uzyskane w tej rozprawie doktorskiej wyniki badań potwierdziły, że dysfunkcja śródbłónka naczyniowego pojawia się zarówno w następstwie rozwoju choroby nowotworowej, jak i w wyniku zastosowania wybranej terapii przeciwnowotworowej. Otrzymane dane rzuciły także nowe światło na leżące u jej podłoża mechanizmy.

W pierwszym etapie badań, w mysim modelu raka gruczołu sutkowego wykazano, że wczesny etap rozwoju choroby nowotworowej był związany ze stanem zapalnym płuc oraz miejscową dysfunkcją śródbłónka płucnego jak i redukcją NO w krążeniu obwodowym, podczas gdy w późnym stadium choroby rozwojowi przerzutów towarzyszyło znaczne, ogólnoustrojowe zapalenie oraz upośledzenie czynności śródbłónka aorty. W drugim etapie badań wykazano natomiast, że zastosowanie terapii przeciwnowotworowej w postaci dabrafenibu również prowadzi do upośledzenia czynności śródbłónka naczyniowego. Wskazuje to, że zastosowana terapia przeciwnowotworowa mogłaby pogłębić dysfunkcję śródbłónka naczyniowego indukowaną przebiegiem samej choroby nowotworowej. Mechanizm rozwoju dysfunkcji śródbłónka wywołanej dabrafenibem może obejmować zmniejszenie aktywności śródbłónkowej syntazy tlenu azotu, zwiększoną produkcję reaktywnych form tlenu oraz zwiększenie aktywności szeregu kinaz serynowo-treoninowych, w tym kinaz szlaków CAMK i ROCK. Co jednak najważniejsze, w oparciu o w/w mechanizmy udało się wskazać nowe farmakologiczne sposoby przeciwdziałania dysfunkcji śródbłónka wywołanej przez dabrafenib w mysiej aorticie *ex vivo*.

Warto również podkreślić, że prawidłowa funkcja śródbłónka, związana z produkcją NO oraz innych mediatorów w naczyniach krwionośnych, pełni funkcję ochronną przed adhezją i migracją komórek nowotworowych, a w konsekwencji przed tworzeniem przerzutów (12, 66). Zatem ochrona śródbłónka naczyniowego i przeciwdziałanie upośledzeniu mechanizmów zależnych od NO ma kluczowe znaczenie zarówno w leczeniu choroby nowotworowej i ograniczaniu przerzutowości, jak i w ochronie pacjentów przed sercowo-naczyniowymi powikłaniami samej choroby i jej leczenia.

5.1 CHARAKTERYSTYKA DYSFUNKCJI ŚRÓDBŁONKA W MYSIM MODELU NOWOTWORU GRUCZOŁU SUTKOWEGO

W pierwszej części badań przeprowadzonych w ramach tej rozprawy doktorskiej wykorzystano ortotopowy model mysiego raka gruczołu sutkowego. Jest to jeden z modeli najczęściej stosowanych w badaniach przedklinicznych, który wykazuje na poziomie molekularnym wiele cech wspólnych z ludzkim potrójnie ujemnym rakiem piersi (ang. triple negative breast cancer). Do tych cech należą: brak ekspresji białka receptora estrogenowego (ER), receptora progesteronowego (PR) i receptora nabłonkowego czynnika wzrostu 2 (ErbB2/HER2), chociaż niektóre geny, w obszarze których doszło to mutacji w komórkach ludzkiego raka piersi, takie jak BRCA1 i BRCA2, nie są zmienione w komórkach 4T1 (67). Linia komórkowa 4T1, pochodząca z guza gruczołu sutkowego który powstał spontanicznie u myszy BALB/c, jest znana ze swojego agresywnego charakteru i zdolności do skutecznego i szybkiego przerzutowania do odległych narządów takich jak płuca, wątroba, węzły chłonne, mózg i kości, czyli do tych samych narządów, w obszarze których tworzą guzy wtórne komórki raka piersi u ludzi (68). Ważną zaletą modelu opartego na ortotopowym podaniu komórek 4T1 jest możliwość analizy kolejnych stadiów rozwoju nowotworu i procesu przerzutowania u zwierząt (myszy BALB/c) z prawidłową funkcją układu odpornościowego. Ta cecha czyni go cennym układem modelowym do badania reakcji organizmu, w tym układu immunologicznego, na obecność guza pierwotnego i migrację komórek nowotworowych (67, 68) w przeciwieństwie do wielu innych mysich modeli ludzkich chorób nowotworowych o charakterze ksenoprzeszczepów u zwierząt charakteryzujących się wyciszonym układem odpornościowym (np. myszy NOD-SCID).

W przeprowadzonych badaniach udało się wyraźnie rozróżnić występowanie wczesnej dysfunkcji śródbłónka w płucach na etapie przedprzerzutowym oraz rozwój obwodowej

dysfunkcji śródbłonna w aorcie na późnym etapie rozwoju choroby. Uzyskane wyniki wskazują, że za wczesną lokalną dysfunkcją śródbłonna oraz późną systemową dysfunkcją śródbłonna stoją różne mechanizmy.

5.1.1 Wczesny etap rozwoju choroby nowotworowej a dysfunkcja śródbłonna naczyniowego

We wczesnej fazie choroby, poprzedzającej rozwój przerzutów, stwierdzono obecność stanu zapalnego płuc widocznego w obrazie histologicznym w postaci nacieków granulocytarnych w miąższu płuc. Obecność nacieku leukocytów została opisana w poprzednich pracach (69–71) w których wykazano, że myszy z guzem 4T1 posiadają nacieki granulocytarne w miejscach tworzenia się przerzutów (70). Te wyniki wpisują się doskonale w koncepcję rozwoju niszy premetastatycznej (ang. premetastatic niche) poprzedzającej rozwój przerzutów, która powstaje w obszarze narządu metastatycznego przed jego zasiedleniem przez migrujące komórki nowotworowe (71). Ponadto, w fazie poprzedzającej rozwój przerzutów wykazano także obecność prozapalnego fenotypu śródbłonna naczyniowego płuc, charakteryzującego się zwiększoną ekspresją VCAM-1 w płucach, której towarzyszyło upośledzenie biodostępności NO w tym narządzie. Białko VCAM-1 odgrywa kluczową rolę w odpowiedzi zapalnej i rekrutacji leukocytów do ostrych i przewlekłych miejsc zapalnych, gdyż pośredniczy zarówno w adhezji leukocytów do komórek śródbłonna, jak i aktywuje ścieżki sygnałowe, aby ułatwić transmigrację leukocytów z krwi do tkanki (72). Krążące komórki nowotworowe wykorzystują wiele różnych mechanizmów w celu adhezji do śródbłonna naczyniowego. Jednym z nich jest adhezja przerzutujących komórek nowotworowych do ściany naczynia poprzez ich interakcję z białkiem VCAM-1 na komórkach śródbłonna. W konsekwencji, umożliwia to wydajną adhezję i ekstrawazację komórek nowotworowych dających początek przerzutom w narządach dystalnych (19, 20, 73). W tej pracy nie badano jaka jest przyczyna zwiększenia ekspresji VCAM-1 na powierzchni śródbłonna. Mechanizmem odpowiedzialnym za zwiększenie ekspresji VCAM-1 na powierzchni komórek śródbłonna naczyniowego mogło być występowanie stanu zapalnego w obszarze płuc, rozwijającego się już na wczesnym etapie choroby nowotworowej, jak również obecność w krążeniu płucnym komórek nowotworowych (74).

Wytwarzany przez śródbłonek naczyniowy NO wykazuje aktywność antyadhezyjną (26, 75), która ogranicza infiltrację leukocytów do tkanki płuc i może ograniczać adhezję i transmigrację komórek nowotworowych w narządzie przerzutowym (23, 76). Dlatego też

obserwowany spadek biodostępności NO w krążeniu płucnym, który udało się wykazać wykorzystując unikatowy model izolowanego perfundowanego płuca, mógłby stanowić istotny mechanizm ułatwiający migrację komórek nowotworowych, poprzez ułatwienie przylegania komórek nowotworowych i neutrofilów do śródbłonka i tym samym, ułatwienie ekstrawazacji komórek nowotworowych (70, 71, 77, 78). Co więcej, NO hamuje też aktywację płytek krwi (79), które uczestniczą w zatrzymywaniu komórek nowotworowych w naczyniach krwionośnych w miejscach ich ekstrawazacji w obszarze zakrzepów (80–82). W przeprowadzonych doświadczeniach zaobserwowano spadek liczby płytek krwi po 2 tygodniach od wszczepienia myszom komórek 4T1, który może być następstwem ich zwiększonej interakcji z komórkami nowotworowymi. Zatem spadek biodostępności NO w płucach może również ułatwiać zwiększoną interakcję płytek krwi z komórkami nowotworowymi i nasilać ich przerzutowanie. Warto jednak dodać, że rola płytek w przerzutowości nowotworowej nie jest jasna i opisano zarówno przeciwnowotworowe jak i promujące przerzutowość nowotworową działania leków przeciwplatekcyjnych (83–85).

W świetle powyższych wyników, dysfunkcja śródbłonka naczyniowego i niedobór NO w płucach wydają się być częścią mechanizmów rozwoju przerzutów we wczesnej fazie choroby nowotworowej, w szczególności tworzenia niszy poprzedzającej zasiedlenie tkanki płuc przez migrujące komórki 4T1. Rozwój lokalnej dysfunkcji śródbłonka w płucach, nastąpił prawdopodobnie w odpowiedzi na obecność komórek nowotworowych w układzie krążenia oraz toczący się proces zapalny w płucach, jednak mechanizmy u podłoża tego zjawiska wymagają dalszych badań.

Istotnym wynikiem tej rozprawy było występowanie korelacji pomiędzy obniżeniem biodostępności NO w krążeniu płucnym w fazie przedprzerzutowej choroby a przejściowym spadkiem dostępności systemowej NO, o czym świadczył spadek zawartości HbNO w erytrocytach, a także zmniejszone stężenie azotynów w osoczu. Warto dodać, że stężenie NO₂⁻ nie jest optymalnym parametrem oceny biodostępności NO, gdyż NO₂⁻ ulega przekształceniu do NO₃⁻ (86). Natomiast HbNO jest lepszym parametrem dostępności ogólnoustrojowej NO, gdyż związek ten powstaje po związaniu się NO z hemoglobina w czerwonych krwinkach. Poziom HbNO koreluje z funkcją śródbłonka i może służyć jako wskaźnik biochemiczny oceny ogólnoustrojowej biodostępności NO odpowiadający funkcji śródbłonka naczyń krwionośnych (87, 88). Te wyniki zdają się sugerować, że już na wczesnym etapie przerzutowości w modelu raka gruczołu sutkowego skala zaburzonej produkcji NO w płucach była tak duża, że mogła mieć wpływ na systemową biodostępność NO.

Biorąc pod uwagę, że powierzchnia śródbłónka naczyniowego płuc stanowi największą część powierzchni śródbłónka w układzie krążenia (89) wpływ produkcji NO w płucach na ogólnoustrojową biodostępność NO wydaje się zrozumiały. Jednak obniżenie stężenia azotynów i HbNO miało jedynie charakter przejściowy, gdyż później w trakcie rozwoju przerzutów nastąpił wzrost ich stężenia, co najprawdopodobniej wiązało się z dalszym rozwojem stanu zapalnego i indukcją NOS2 (iNOS) (90).

5.1.2 Zaawansowany etap rozwoju choroby nowotworowej a czynność śródbłónka naczyniowego

Późna faza choroby nowotworowej (5–6 tygodni po wszczepieniu komórek 4T1) charakteryzowała się silnym stanem zapalnym o charakterze ogólnoustrojowym, w tym znaczną leukocytozą, wzrostem liczby RBC, PLT, MCV oraz zwiększeniem HCT, a także zwiększonym stężeniem białek ostrej fazy (haptoglobiny, surowiczego amyloidu A) i IL-6 w osoczu. W najbardziej zaawansowanym stadium choroby nowotworowej stwierdzono występowanie dysfunkcji śródbłónka obwodowego w postaci upośledzenia zależnej od NO czynności rozkurczowej aorty oraz zmniejszenia produkcji NO. Natomiast w tym samym czasie, wykazano wzrost systemowej biodostępności NO, pomimo upośledzonej produkcji NO przez śródbłonek aorty. Wyniki te mogą sugerować, że w późnej fazie choroby nowotworowej źródłem NO w krążeniu systemowym nie jest eNOS. Bardziej prawdopodobnym źródłem NO wydaje się być iNOS, której ekspresja wzrasta w komórkach biorących udział w odpowiedzi immunologicznej organizmu w reakcji na toczący się proces nowotworowy, takich jak makrofagi, monocyty i neutrofile (91–93). Warto też wspomnieć, że u pacjentów wysoka biodostępność NO w późnej fazie choroby nowotworowej wiązała się z gorszym rokowaniem (94–96).

Obserwowana dysfunkcja śródbłónka aorty w późnej fazie choroby nowotworowej została najprawdopodobniej wywołana przez zapalenie ogólnoustrojowe. Istotnie, upośledzenie zależnej od śródbłónka czynności rozkurczowej aorty zbiegło się z silnym wzrostem markerów stanu zapalnego. Znanych jest wiele mechanizmów prozapalnych bezpośrednio wpływających na czynność śródbłónka (97, 98). W badaniach w mysim modelu raka gruczołu sutkowego Dalaklioglu i wsp. wykazali, że systemowe zapalenie w późnej fazie choroby było związane z produkcją TNF oraz nasilonym stresem oksydacyjnym zależnym od NOX w aorcie, co mogło być także przyczyną obserwowanej dysfunkcji śródbłónka (99). W niniejszej rozprawie doktorskiej nie badano stężenia osoczkowego TNF, ale obserwowano

wzrost osoczowego stężenia IL-6 oraz białek ostrej fazy. Można jednak przypuszczać, że poziom TNF był również podniesiony.

Co ciekawe, upośledzeniu zależnej od NO funkcji śródbłonna naczyniowego towarzyszyło kompensacyjne zwiększenie produkcji PGI₂. Zarówno DuP-697, jak i indometacyna znacząco hamowały uwalnianie PGI₂ z krążków aorty. Ten wynik sugeruje, że głównym źródłem zwiększonej produkcji PGI₂ w ścianie naczynia była indukowalna forma COX (COX-2) (100, 101). Ten kompensacyjny efekt może być korzystny nie tylko ze względu na naczynioprotekcyjne, przeciwwzakrzepowe działanie PGI₂, ale także ze względu na przeciwprzerzutowe właściwości PGI₂ (24, 25, 102–104).

Upośledzeniu produkcji NO towarzyszyła też istotnie zwiększona ekspresja vWF, co sugeruje prozakrzepowy fenotyp dysfunkcyjnego śródbłonna w aorcie w modelu przerzutowości nowotworowej myszy BALB/c po wszczepieniu komórek 4T1, wykrywalny nawet wcześniej niż upośledzenie zależnego od śródbłonkowego NO rozkurczu aorty. Odpowiedź ta mogła być wywołana zarówno przez systemowe czynniki prozapalne, takie jak cytokiny i białka ostrej fazy (98), jak również przez krążące komórki nowotworowe (16, 105). Istotnie, komórki nowotworowe mogą indukować komórki śródbłonna do uwalniania vWF, a niektóre komórki nowotworowe mają zdolność do ekspresji vWF *de novo*, co prowadzi do tworzenia prozapalnego mikrośrodowiska, które sprzyja progresji samego guza, jak i przerzutów, a także mikrozakrzepicy (106). Wzrost vWF wywiera efekt prozakrzepowy, poprzez ułatwianie adhezji i agregacji płytek krwi i zapobieganie degradacji proteolitycznej czynnika VIII (98). Liczne dowody wskazują, że vWF odgrywa też rolę w procesach zapalnych poprzez mobilizację leukocytów i aktywację dopełniacza (98). Ponadto, vWF sprzyja tworzeniu tzw. pułapek zewnątrzkomórkowych neutrofili (ang. NET), bezpośrednio oddziałuje z NET za pośrednictwem siły elektrostatycznej i zatrzymuje NET na powierzchni śródbłonna. Zarówno NET, jak i vWF mogą promować rozwój zakrzepicy i stanu zapalnego (107).

Warto dodać, że wysokie poziomy vWF zostały udokumentowane u wielu chorych na nowotwory złośliwe, szczególnie w zaawansowanym stadium choroby (106). U pacjentów onkologicznych wysoki poziom vWF wiąże się z ryzykiem rozwoju żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej oraz gorszym rokowaniem (108). Jednym z zaproponowanych mechanizmów wyjaśniających zakrzepicę związaną z rakiem jest aktywacja komórek naczyń i tworzenie NET pod wpływem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (egzosomów) uwolnionych z komórek nowotworowych. Mechanizm ten został potwierdzony przez zespół

Leal i wsp. w modelu raka gruczołu sutkowego u myszy BALB/c. Autorzy wykazali, że samice myszy BALB/c po ortotopowym wstrzyknięciu komórek 4T1, oprócz znacznie zwiększonej liczby krążących neutrofili, wykazywały zwiększone poziomy DNA i mieloperoksydazy w osoczu, wskazujące na obecność NET. Myszy z guzem, poddane indukcji stanu zakrzepicy żyłnej lub tętniczej, w obu przypadkach wykazywały przyspieszone tworzenie się zakrzepu w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Leczenie rekombinowaną ludzką DNazą 1 odwróciło prozakrzepowy fenotyp myszy z guzem w obu modelach zakrzepicy. Co ciekawe, egzosomy pochodzące z komórek 4T1 również indukowały tworzenie się NET w neutrofilach pochodzących od myszy leczonych czynnikiem stymulującym kolonie granulocytów (ang. G-CSF). Ponadto, dożylnie podanie egzosomów pochodzących z komórek 4T1 myszom leczonym G-CSF znacząco przyspieszyło zakrzepicę żylną *in vivo* (109).

W tym kontekście warto podkreślić, że w przeciwieństwie do wzrostu ekspresji vWF w aorcie, w śródbłonku płuc w późnym stadium tworzenia przerzutów zaobserwowano wyraźny spadek, a nie wzrost ekspresji vWF. Podobne zjawisko zostało opisane w innych badaniach przeprowadzonych w JCET przez dr M. Smędę i wsp., w których wykazano zmniejszenie ekspresji vWF, a także VE-kadheryny i białka adhezyjnego CD31 w późnej fazie rozwoju mysiego raka gruczołu sutkowego u myszy BALB/c. Zmiany te zinterpretowano jako fenotypowe przełączenie śródbłonka płuc w kierunku komórek mezenchymalnych (EndMT) (110). Późnej odpowiedzi śródbłonka płuc towarzyszyło zmniejszenie przepuszczalności bariery śródbłonkowej, natomiast niedobór NO w płucach w tych badaniach także był obserwowany już od wczesnej fazy rozwoju choroby (110). Wyniki te są zgodne z doniesieniami, które wskazują, że obniżony poziom NO w krążeniu promuje zjawisko przejścia śródbłonkowo-mezenchymalnego (111). Warto dodać, że EndMT było nasilone u myszy starszych, wskazując na to, że mechanizmy upośledzenia naczynioprotekcyjnej czynności śródbłonka płucnego, zależnej od NO we wczesnej fazie procesów przerzutowości, mogą być bardziej nasilone u osobników starszych (55). W tej rozprawie doktorskiej badano jednak te procesy tylko u młodych myszy BALB/c.

O upośledzeniu funkcji śródbłonka systemowego związanym z chorobą nowotworową donoszono nie tylko w modelach eksperymentalnych, ale także u pacjentów (94, 112, 113). Co ciekawe, dysfunkcja śródbłonka systemowego towarzysząca chorobom takim jak cukrzyca, miażdżyca i otyłość może przyspieszyć postęp choroby nowotworowej (114–116). W badaniach przeprowadzonych w ramach tej rozprawy doktorskiej obserwowano postępującą aktywację ogólnoustrojowych mechanizmów zapalnych zależnych od IL-6 i białek ostrej fazy,

która może przyczyniać się do dalszego przyspieszenia tworzenia przerzutów (117–119). Znany jest bowiem związek IL-6 z progresją różnych typów nowotworów (120–122). IL-6 stymuluje ekspresję cząsteczek adhezyjnych na powierzchni śródbłónka, co może sprzyjać adhezji komórek nowotworowych (123). Zwiększone stężenie IL-6 zostało nawet zaproponowane jako marker prognostyczny (120, 122, 124), ponieważ stwierdzono podwyższone stężenie IL-6 u pacjentów z przerzutami w porównaniu do pacjentów bez przerzutów (123, 125). Są także dowody na związek reakcji ostrej fazy z progresją choroby nowotworowej. Dla przykładu haptoglobina może być podwyższona u pacjentów z nowotworem piersi i ta odpowiedź może wskazywać na obecność przerzutów (119, 126). Z kolei SAA, myszy odpowiednik CRP, stymuluje transkrypcję prozapalnych białek S100A8 i S100A9, silnie zwiększając adhezję, migrację i inwazję ludzkich i mysich komórek nowotworowych (127).

Podsumowując, w pierwszej części rozprawy doktorskiej scharakteryzowano czasowe zależności między rozwojem dysfunkcji śródbłónka w krążeniu płucnym i obwodowym, wzrostem guza pierwotnego, przerzutami do płuc oraz postępującym stanem zapalnym w toku rozwoju choroby w mysim modelu raka gruczołu sutkowego. Wykazano, że rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych i ich przerzutowość są ściśle związane ze zmianami funkcji i fenotypu śródbłónka naczyniowego w płucach już na bardzo wczesnym etapie postępu choroby. Natomiast dysfunkcja śródbłónka systemowego jest obecna w zaawansowanym stadium choroby nowotworowej i koreluje z silnym ogólnoustrojowym stanem zapalnym, który z jednej strony jest odpowiedzią obronną organizmu na rozwijający się nowotwór, a z drugiej strony sprzyja dalszemu postępowi choroby nowotworowej i może przyczyniać się do dalszego zwiększania ilości przerzutów.

5.2 CHARAKTERYSTYKA DYSFUNKCJI ŚRÓDBŁÓNKA WYWOŁANEJ LECZENIEM PRZECIWNOWOTWOROWYM INHIBITORAMI KINAZ BRAF I MEK

Wyniki badań opisanych w drugiej części przedstawionej rozprawy doktorskiej dostarczyły dowodów na to, że inhibitory kinaz BRAF i MEK, takie jak dabrafenib i trametynib, wykazują odmienny wpływ na czynność śródbłónka naczyniowego. Zarówno w badaniach *in vivo* jak i *ex vivo*, dabrafenib (inhibitor BRAF) powodował upośledzenie zależnej od śródbłónka funkcji aorty mysiej, podczas gdy trametynib nie wykazywał takiego działania.

W literaturze można znaleźć doniesienia o kardiotoxyczności zarówno monoterapii z wykorzystaniem trametynibu (41) jak i dabrafenibu (128). Niektóre powikłania, takie jak spadek frakcji wyrzutowej lewej komory serca (LVEF), były częstsze u pacjentów leczonych kombinacją inhibitorów BRAF i MEK w porównaniu z monoterapią polegającą na zastosowaniu inhibitora BRAF. Z tego powodu przypisywano je raczej działaniu inhibitorów MEK a nie inhibitorów BRAF. Z drugiej strony, wydłużenie odcinka QT pojawiało się u pacjentów leczonych inhibitorami BRAF, vemurafenibem i dabrafenibem, ale nie u pacjentów leczonych inhibitorem MEK, trametynibem (46, 129). Ponieważ jednak obecnie leki te stosowane są głównie w postaci terapii skojarzonej, większość danych klinicznych dotyczy sercowo-naczyniowych powikłań u pacjentów leczonych kombinacją dabrafenibu i trametynibu (130). W meta-analizie pięciu randomizowanych badań klinicznych zaproponowano kilka potencjalnych mechanizmów toksyczności inhibitorów BRAF i MEK (46). Jednym z nich jest zaburzenie regulacji układu renina-angiotensyna, wywołane przez hamowanie szlaku kinaz BRAF i MEK, którego następstwem może być obserwowane u pacjentów nadciśnienie tętnicze. Drugi zaproponowany mechanizm jest związany ze zmniejszoną biodostępnością tlenu azotu, wynikającą z upośledzenia szlaku sygnalizacyjnego zależnego od czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF), *via* hamowanie ścieżki zależnej od kinaz MAPK (46). Wskazano także, że szlak kinaz MAPK może odgrywać kardioprotekcyjną rolę w mięśniu sercowym (131). Istnieje szereg mechanizmów, które wskazują na to, że leczenie inhibitorami BRAF i MEK może prowadzić do zaburzenia mechanizmów fizjologicznych, apoptozy, przebudowy miocytów, a następnie do zmniejszenia LVEF, a w dłuższej perspektywie do rozwoju niewydolności serca (46). Hipotezy te łączy założenie, że niekorzystne skutki działania inhibitorów BRAF i MEK wynikają z zahamowania ich wspólnego docelowego szlaku zależnego od kinaz MAPK nie tylko w komórkach nowotworowych, ale także w zdrowych komórkach organizmu, w tym w komórkach ściany naczyń krwionośnych. Istnieje jednak także możliwość, że do powikłań sercowo-naczyniowych po podaniu inhibitorów BRAF i MEK przyczyniają się dodatkowe efekty (ang. „off-target”), czyli ich oddziaływanie na inne szlaki molekularne.

5.2.1 Dysfunkcja śródbłonka naczyniowego wywołana przez dabrafenib u myszy C57BL/6J *in vivo*

W modelu *in vivo*, zarówno po podaniu leków myszom dootrzewnowo w jednorazowej dawce, jak i po przedłużonej ekspozycji myszy na leki podawane w paszy przez 7 dni,

wykazano upośledzenie zależnego od śródbłonka naczyniowego rozkurczu aorty wywołane przez dabrafenib, ale tego efektu nie obserwowano po podawaniu trametynibu. Natomiast zarówno dabrafenib jak i trametynib obniżał ekspresję śródbłonkowej syntazy tlenu azotu na poziomie mRNA, co wydaje się sprzeczne z wynikami badań czynnościowych. Jednak aktywność eNOS nie jest głównie regulowana na poziomie ekspresji, ale przede wszystkim na poziomie fosforylacji eNOS (132), choć również zablokowanie niektórych miejsc fosforylacji eNOS nie ma wielkiego wpływu na aktywność tego enzymu (133).

W przeprowadzonych badaniach żaden z badanych leków nie miał wpływu na poziom białek odpowiedzialnych za utrzymanie połączeń między komórkami śródbłonka i regulację przepuszczalności: kadheryny śródbłonka naczyniowego oraz kładyny-5. Z kolei w opublikowanych niedawno badaniach *in vitro*, Bromberger i wsp. wykazali wpływ dabrafenibu w stężeniu 100 μ M na ekspresję kładyny-5 i VE-kadheryny w komórkach śródbłonka naczyń skóry (DMEC), jak i na przepuszczalność monowarstwy utworzonej z tych komórek już po 1 godzinie inkubacji (ale w niższych stężeniach 1 i 10 μ M dabrafenib nie wywołał tego efektu) (134).

Istnieje wiele doniesień, że szlak sygnałowy zależny od BRAF odgrywa rolę w regulacji przepuszczalności bariery śródbłonka naczyniowego, jednak nie poprzez wpływ na ekspresję białek adhezyjnych, a poprzez modulowanie reorganizacji cytoszkieletu aktynowego, które wpływa na funkcję VE-kadheryny (135). Dorard i wsp. wykazali zmniejszenie przepuszczalności bariery śródbłonkowej u myszy pozbawionych genu *BRAF* w komórkach śródbłonka (135). Molekularny mechanizm regulacji przepuszczalności obejmuje aktywację ścieżki RhoA/ROCK2/LIM/kofilina, co prowadzi do przebudowy F-aktyny. Mechanizm ten zależy od aktywności kinazy BRAF, wiązania BRAF z RAS/RAP1 i zdolności do tworzenia dimerów BRAF/CRAF. W komórkach, w których usunięto *BRAF*, dochodziło do większej dimeryzacji CRAF/ROCK2 i ich relokacji do VE-kadheryny, podczas gdy fosforylacja LIM i kofiliny ulegała zmniejszeniu. Kinaza LIM hamuje demontaż włókien aktynowych za pośrednictwem kofiliny, co prowadzi do zwiększenia ich ilości (136, 137). Dlatego spadek aktywności LIM prowadzi do zmniejszenia zawartości F-aktyny, tworzenia wiązek aktyny korowej i zmniejszenia przepuszczalności śródbłonka naczyń (135).

W badaniach przeprowadzonych w ramach tej pracy doktorskiej nie zbadano wpływu dabrafenibu na przepuszczalność bariery śródbłonka *in vivo*, ani *ex vivo*. Nie można jednak wykluczyć takiego działania dabrafenibu tylko w oparciu o brak zmian poziomu białek

odpowiedzialnych za regulację przepuszczalności tj. VE-kadheryny i kładyny-5. Natomiast stwierdzona w badaniach *ex vivo* aktywacja kinazy ROCK, która może prowadzić do dysfunkcji bariery śródbłonna, wskazuje na możliwy udział tego mechanizmu w toksyczności dabrafenibu, aspekt ten wymaga jednak potwierdzenia w dalszych badaniach.

Warto dodać, że upośledzenie czynności zależnej od NO obserwowane po 7 dniach podawania dabrafenibu myszom, nie prowadziło do znaczących zmian morfologii krwi, które mogłyby świadczyć o procesie zapalnym. W literaturze można znaleźć informacje, że u pacjentów onkologicznych leczonych dabrafenibem i trametynibem obserwuje się wzrost prozapalnych chemokin, które świadczą o stanie zapalnym i mogą być biomarkerami działań niepożądanych skojarzonej terapii (138). Z kolei w badaniach na zwierzętach wskazywano raczej na przeciwzapalne działanie dabrafenibu (139). Natomiast w badaniach Beck i wsp., przy znacznie wydłużonym w czasie podawaniu trametynibu (1mg/kg m.c./dzień) w paszy, wykazano znaczący wzrost WBC. Co więcej, w badaniach tych trametynib (1mg/kg m.c./dzień) powodował także spadek masy ciała myszy oraz wzrost śmiertelności do ok 50% po 60 dniach podawania w paszy (140). Jednak w przeprowadzonych w tej pracy doktorskiej badaniach trametynib nie miał wpływu na WBC, a jedynie na niektóre parametry czerwonych krwinek.

Dawki leków podawane myszom dobrano w oparciu o dane literaturowe dotyczące badań *in vivo* na myszach oraz wstępnych pilotowych doświadczeń przeprowadzonych w tym celu. Dabrafenib w modelach eksperymentalnych, jak na przykład model ksenoprzeszczepu ludzkiego guza, był podawany w dawkach od 10 do 100 mg/kg/dzień (141). Do badań toksycznego działania na śródbłonek wybrano dawkę 50mg/kg m.c./dzień. Dawka dabrafenibu 50 mg/kg m.c./dzień w przybliżeniu odpowiada maksymalnej dawce klinicznej stosowanej u pacjentów, która wynosi 300 mg/dzień, uwzględniając w przeliczeniu około 10-krotnie szybszy metabolizm u myszy. Natomiast stosowane w różnych modelach zwierzęcych dawki trametynibu są zasadniczo niższe niż dabrafenibu i mają szerszy zakres od 0,1-2 mg/kg choć stosowano też dawki 10–30 mg/kg u myszy z upośledzonym działaniem układu immunologicznego (ang. nude mice) (142). Dla trametynibu wybrano stosunkowo wysoką, ale dobrze tolerowaną dawkę 5mg/kg m.c. (143), która po uwzględnieniu 10-krotnie wyższego tempa metabolizmu u myszy przekracza jednak dawki trametynibu stosowane u pacjentów.

5.2.2 Dysfunkcja śródbłónka naczyniowego wywołana przez dabrafenib w izolowanej aorcie myszy C57BL/6J *ex vivo*

W przeprowadzonych badaniach w modelu *ex vivo* z wykorzystaniem izolowanej aorty mysiej, w pierwszej kolejności potwierdzono obserwowany wcześniej *in vivo* wpływ badanych leków na zależną od śródbłónka naczyniowego czynność rozkurczową mysiej aorty. Nie stwierdzono wpływu dabrafenibu i trametynibu na czynność śródbłónka po 6 godzinach inkubacji aorty z lekami, natomiast po wydłużeniu czasu inkubacji do 24 godzin stwierdzono upośledzenie rozkurczu aorty w odpowiedzi na Ach. Analogicznie jak w modelu *in vivo*, upośledzenie czynności śródbłónka było wywołane przez dabrafenib, podczas gdy trametynib nie wywoływał takiego efektu. Co ciekawe, we wspomnianych już badaniach *in vitro* Bromberger i wsp. obserwowali działanie dabrafenibu na komórki śródbłónka już po jednej godzinie inkubacji, przy czym ten efekt obserwowano w bardzo wysokim stężeniu tego leku (100 μ M) (134).

Wyniki badań czynnościowych w izolowanej aorcie jednoznacznie pokazały wpływ dabrafenibu na upośledzenie zależnego od NO rozkurczu aorty, co potwierdziły wyniki bezpośrednich pomiarów produkcji NO która była obniżona tylko w aorcie inkubowanej z dabrafenibem, natomiast trametynib nie wpływał na produkcję NO. Zmniejszenie aktywności syntazy tlenku azotu pod wpływem dabrafenibu wykazano również pośrednio na podstawie zmniejszenia produkcji znakowanej Cytruliny+9 przez aortę pod wpływem tego leku. Natomiast ekspresja eNOS na poziomie mRNA i na poziomie białka była nieznacznie obniżona pod wpływem zarówno dabrafenibu jak i trametynibu. Co więcej oba leki zmniejszały fosforylację eNOS-Ser(1177), która jest konieczna do aktywacji tego enzymu (132), podobnie jak oba leki spowodowały zmniejszenie fosforylacji kinazy AKT, która ma wpływ na regulację aktywności eNOS poprzez fosforylację Ser1177 w obszarze tego enzymu (144). Wyniki te w żadnym stopniu nie wyjaśniają obserwowanych różnic w działaniu dabrafenibu i trametynibu na produkcję NO i czynność śródbłónka naczyniowego w izolowanej aorcie po 24 godzinnej inkubacji aorty z tymi lekami *ex vivo*. Być może w tym przypadku aktywność eNOS nie jest regulowana poprzez fosforylację tego enzymu w pozycji Ser 1177 (133), a zatem zmiany, które opisano powyżej, nie mają wielkiego znaczenia czynnościowego. Warto wspomnieć jeszcze jedną niespójność wyników. Profilowanie aktywności kinaz wskazało na zwiększenie aktywności kinazy AKT w aortach inkubowanych z dabrafenibem, co powinno skutkować raczej aktywacją eNOS i zwiększeniem produkcji NO, podobnie jak zmniejszenie pod wpływem dabrafenibu fosforylacji eNOS-Thr(495), która ma hamujący wpływ na aktywność

eNOS (132, 145). Tymczasem obserwowano zmniejszenie aktywności NOS (pomiar znakowanej L-cytruliny), zmniejszenie produkcji NO (pomiar EPR), oraz upośledzenie zależnego od śródbłonkowego NO rozkurczu aorty (pomiar czynnościowy) po inkubacji aorty z dabrafenibem. W sumie wyniki te wskazują na niewielką wartość ilościowych analiz molekularnych, albo na mechanizmy wymykające się zrozumieniu na obecnym etapie interpretacji uzyskanych wyników.

Wraz z upośledzeniem produkcji NO po inkubacji aorty z dabrafenibem lub trametynibem, obserwowano również obniżoną produkcję naczynioprotekcyjnej PGI₂. Produkcja PGI₂ jest regulowana przez aktywację szlaku MEK i wykazano, że jest silnie hamowana przez inhibitory kinazy MEK (146), zatem zmniejszenie jej produkcji potwierdza hamujące działanie obu badanych leków w szlaku MAPK, ale nie wyjaśnia obserwowanych różnic w ich działaniu. Pomimo bardzo silnego upośledzenia produkcji prostacykliny w aorcie przez oba leki, czynność rozkurczowa zależna od śródbłonkowego NO, była upośledzona tylko przez dabrafenib, wskazując na to, że rozkurcz był w całości zależny od NO i upośledzenie produkcji PGI₂ nie miało żadnego wpływu na czynność śródbłonka. Natomiast upośledzenie produkcji PGI₂ może mieć także skutki prozakrzepowe, które nie zostały zbadane w ramach tej pracy, ale warto je uwzględnić w przyszłych badaniach.

Omówione wyniki analiz molekularnych w izolowanej aorcie w modelu 24 godzinnej inkubacji z inhibitorami BRAF i MEK nie wyjaśniają zmian obserwowanych w badaniach czynnościowych *in vivo*. Zatem mechanizm upośledzenia produkcji NO pod wpływem dabrafenibu wymaga głębszego wyjaśnienia.

W literaturze można znaleźć informacje, że efekty uboczne u pacjentów leczonych inhibitorami BRAF mogą być następstwem tego samego zjawiska, które odpowiada za pojawiającą się u nich oporność na leczenie, zwanego paradoksalną aktywacją ERK (134). Polega ona na aktywacji kolejnych kinaz w kaskadzie MAPK pomimo zahamowania BRAF na skutek różnych mechanizmów (147–150). Pauliakos i wsp. wykazali, że aktywacja ERK w odpowiedzi na inhibitory BRAF występuje w szczególności w komórkach z prawidłową formą białka BRAF (151). W przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej badaniach nie stwierdzono zwiększenia ekspresji ani fosforylacji białka ERK po 24 godzinach inkubacji aort z dabrafenibem. Natomiast analiza profilu aktywności kinaz serynowo-treoninowych PamGene wykazała, że w aortach inkubowanych z dabrafenibem następuje aktywacja kinaz z rodziny RSK, które są efektorami kaskady sygnałowej RAS/RAF/MEK/ERK, bezpośrednio

fosforylowanymi przez ERK. Kinazy RSK stymulują postęp cyklu komórkowego i biorą udział w regulacji różnych procesów komórkowych jak wzrost, proliferacja i przeżywalność (152, 153). Ich zwiększona aktywność może zatem świadczyć o paradoksalnej aktywacji ERK w aortach inkubowanych z dabrafenibem, chociaż wspomniane wyniki analizy Western Blot tego nie wykazały. Bromberger i wsp. także badali zjawisko paradoksalnej aktywacji ERK i pokazali zwiększoną ekspresję i fosforylację ERK w komórkach DMEC po 1 godzinie inkubacji z dabrafenibem w stężeniu 1 μ M oraz vemurafenibem (innym inhibitorem kinazy BRAF) w stężeniu 1 i 10 μ M, podczas gdy dabrafenib w wyższych stężeniach (10-100 μ M) hamował aktywność ERK (134). Wydaje się zatem, że paradoksalna aktywacja ERK to mechanizm który jest uruchamiany zależnie od stosowanego stężenia inhibitora BRAF. Na podstawie otrzymanych wyników nie można jednak potwierdzić udziału aktywacji kinazy ERK w obserwowanej toksyczności naczyniowej dabrafenibu *ex vivo*.

Wydaje się, że mechanizmy odpowiedzialne za różne efekty działania dabrafenibu i trametynibu na śródbłonek naczyniowy mogą również być wynikiem niespecyficznych interakcji z innymi niż docelowe białkami i oddziaływaniem na inne szlaki sygnałowe, na co wskazywali także Klaeger i wsp. którzy zbadali wpływ różnych inhibitorów na aktywność kinaz w lizatach białkowych komórek nowotworowych (154). Autorzy wykazali, że dabrafenib oprócz nieprawidłowego białka BRAF (w komórkach z mutacją genu *BRAF*) w równym stopniu hamuje jego prawidłową formę oraz pozostałe białka z rodziny RAF, a także około 30 innych kinaz (154).

Aby zweryfikować tę hipotezę, zbadano działanie dabrafenibu i trametynibu oraz ich kombinacji na szeroki panel kinaz serynowo-treoninowych z wykorzystaniem innowacyjnej technologii PamGene. W oparciu o analizę fosforylacji substratów kinaz, świadczącej o aktywacji specyficznych kinaz w aortach inkubowanych z dabrafenibem, uzyskano zaskakujące wyniki. Dabrafenib spowodował aktywację wielu różnych kinaz, zamiast spodziewanego zahamowania aktywności kinaz związanych z mechanizmem działania tego leku. Wynik ten potwierdził niespecyficzne działanie dabrafenibu na liczne kinazy, inne niż BRAF, które to działanie mogło być odpowiedzialne za upośledzenie czynności śródbłonka wywołane przez dabrafenib. Z kolei w aortach inkubowanych z samym trametynibem zaobserwowano niewielki efekt (1 miejsce fosforylacji). Ze względu na fakt, że zmniejszenie aktywności kinaz z panelu STK, uznaje się za istotne jeżeli wskazuje na to co najmniej 8 istotnych miejsc fosforylacji, tego typu wyniki i analizę UKA należy interpretować ostrożnie,

a obserwowany efekt trametynibu ma niski poziom istotności statystycznej. Zatem większe znaczenie wydają się mieć wyniki uzyskane dla dabrafenibu.

5.2.3 Aktywność kinazy ROCK a upośledzenie czynności śródbłónka naczyniowego

Aktywowana przez dabrafenib kinaza ROCK2 jest częścią szlaku RhoA/ROCK. Znane są dwie izoformy kinazy ROCK: ROCK1 i ROCK2, które pośredniczą w regulacji różnych funkcji komórkowych takich jak apoptoza, wzrost, migracja, metabolizm, a nawet fagocytoza i uwalnianie cytokin zapalnych (58, 155–158). Opisano związek kinaz ROCK z funkcją śródbłónka naczyniowego, mięśni gładkich oraz czynności mięśnia sercowego (159–161). Wykazano, że aktywność kinaz ROCK jest podwyższona w zaburzeniach układu sercowo-naczyniowego i związana z procesami patologicznymi, takimi jak niedokrwienie mięśnia sercowego, przerost serca, włóknienie serca, zaburzenia ciśnienia krwi i nadciśnienie płucne (58, 155, 162).

W komórkach mięśni gładkich kinazy ROCK odgrywają główną rolę w generowaniu kurczliwości aktyny i miozyny oraz w regulacji dynamiki cytoszkieletu aktynowego poprzez fosforylację różnych białek, takich jak łańcuch lekki miozyny (MLC), kinazy LIM, adducyny, czy białka ERM (ang. ezrin, radixin, moesin) (161). Kinaza ROCK reguluje fosforylację MLC także pośrednio poprzez hamowanie aktywności fosfatazy MLCP. Ponadto, aktywacja ROCK powoduje zwiększenie wrażliwości komórek mięśni gładkich na wapń, co sprzyja ich kurczliwości (155). Co ciekawe, podobne zmiany kurczliwości mięśni gładkich powoduje aktywacja kinazy białkowej A (PKA) (163, 164), której podwyższona aktywność także była stwierdzona w krążkach aorty inkubowanych z dabrafenibem. Obserwowane zmiany kurczliwości krążków aorty inkubowanych z dabrafenibem mogą mieć zatem związek z aktywacją tych kinaz.

Wiele prac wskazuje na rolę szlaku RhoA/ROCK w funkcjonowaniu śródbłónka naczyniowego. Rho/ROCK negatywnie reguluje funkcję śródbłónka na poziomie ekspresji i aktywacji eNOS za pośrednictwem dwóch odrębnych mechanizmów (155). Pierwszym jest regulowanie ekspresji eNOS na poziomie mRNA poprzez zmniejszanie stabilności mRNA eNOS za pośrednictwem zmian cytoszkieletu aktynowego (165). Drugi wpływa na jego aktywność, gdyż wykazano, że hamowanie szlaku Rho/ROCK prowadzi do szybkiej fosforylacji i aktywacji eNOS poprzez szlak zależny od PI3K/AKT (166). Wykazano ponadto, że prozapalny mediator lipidowy kwas lizofosfatydowy (LPA) aktywuje szlak ROCK w ludzkich komórkach śródbłónka, który może pośredniczyć w indukowaniu ekspresji IL-8

i MCP-1 (167). Hamowanie ROCK może zapobiegać ekspresji ICAM-1, hamować aktywność czynnika jądrowego NF- κ B (168), oraz obniżać ekspresję czynnika tkankowego w komórkach śródbłónka co sugeruje, że szlak RhoA/ROCK jest zaangażowany w mechanizm powstawania zakrzepu (169). Wykazano także, że aktywacja RhoA/ROCK przez białko C-reaktywne zwiększa ekspresję inhibitora aktywatora plazminogenu-1 w śródbłónku (170). Wśród skutków aktywacji kinazy ROCK wymienia się także indukowanie produkcji ROS (171–173), a z drugiej strony aktywacja ROCK może być odpowiedzią na stres oksydacyjny (58). Ponadto ROCK ma też wpływ na przepuszczalność śródbłónka naczyniowego, gdyż podstawowa aktywność kinazy RhoA/ROCK jest niezbędna do regulacji integralności bariery śródbłonkowej, a jej nadmierna aktywacja może prowadzić do dysfunkcji bariery śródbłónka, poprzez omówione wcześniej zmiany cytoszkieletu na skutek fosforylacji kinaz LIM.

W świetle powyższych informacji, aktywacja kinazy ROCK w aortach inkubowanych z dabrafenibem oraz z dabrafenibem w kombinacji z trametynibem, może być przyczyną obserwowanej w tych aortach dysfunkcji śródbłónka naczyniowego i może też pośredniczyć w wielu innych niekorzystnych skutkach działania dabrafenibu na układ sercowo-naczyniowy obserwowanych u pacjentów.

5.2.4 Aktywność kinazy CAMK2 a upośledzenie czynności śródbłónka naczyniowego

W aortach inkubowanych z dabrafenibem wykazano także wzrost aktywności kinaz białkowych zależnych od Ca^{2+} /kalmoduliny (CAMK), w tym wszystkich czterech izoform kinazy CAMK2 (174). Szlak sygnałowy CAMK2 aktywowany jest w odpowiedzi na wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia i reguluje szeroki zakres funkcji komórkowych w różnych typach komórek i tkanek (175), m.in. odgrywa rolę w produkcji glukozy w wątrobie i w szlaku sygnałowym insuliny (176), w progresji cyklu komórkowego (177), czy w funkcji układu odpornościowego (178). W układzie nerwowym sygnalizacja CAMK2 moduluje uwalnianie neuroprzekazników i tzw. długotrwałe wzmocnienie (ang. long term potentiation, LTP), które wzmacnia transmisję synaptyczną między neuronami, a deregulacja tego szlaku jest powiązana z chorobami neurodegeneracyjnymi (179–181). Z kolei w sercu sygnalizacja CAMK2, wpływając na gospodarkę wapniową i sprzężenie pobudzenia i skurczu, moduluje częstość akcji serca i kurczliwość mięśnia sercowego, co jest istotne dla prawidłowej funkcji serca. Aktywacja CAMK2 wpływa na funkcję kanałów wapniowych i wrażliwość włókien mięśniowych serca na jony wapnia (182, 183). Nadmierna aktywacja kinaz CAMK2 może prowadzić do zmiany sygnalizacji wapniowej w kardiomiocytach, powodując w rezultacie

zaburzenia rytmu serca, a także do szkodliwej przebudowy serca, wpływając na procesy takie jak przerost i apoptoza. Rola CAMK2 jest dobrze udokumentowana w patofizjologii kilku powszechnych chorób serca takich jak przerost serca, arytmie komorowe, migotanie przedsionków, niewydolność serca, a także kardiomiopatia cukrzycowa (184–188). Co ciekawe, u pacjentów onkologicznych z mutacjami KRAS i BRAF stwierdzono, że wysoki poziom wapnia w surowicy był negatywnym czynnikiem prognostycznym (189). Utrata homeostazy Ca^{2+} uznawana jest za ważną siłę napędową postępu chorób nowotworowych (190). Pompa Ca^{2+} PMCA4b pomaga w usuwaniu jonów Ca^{2+} z komórek, co zmniejsza migrację i potencjał metastatyczny komórek nowotworowych. Wykazano, że w komórkach czerniaka z mutacją BRAF poziom PMCA4b jest niski, ale znacznie wzrasta po leczeniu inhibitorem BRAF vemurafenibem (191, 192).

Szeroko opisana w literaturze jest także rola CAMK2 w fizjologii naczyń krwionośnych, w tym w regulacji ciśnienia krwi, napięcia naczyniowego, jak i w przebudowie naczyń po urazie. CAMK2 pomaga utrzymać homeostazę wewnątrzkomórkową Ca^{2+} w komórkach mięśni gładkich naczyń, ale nie jest wymagany do wywołanego agonistą skurczu naczyń (175, 193). Liczne badania potwierdzają koncepcję, że przewlekła aktywacja CAMK2 występuje w różnych chorobach układu krążenia, jednak dane dotyczące roli CAMK2 w regulacji aktywności eNOS są sprzeczne (194). Niektóre badania sugerują, że CAMK2 bezpośrednio reguluje produkcję NO poprzez fosforylację eNOS (195, 196) i może pośredniczyć w rozkurczu naczyń (197), podczas gdy Murthy i in. wykazali, że zahamowanie CAMK2 w komórkach śródbłónka nie zmniejsza zależnego od NO rozkurczu naczyń krwionośnych (194). W świetle tych doniesień trudno z całą pewnością stwierdzić, że wywołana dabrafenibem dysfunkcja śródbłónka jest następstwem obserwowanej aktywacji CAMK2. W celu bezpośredniego potwierdzenia tej hipotezy, przeprowadzono więc interwencje farmakologiczne z użyciem inhibitorów CAMK2, co omówiono szerzej w dalszej części dyskusji.

5.2.5 Dabrafenib a stres oksydacyjny i metabolizm komórkowy

Jedną z postawionych w niniejszej pracy hipotez wynikających z uzyskanych wyników jest postulowany udział zwiększenia produkcji ROS w dysfunkcji śródbłónka wywołanej przez dabrafenib. W badaniach *in vitro* wielokrotnie wykazano, że inhibitory BRAF indukują produkcję ROS w komórkach czerniaka (198, 199). Natomiast w przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej badaniach nie udało się zmierzyć ROS w inkubowanych z dabrafenibem

aortach, jednak wyniki przeprowadzonych badań pośrednio wskazują na ich zwiększoną produkcję.

Wykorzystując ostatnio opracowaną przez zespół JCET metodologię badania profilu czynnościowych odpowiedzi metabolicznych w niewielkich krążkach izolowanej aorty mysiej (57) wykazano, że dabrafenib wywoływał zwiększenie poziomu podstawowej konsumpcji tlenu oraz nieznaczne podwyższenie poziomu konsumpcji tlenu sprzężonej z produkcją ATP i glikolizy, co świadczy o aktywacji metabolizmu komórkowego w aorcie pod wpływem dabrafenibu. Dabrafenib sam, jak i w kombinacji z trametynibem, spowodował ponadto istotny wzrost przecieku protonów w krążkach aorty, co może być wynikiem aktywnego mechanizmu kompensacyjnego, na przykład w odpowiedzi na nadmierną produkcję ROS przez łańcuch mitochondrialny (200). Wykazano, że wyciek protonów zmniejsza wytwarzanie ROS, natomiast ROS indukują wyciek jonów H^+ , co sugeruje istnienie pętli sprzężenia zwrotnego między ROS, a wyciekami H^+ (201). W komórkach nowotworowych dabrafenib wywoływał zmiany czynności mitochondriów takie jak: rozprężenie łańcucha mitochondrialnego, spadek potencjału mitochondrialnego i wzrost ROS (199, 202), więc ta hipoteza wydaje się prawdopodobna, ale wymaga doświadczalnego potwierdzenia, co do znaczenia tych mechanizmów w naczyniach krwionośnych i ich udziale w wywoływaniu dysfunkcji śródbłonna przez dabrafenib.

Warto także zwrócić uwagę na związek omówionej wcześniej kinazy CAMK2 i sygnalizacji wapniowej z produkcją ROS w komórkach. Interakcje między ROS, a sygnalizacją wapniową uważa się za dwukierunkowe. ROS regulują sygnalizację komórkową zależną od jonów Ca^{2+} oraz powodują uwalnianie Ca^{2+} z retikulum endoplazmatycznego, co prowadzi do aktywacji CAMK2 (203, 204). Nasilenie sygnalizacji zależnej od jonów Ca^{2+} jest ściśle związane z nadmierną produkcją ROS. W szczególności, w mitochondriach zwiększone stężenie jonów wapnia stymuluje aktywność łańcucha transportu elektronów, co prowadzi do większego uwalniania reaktywnych form tlenu (205). Ponadto, zmiany w komunikacji między ROS i Ca^{2+} mogą prowadzić do zaburzenia bioenergetyki mitochondrialnej i w konsekwencji do uszkodzeń tkanek o dużym zapotrzebowaniu na energię, takich jak serce (205). Są także dowody, że CAMK2 reguluje produkcję ROS przez oksydazę NADPH. Opisano m.in. aktywację CAMK2 w cukrzycy, której następstwem jest produkcja ROS przez NOX2, co może przyczyniać się do dalszej aktywacji CAMK2 (206). Aktywność NOX5, także jest zależna od CAMK2 i jest regulowana przez wewnątrzkomórkowy poziom

jonów wapnia (207). Co ciekawe, NOX5 jest również aktywowana przez kinazę PKC α (208), której aktywność także była zwiększona w aortach inkubowanych z dabrafenibem.

Mimo, że nie zbadano produkcji ROS w aortach inkubowanych z dabrafenibem, opisane powyżej mechanizmy jak i literatura naukowa silnie przemawiają za udziałem ROS w indukowaniu przez dabrafenib dysfunkcji śródbłonna. Dlatego przeprowadzono interwencje farmakologiczne, omówione w dalszej części dyskusji, z użyciem przeciwutleniaczy o różnych mechanizmach działania.

5.2.6 Aktywacja kinaz jako kompensacyjna odpowiedź komórek śródbłonna na działanie dabrafenibu

We wspomnianych już badaniach *in vitro*, Bromberger i wsp., z wykorzystaniem fosfoproteomiki opartej na spektrometrii mas, wykazali zmianę aktywności szeregu kinaz w komórkach śródbłonna DMEC po 1 godzinie inkubacji z dabrafenibem. Wykazali oni zarówno zahamowanie kinaz szlaku MAPK, czyli docelowego szlaku dla inhibitorów BRAF, ale także zahamowanie aktywności szeregu innych kinaz, m.in. kilku CDK i GSK3- α/β , potwierdzając tym samym niespecyficzne działanie dabrafenibu (134). Jednocześnie autorzy wykazali równoczesną aktywację kilkunastu kinaz, z których część pokrywa się z kinazami, których aktywację stwierdzono w aortach inkubowanych z dabrafenibem przez 24 godziny, takich jak: PRKACA (PKA), AKT, kinazy z rodziny RSK, PKC, PKG i CAMK2 (134). Być może obserwowana w przeprowadzonych badaniach tej pracy doktorskiej aktywacja licznych kinaz, przy jednoczesnym braku zahamowania docelowego szlaku MAPK przez dabrafenib, jest wynikiem dłuższego czasu (24 godziny) inkubacji z lekiem niż w pracy Bromberger i wsp (134), przez co obserwujemy w dużej mierze wtórną, kompensacyjną reakcję komórek, na wywołane wcześniej przez dabrafenib zmiany sygnalizacyjne w aorcie. Dla przykładu, kinazy PKA i PKG, aktywowane przez cykliczne nukleotydowe przekaźniki wtórne (odpowiednio cAMP i cGMP), regulują kurczliwość mięśni gładkich naczyń i ciśnienie krwi poprzez modulację wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia (209), a także aktywują eNOS poprzez fosforylację seryny 1177 (210). Kinazy te mają jednak także inny mechanizm regulujący ich aktywność. Są one wrażliwe na reakcje redoks i mogą być aktywowane niezależnie od stymulacji cyklicznymi nukleotydami przez utleniacze komórkowe. Działają więc one jak „czujniki utleniania”, zatem ich aktywacja może być odpowiedzią na zwiększoną produkcję ROS w komórkach (209), podobnie jak omówiona wcześniej aktywacja ROCK i CAMK.

5.3 FARMAKOLOGICZNE STRATEGIE PRZECIWDZIAŁANIA DYSFUNKCJI ŚRÓDBŁONKA WYWOŁANEJ PRZEZ DABRAFENIB

W ostatniej serii doświadczeń przeprowadzonych w przedstawionej pracy doktorskiej podjęto próbę farmakologicznego przeciwdziałania wywołanej przez dabrafenib dysfunkcji śródbłonna w modelu izolowanej aorty *ex vivo*. W oparciu o wyniki badań, wybrano inhibitory kinaz ROCK i CAMK2 oraz przeciwutleniacze o różnych mechanizmach działania.

5.3.1 Działanie fasudilu – inhibitora kinazy ROCK na czynność śródbłonna naczyniowego

Istnieją dane w literaturze sugerujące, że hamowanie kinazy ROCK jest atrakcyjnym celem terapeutycznym w chorobach układu sercowo-naczyniowego. Wykazano, że hamowanie kinazy ROCK przez statyny lub selektywne inhibitory ROCK prowadzi do zwiększenia aktywności syntazy tlenu azotu śródbłonna (eNOS), zmniejszenia stanu zapalnego naczyń i zmniejszenia powstawania blaszek miażdżycowych (155, 159). Najczęściej używanym w badaniach podstawowych inhibitorem kinaz ROCK jest fasudil, który jest także pierwszym zatwierdzonym inhibitorem ROCK do użytku klinicznego. Działanie fasudilu polega na hamowaniu ROCK poprzez blokowanie wiązania ATP z kinazą (160, 211, 212). Co istotne, fasudil jest niespecyficznym inhibitorem obu izoform ROCK, ale ma również działanie hamujące na kinazy białkowe PKA, PKC i PKG, których aktywację przez dabrafenib także wykazała analiza profilu aktywności kinaz PamGene. W przeprowadzonych badaniach *ex vivo* fasudil tylko częściowo przeciwdziałał upośledzeniu produkcji NO w krążkach aorty inkubowanych z dabrafenibem, natomiast istotnie hamował zwiększoną kurczliwość aorty w odpowiedzi na KCl. Być może obserwowane działanie fasudilu na poprawę odpowiedzi rozkurczowych w izolowanych krążkach aorty wynika głównie z działania tego inhibitora na mięśnie gładkie naczyń. Poza działaniem na aktywność kinaz, fasudil jest także silnym antagonistą kanału Ca^{2+} , co może być przyczyną jednego ze skutków ubocznych fasudilu u pacjentów, którym jest silne obniżanie ciśnienie krwi. Nie można wykluczyć, że ten niezależny od hamowania kinaz ROCK mechanizm działania fasudilu miał znaczenie w regulacji kurczliwości aorty (211).

5.3.2 Ochronne działanie inhibitorów CAMK2 na czynności śródbłónka naczyniowego

W poszukiwaniu skutecznego inhibitora CAMK2 zastosowano związek KN-93, który jest najczęściej stosowany w badaniach nad funkcją CAMK2. Obecnie uważa się, że KN-93 nie jest inhibitorem CAMK2 *per se*, ale raczej antagonistą kalmoduliny, który działa poprzez blokowanie wiązania wapnia/kalmoduliny ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) do domeny regulacyjnej kinazy (62). Badania w różnych modelach zwierzęcych wykazały potencjalną skuteczność związku KN-93 w chorobie Parkinsona, niedokrwieniu mózgu, niedotlenieniu, czy zapaleniu trzustki. W tym ostatnim KN-93 ma działanie ochronne na komórki zrazikowe trzustki poprzez hamowanie produkcji ROS i ekspresji kompleksów martwiczych (RIP3 i p-MLKL) (213). Co ciekawe, w przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej badaniach, KN-93 przeciwdziałał upośledzeniu czynności śródbłónka wywołanemu przez dabrafenib, ale nie miał wpływu na produkcję NO w aortach. Należy podkreślić, że KN-93 jest nieselektywnym inhibitorem kinazy CAMK2, mającym wpływ także na kanały jonowe takie jak kanały Ca^{2+} i kanały K^{+} zależne od napięcia, oraz na inne kinazy, w tym CAMKI i CAMKIV, przez co jego zastosowanie jest krytykowane przez niektórych badaczy (194, 214). Dla porównania zastosowano także drugi inhibitor CAMK-IN-1, który hamuje działanie kinazy przez zablokowanie jej miejsca wiązania ATP. CAMK-IN-1 silniej niż KN-93 przeciwdziałał dysfunkcji śródbłónka, niemal całkowicie znosząc niekorzystne działanie dabrafenibu, ale tylko w niewielkim stopniu zwiększał produkcję NO w aortach. Mimo, iż CAMK-IN-1 jest uznawany za silny i wysoce selektywny inhibitor CAMK2, wykazuje on także hamujące działanie wobec CAMKIV, MLCK, p38a, AKT1 i PKC (215). Tak szeroki profil hamujący zastosowanych inhibitorów CAMK2 utrudnia interpretację uzyskanych wyników, ale także uniemożliwia zastosowanie tego związku u ludzi. Poszukiwanie inhibitorów CAMK2 pod kątem ich klinicznego zastosowania jest trudne ze względu na wielofunkcyjną naturę CAMK2 oraz różnorodność jej izoform i wariantów splicingowych, które jednak mają 89–93% podobieństwa sekwencji w swoich domenach katalitycznych i autoregulacyjnych (216). Oprócz zaangażowania w mechanizmy chorobowe, kinaza CAMK2 odgrywa także kluczową rolę w regulacji procesów komórkowych i fizjologicznych w różnych tkankach m.in. aktywność CAMK2 odgrywa rolę w uczeniu się i zapamiętywaniu (206). W ciągu ostatniej dekady pojawiło się kilka potencjalnych strategii, w tym małe cząsteczki oraz peptydy i nukleotydy, które rokują nadzieję na rozróżnienie patologicznej i fizjologicznej aktywności CAMK2, co ma kluczowe znaczenie dla opracowania skutecznych terapii (175). Jednak do dziś nie przeprowadzono żadnego badania klinicznego, aby przetestować inhibitory CAMK2

u pacjentów (206). Natomiast w badaniach przesiewowych wśród już zatwierdzonych klinicznie leków zidentyfikowano ruxolitinib, który jest inhibitorem szlaku kinazy JAK stosowanym w leczeniu mielofibrozy, jako inhibitor kinazy CAMK2 zapobiegający arytmii wywołanym przez nadaktywność CAMK2 w modelach mysich, bez negatywnego wpływu na funkcje poznawcze. Jednakże skuteczność ruxolitinibu w hamowaniu CAMK2 w zakresie dawek tolerowanych przez człowieka wymaga jeszcze potwierdzenia (217, 218). W przeprowadzonych badaniach nie stosowano jednak inhibitora JAK do zahamowania CAMK2. Tego typu badania warto przeprowadzić w przyszłości zważywszy, że inhibitory JAK są coraz szerzej stosowanymi lekami w warunkach klinicznych w leczeniu wielu różnych chorób o podłożu zapalnym (219).

5.3.3 Ochronne działanie inhibitorów NOX (apocyniny i setanaxibu) oraz przeciwutleniacza mitochondrialnego (MitoTEMPO) na upośledzenie czynności śródbłonna naczyniowego wywołane przez dabrafenib

Odpowiedni poziom ROS jest niezbędny do zachowania sygnalizacji komórkowej oraz odpowiedzi immunologicznej. Natomiast ich nadmierna produkcja w odpowiedzi na różne bodźce wywołuje stres oksydacyjny i dysfunkcję śródbłonna, które są charakterystyczne dla chorób układu krążenia (220). W śródbłonie i mięśniach gładkich naczyń krwionośnych ekspresji ulegają cztery izoformy oksydazy NADPH (enzymu odpowiedzialnego za produkcję ROS): NOX1, NOX2, NOX4 i NOX5 (221). Specyficzne izoformy NOX odgrywają istotną rolę w przebiegu różnych stanów patologicznych. Przykładowo, NOX1 może powodować powikłania naczyniowe w cukrzycy, takie jak retinopatia. Z kolei izoforma NOX2, choć początkowo łączona głównie z funkcją fagocytów, jest najszerszej występującą izoformą w licznych tkankach i narządach (m.in. w neuronach, kardiomiocytach, hepatocytach, czy mięśniach szkieletowych), gdzie odgrywa istotną rolę w insulinooporności i jest mediatorem stresu oksydacyjnego wywołanego przez angiotensynę II podczas nadciśnienia. Izoformy NOX1, NOX2 i NOX4 biorą udział w inicjowaniu włóknienia wątroby, a NOX4 odgrywa rolę w mediacji sygnalizacji TGF β -1 w rozwoju włóknienia płuc (221, 222). Izoforma NOX5 jest najslabiej zbadaną izoformą oksydazy NADPH ze względu na brak jej ekspresji u gryzoni. Wiadomo jednak, że pełni funkcje zarówno w homeostazie, jak i w stanach chorobowych (221, 223). W przeprowadzonych badaniach sprawdzono zatem wpływ apocyniny, inhibitora izoformy NOX2, o dobrze już przebadanym działaniu i szerokim zastosowaniu u pacjentów (224) oraz setanaxibu (będącego w fazie badań klinicznych

podwójnego inhibitora NOX1/4) (225) na dysfunkcję śródbłonka wywołaną przez dabrafenib. Oba związki w podobnym, ale niewielkim stopniu przeciwdziałały upośledzeniu czynności śródbłonka aorty przez dabrafenib.

Oprócz oksydazy NADPH, istotnym źródłem wolnych rodników w komórkach śródbłonkach są także mitochondria. Antyoksydanty ukierunkowane na mitochondria wykazują skuteczność w łagodzeniu chorób, którym towarzyszy stres oksydacyjny. Przykładem takiego związku jest mitoTEMPO, który jest ukierunkowanym na mitochondria mimetykiem dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) (226). W modelach zwierzęcych wykazano, że związek ten chroni przed uszkodzeniem oksydacyjnym w chorobach takich jak uszkodzenie wątroby wywołane endotoksyną (227), ostre uszkodzenie nerek wywołane sepsą (228), kardiomiopatia cukrzycowa (229), czy nadciśnienie (230). Wykazano także, że mitoTEMPO skutecznie łagodzi kardiotoxyczność wywołaną przez chemioterapeutyk 5-Fluorouracyl (231). Wyniki przeprowadzonych badań w ramach niniejszej pracy doktorskiej wskazują, że mitoTEMPO istotnie poprawiał zależne od śródbłonka odpowiedzi rozkurczowe krążków aorty inkubowanych z dabrafenibem, jednak nie wpływał na produkcję NO w aorcie. Uzyskane wyniki sugerują, że przeciwutleniacze ukierunkowane na mitochondria, takie jak mitoTEMPO, mogą stanowić strategię niwelowania toksyczności wywołanej przez inhibitory BRAF. Jednak dużym wyzwaniem dla tego typu związków jest ryzyko zaburzenia fizjologicznej funkcji mitochondriów i zahamowania protekcyjnego działania ROS w warunkach fizjologicznych (232).

Ponadto, ROS mogą bezpośrednio wpływać na rozwój choroby nowotworowej. Zaburzona homeostaza redoks i wysoki poziom ROS przyczyniają się do rozwoju i progresji chorób nowotworowych, powodując zaburzenia różnych szlaków sygnałowych i przyspieszając procesy takie jak przejście nabłonkowo-mezenchymalne (EndMT) (233). Z drugiej strony ROS mogą wywierać działanie cytotoksyczne wobec komórek nowotworowych w krążeniu, poprzez uruchamianie sygnalizacji śmierci komórkowej po oderwaniu się przerzutujących komórek nowotworowych od macierzy pozakomórkowej (ECM), podczas gdy przeciwutleniacze mogą blokować ten mechanizm i zwiększać częstość przerzutów (234). W tym kontekście, nie są zaskakujące doniesienia że stosowanie u pacjentów onkologicznych suplementów antyoksydacyjnych (witamin A, C i E, karotenoidów, koenzymu Q10), zarówno przed leczeniem jak i w jego trakcie, wiązało się ze zwiększonym ryzykiem nawrotu choroby (235). Należy jednak dodać, że zwiększenie produkcji ROS również może indukować procesy prowadzące do śmierci komórek nowotworowych i, tym samym, może być

jednym z mechanizmów działania niektórych leków chemioterapeutycznych. Cytokosyczny dla komórek nowotworowych poziom ROS może być generowany m.in. przez antracykliny, kompleksy na bazie platyny, czy środki alkilujące (236). Związki antyoksydacyjne mogą hamować toksyczne działanie tych leków na śródbłonek, ale istnieje ryzyko, że jednocześnie mogą zmniejszyć przeciwnowotworową skuteczność tych leków (237). Dlatego tak ważne jest dokładne zrozumienie molekularnych procesów związanych z wytwarzaniem ROS w przebiegu chorób nowotworowych, oraz w fizjologii i patologii naczyń krwionośnych i śródbłonna. Sugeruje się, że farmakologiczne hamowanie ROS i wzmacnianie mechanizmów antyoksydacyjnych oferuje nowe strategie przezwyciężania oporności na inhibitory BRAF i MEK (236). Jednakże w niektórych badaniach przeciwutleniacze stosowane w walce z czerniakiem nie tylko nie zatrzymywały postępu choroby, ale sprzyjały jej progresji (237–39). Zatem u pacjentów z już rozwiniętą opornością na leczenie, biorąc pod uwagę nadprodukcję ROS w komórkach czerniaka opornych na inhibitory BRAF i MEK, strategia terapeutyczna polega na dalszym zwiększaniu produkcji ROS za pomocą leku prooksydacyjnego w połączeniu z hamowaniem BRAF (241). Aspekty te należy wziąć pod uwagę poszukując możliwości ochronnego działania antyoksydantów na śródbłonek naczyniowy i prób ograniczenia niekorzystnego działania inhibitorów BRAF na śródbłonek naczyniowy.

W tym kontekście wyniki niniejszej pracy mogą mieć wartość translacyjną wskazując, że bardziej obiecujące wydają się próby hamowania toksyczności inhibitorów BRAF oparte o inhibitory kinaz CAMK2 oraz, w mniejszym stopniu, hamowanie szlaku zależnego od kinaz ROCK. Wartym sprawdzenia w przyszłości może być także połączenie dwóch różnych strategii przeciwdziałania dysfunkcji śródbłonna wywołanej przez dabrafenib, na przykład jednoczesne zahamowanie aktywności kinaz CAMK2 oraz generacji mitochondrialnych ROS.

6 WNIOSKI

1. W mysim modelu raka gruczołu sutkowego 4T1 dysfunkcja śródbłónka pojawiła się zarówno na wczesnym jak i późnym etapie rozwoju choroby nowotworowej. Wczesna dysfunkcja śródbłónka w płucach wyprzedza rozwój przerzutów i może się przyczyniać do patofizjologii przerzutowości nowotworowej. Natomiast systemowa dysfunkcja śródbłónka naczyniowego jest zależna od rozwoju ogólnoustrojowego stanu zapalnego, pojawia się w późnym etapie choroby nowotworowej i może przyczyniać się do dalszego postępu choroby nowotworowej, jak również może prowadzić do przyspieszonego rozwoju chorób układu krążenia.
2. Inhibitor kinazy BRAF – dabrafenib, wywoływał dysfunkcję śródbłónka naczyniowego w aorcie myszy C57BL/6J *in vivo* obserwowaną już po 6 godzinach od jednorazowego podania, która widoczna była też po 7 dniach podawania tego leku w paszy. Takich efektów nie wywoływał inhibitor kinazy MEK – trametynib. Dysfunkcja śródbłónka naczyniowego była także indukowana przez dabrafenib w warunkach *ex vivo* po 24 godzinach inkubacji aorty w obecności leku. Podobnie jak w warunkach *in vivo*, takiego efektu nie wywoływał trametynib. Można więc sądzić, że za niekorzystne działanie naczyniowe terapii skojarzonej polegającej na zastosowaniu inhibitorów BRAF i MEK (dabrafenib i trametynib), opisywane w literaturze u pacjentów, może odpowiadać dabrafenib.
3. Mechanizm upośledzenia czynności śródbłónka naczyniowego przez dabrafenib związany jest ze zmniejszeniem aktywności eNOS, zwiększeniem produkcji reaktywnych form tlenu, a także zwiększeniem aktywności niektórych kinaz serynowo-treoninowych, w tym szlaków sygnałowych zależnych od kinaz CAMK2 i ROCK. Obserwowany wzrost aktywności licznych kinaz oraz aktywacja energetycznego metabolizmu komórkowego *ex vivo* w aortach inkubowanych z dabrafenibem może też stanowić efekt kompensacyjny w odpowiedzi na toksyczność tego leku na ścianę naczynia krwionośnego albo odpowiedź na zahamowanie wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych i metabolicznych pod wpływem dabrafenibu.

4. Interwencje farmakologiczne hamujące aktywność szlaków sygnałowych zależnych od kinaz CAMK2 i ROCK oraz produkcję ROS w różnym stopniu odwracały dysfunkcję śródbłónka naczyniowego w izolowanej aorcie myszy C57BL/6J wywołaną przez dabrafenib. Wśród przebadanych interwencji farmakologicznych najlepszą strategią ochrony śródbłónka naczyniowego przed niekorzystnym działaniem dabrafenibu wydaje się być zastosowanie inhibitorów kinazy CAMK2.

BIBLIOGRAFIA

1. Umieralność w Polsce. Najczęstsze przyczyny zgonów [Online]. <https://politykazdrowotna.com/arttykul/umieralnosc-w-polsce-najczestsze-przyczyny-zgonow-n832841> [14 Feb. 2025].
2. **Abraham S, Al-Kindi S, Ganatra S.** Tracing the Pathways From Cardiovascular Disease to Cancer: The Unseen Link. *JACC CardioOncology* 5: 441, 2023. doi: 10.1016/J.JACCAO.2023.07.002.
3. **Lyon AR, López-Fernández T, Couch LS, Asteggiano R, Aznar MC, Bergler-Klei J, Boriani G, Cardinale D, Córdoba R, Cosyns B, Cutter DJ, De Azambuja E, De Boer RA, Dent SF, Farmakis D, Gevaert SA, Gorog DA, Herrmann J, Lenihan D, Moslehi J, Moura B, Salinger SS, Stephens R, Suter TM, Szmit S, Tamargo J, Thavendiranathan P, Tocchetti CG, Van Der Meer P, Van Der Pal HJH, Lancellotti P, Thuny F, Abdelhamid M, Aboyans V, Aleman B, Alexandre J, Barac A, Borger MA, Casado-Arroyo R, Cautela J, Čelutkienė J, Cikes M, Cohen-Solal A, Dhiman K, Edvardsen T, Fauchier L, Fradley M, Grapsa J, Halvorsen S, Heuser M, Humbert M, Jaarsma T, Kahan T, Konradi A, Koskinas KC, Kotecha D, Ky B, Landmesser U, Lewis BS, Linhart A, Lip GYH, Lochen ML, Malaczynska-Rajpold K, Metra M, Mindham R, Moonen M, Neilan TG, Nielsen JC, Petronio AS, Prescott E, Salem JE, Savarese G, Sitges M, Ten Berg J, Touyz RM, Tycinska A, Wilhelm M, Zamorano JL, Laredj N, Zelveian P, Rainer PP, Samadov F, Andrushchuk U, Gerber BL, Selimovi M, Kinova E, Samardzic J, Economides E, Pudil R, Nielsen KM, Kafafy TA, Vettus R, Tuohinen S, Ederhy S, Pagava Z, Rassaf T, Briasoulis A, Czuriga D, Andersen KK, Smyth Y, Iakobishvili Z, Parrini I, Rakisheva A, Pruthi EP, Mirzakhimov E, Kalejs O, Skouri H, Benlamin H, Žaliaduonyte D, Iovino A, Moore AM, Bursacovschi D, Benyass A, Manintveld O, Bosevski M, Gulati G, Leszek P, Fiuza M, Jurcut R, Vasyuk Y, Foscoli M, Simic D, Slanina M, Lipar L, Martín-García A, Hübner L, Kurmann R, Alayed A, Abid L, Zorkun C, Nesukay E, Manisty C, Srojdinova N, Baigent C, Antoniou S, Arbelo E, Baumbach A, Čelutkienė J, Collet JP, Falk V, Gale CP, Iung B, Petersen SE.** 2022 ESC Guidelines on cardio-oncology developed in collaboration with the European Hematology Association (EHA), the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ESTRO) and the International Cardio-Oncology Society (IC-OS). *Eur Heart J* 43: 4229–4361, 2022. doi: 10.1093/eurheartj/ehac244.
4. **Al-Kindi SG, Oliveira GH.** Prevalence of Preexisting Cardiovascular Disease in Patients With Different Types of Cancer: The Unmet Need for Onco-Cardiology. *Mayo Clin Proc* 91: 81–83, 2016. doi: 10.1016/J.MAYOCP.2015.09.009.
5. **Koene RJ, Prizment AE, Blaes A, Konety SH.** Shared risk factors in cardiovascular disease and cancer. *Circulation* 133: 1104–1114, 2016. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020406/ASSET/FC31D16D-FE8A-4A22-BE45-F33F97E09319/ASSETS/GRAPHIC/1104FIG01.JPEG.
6. **Wilcox NS, Amit U, Reibel JB, Berlin E, Howell K, Ky B.** Cardiovascular disease and cancer: shared risk factors and mechanisms. *Nat Rev Cardiol* 2024 219 21: 617–631, 2024. doi: 10.1038/s41569-024-01017-x.

7. **de Boer RA, Hulot JS, Tocchetti CG, Aboumsallem JP, Ameri P, Anker SD, Bauersachs J, Bertero E, Coats AJS, Čelutkienė J, Chioncel O, Dodion P, Eschenhagen T, Farmakis D, Bayes-Genis A, Jäger D, Jankowska EA, Kitsis RN, Konety SH, Larkin J, Lehmann L, Lenihan DJ, Maack C, Moslehi JJ, Müller OJ, Nowak-Sliwinska P, Piepoli MF, Ponikowski P, Pudil R, Rainer PP, Ruschitzka F, Sawyer D, Seferovic PM, Suter T, Thum T, van der Meer P, Van Laake LW, von Haehling S, Heymans S, Lyon AR, Backs J.** Common mechanistic pathways in cancer and heart failure. A scientific roadmap on behalf of the Translational Research Committee of the Heart Failure Association (HFA) of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur J Heart Fail* 22: 2272, 2020. doi: 10.1002/EJHF.2029.
8. **Sun HJ, Wu ZY, Nie XW, Bian JS.** Role of Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Link Between Inflammation and Hydrogen Sulfide. *Front Pharmacol* 10: 1568, 2020. doi: 10.3389/FPHAR.2019.01568.
9. **Aird WC.** Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* 100: 158–173, 2007. doi: 10.1161/01.RES.0000255691.76142.4A.
10. **Wakasugi R, Suzuki K, Kaneko-Kawano T.** Molecular Mechanisms Regulating Vascular Endothelial Permeability. *Int J Mol Sci* 2024, Vol 25, Page 6415 25: 6415, 2024. doi: 10.3390/IJMS25126415.
11. **Wang M, Feng J, Zhou D, Wang J.** Bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial activation and dysfunction: a new predictive and therapeutic paradigm for sepsis. *Eur J Med Res* 2023 281 28: 1–16, 2023. doi: 10.1186/S40001-023-01301-5.
12. **Reymond N, d'Água BB, Ridley AJ.** Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat Rev Cancer* 13: 858–870, 2013. doi: 10.1038/nrc3628.
13. **Walczak M, Suraj J, Kus K, Kij A, Zakrzewska A CS.** Towards a comprehensive endothelial biomarkers profiling and endothelium-guided pharmacotherapy. *Pharmacol Rep* 67: 771–7, 2015. doi: 10.1016/j.pharep.2015.06.008.
14. **Claesson-Welsh L, Dejana E, McDonald DM.** Permeability of the Endothelial Barrier: Identifying and Reconciling Controversies. *Trends Mol Med* 27: 314–331, 2021. doi: 10.1016/J.MOLMED.2020.11.006.
15. **Daiber A, Chlopicki S.** Revisiting pharmacology of oxidative stress and endothelial dysfunction in cardiovascular disease: Evidence for redox-based therapies. *Free Radic Biol Med* 157: 15–37, 2020. doi: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2020.02.026.
16. **Morganti M, Carpi a, Nicolini a, Gorini I, Glaviano B, Fini M, Giavaresi G, Mittermayer C, Giardino R.** Atherosclerosis and cancer: common pathways on the vascular endothelium. [Online]. *Biomed Pharmacother* 56: 317–24, 2002. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12418578>.
17. **Smeda M, Grosicki M, Chlopicki S.** Local and systemic endothelial cell response to cancer: RKIP-mimetic therapy and endothelial safety. Elsevier Inc.
18. **Zhang R, Yao Y, Gao H, Hu X.** Mechanisms of angiogenesis in tumour. *Front Oncol* 14: 1359069, 2024. doi: 10.3389/FONC.2024.1359069/BIBTEX.
19. **Roblek M, Calin M, Schlesinger M, Stan D, Zeisig R, Simionescu M, Bendas G,**

- Borsig L.** Targeted delivery of CCR2 antagonist to activated pulmonary endothelium prevents metastasis. *J Control Release* 220: 341–347, 2015. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.10.055.
20. **Schlesinger M BG.** Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)--an increasing insight into its role in tumorigenicity and metastasis. *Int J Cancer* 136: 2504–14, 2015. doi: 10.1002/ijc.28927.
 21. **Franses JW, Drosu NC, Gibson WJ, Chitalia VC, Edelman ER.** Dysfunctional endothelial cells directly stimulate cancer inflammation and metastasis. *Int J Cancer* 133: 1334–44, 2013. doi: 10.1002/ijc.28146.
 22. **Kourti M, Jiang WG, Cai J.** Aspects of Carbon Monoxide in Form of CO-Releasing Molecules Used in Cancer Treatment: More Light on the Way. *Oxid Med Cell Longev* 2017, 2017. doi: 10.1155/2017/9326454.
 23. **Stojak M, Kaczara P, Motterlini R, Chlopicki S.** Modulation of cellular bioenergetics by CO-releasing molecules and NO-donors inhibits the interaction of cancer cells with human lung microvascular endothelial cells. *Pharmacol Res* 136: 160–171, 2018. doi: 10.1016/J.PHRS.2018.09.005.
 24. **Honn K, Cicone B, Skoff A.** Prostacyclin: a potent antimetastatic agent. *Science (80-)* 212: 1270–1272, 1981. doi: 10.1126/science.7015512.
 25. **Schneider MR, Tang DG, Schirner M, Honn K V.** Prostacyclin and its analogues: antimetastatic effects and mechanisms of action. [Online]. *Cancer Metastasis Rev* 13: 349–64, 1994. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7712596>.
 26. **Blazejczyk A, Papiernik D, Porshneva K, Sadowska J, Wietrzyk J.** Endothelium and cancer metastasis: Perspectives for antimetastatic therapy. *Pharmacol Reports* 67: 711–718, 2015. doi: 10.1016/J.PHAREP.2015.05.014.
 27. **Blazejczyk A, Switalska M, Chlopicki S, Marcinek A, Gebicki J, Nowak M, Nasulewicz-Goldeman A, Wietrzyk J.** 1-methylnicotinamide and its structural analog 1,4-dimethylpyridine for the prevention of cancer metastasis. *J Exp Clin Cancer Res* 35: 110, 2016. doi: 10.1186/s13046-016-0389-9.
 28. **Pacholczak LR, Pacholczak R, Dropiński J, Walocha J, Musiał J.** Anti-cancer agents and endothelium. *Oncol Clin Pract* 14: 249–256, 2018. doi: 10.5603/OCP.2018.0032.
 29. **Wojcik T, Buczek E, Majzner K, Kolodziejczyk A, Miszczyk J, Kaczara P, Kwiatek W, Baranska M, Szymonski M, Chlopicki S.** Comparative endothelial profiling of doxorubicin and daunorubicin in cultured endothelial cells. *Toxicol In Vitro* 29: 512–21, 2015. doi: 10.1016/j.tiv.2014.12.009.
 30. **Zhang S, Liu X, Bawa-Khalfe T, Lu LS, Lyu YL, Liu LF, Yeh ETH.** Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med* 2012 1811 18: 1639–1642, 2012. doi: 10.1038/nm.2919.
 31. **Bosman M, Krüger D, Van Assche C, Boen H, Neutel C, Favere K, Franssen C, Martinet W, Roth L, De Meyer GRY, Cillero-Pastor B, Delrue L, Heggermont W, Van Craenenbroeck EM, Guns PJ.** Doxorubicin-induced cardiovascular toxicity: a longitudinal evaluation of functional and molecular markers. *Cardiovasc Res* 119:

- 2579, 2023. doi: 10.1093/CVR/CVAD136.
32. **Abdul-Rahman T, Dunham A, Huang H, Bukhari SMA, Mehta A, Awuah WA, Ede-Imafidon D, Cantu-Herrera E, Talukder S, Joshi A, Sundlof DW, Gupta R.** Chemotherapy Induced Cardiotoxicity: A State of the Art Review on General Mechanisms, Prevention, Treatment and Recent Advances in Novel Therapeutics. *Curr Probl Cardiol* 48: 101591, 2023. doi: 10.1016/J.CPCARDIOL.2023.101591.
 33. **Gao F, Xu T, Zang F, Luo Y, Pan D.** Cardiotoxicity of Anticancer Drugs: Molecular Mechanisms, Clinical Management and Innovative Treatment. *Drug Des Devel Ther* 18: 4089–4116, 2024. doi: 10.2147/DDDT.S469331.
 34. **Shandilya M, Sharma S, Das PP, Charak S, Shandilya M, Sharma S, Das PP, Charak S.** Molecular-Level Understanding of the Anticancer Action Mechanism of Anthracyclines. .
 35. **Murabito A, Hirsch E, Ghigo A.** Mechanisms of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: Is Mitochondrial Dysfunction the Answer? *Front Cardiovasc Med* 7: 514102, 2020. doi: 10.3389/FCVM.2020.00035/BIBTEX.
 36. **Bisht A, Avinash D, Sahu KK, Patel P, Das Gupta G, Kurmi B Das. A** comprehensive review on doxorubicin: mechanisms, toxicity, clinical trials, combination therapies and nanoformulations in breast cancer. *Drug Deliv Transl Res* 2024 151 15: 102–133, 2024. doi: 10.1007/S13346-024-01648-0.
 37. **Hanna AD, Lam A, Tham S, Dulhunty AF, Beard NA.** Adverse effects of doxorubicin and its metabolic product on cardiac RyR2 and SERCA2A. *Mol Pharmacol* 86: 438–449, 2014. doi: 10.1124/mol.114.093849.
 38. **Gambardella V, Tarazona N, Cejalvo JM, Lombardi P, Huerta M, Roselló S, Fleitas T, Roda D, Cervantes A.** Personalized Medicine: Recent Progress in Cancer Therapy. *Cancers (Basel)* 12, 2020. doi: 10.3390/CANCERS12041009.
 39. **Sayed N, Ameen M, Wu JC.** Personalized medicine in cardio-oncology: The role of induced pluripotent stem cell. *Cardiovasc Res* 115: 949–959, 2019. doi: 10.1093/CVR/CVZ024.
 40. **Campia U.** Vascular effects of cancer treatments. *Vasc Med (United Kingdom)* 25: 226–234, 2020. doi: 10.1177/1358863X20914978.
 41. **Banks M, Crowell K, Proctor A, Jensen BC.** Cardiovascular Effects of the MEK Inhibitor, Trametinib: A Case Report, Literature Review, and Consideration of Mechanism. *Cardiovasc Toxicol* 17: 487–493, 2017. doi: 10.1007/s12012-017-9425-z.
 42. **Puskiel A, Noé G, Bellesoeur A, Kramkimel N, Paludetto MN, Thomas-Schoemann A, Vidal M, Goldwasser F, Chatelut E, Blanchet B.** Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Dabrafenib. *Clin Pharmacokinet* 58: 451–467, 2019. doi: 10.1007/s40262-018-0703-0.
 43. **Manzano JL, Layos L, Bugés C, De los Llanos Gil M, Vila L, Martínez-Balibrea E, Martínez-Cardús A.** Resistant mechanisms to BRAF inhibitors in melanoma. *Ann Transl Med* 4: 1–9, 2016. doi: 10.21037/atm.2016.06.07.
 44. **Spagnolo F, Ghiorzo P, Queirolo P.** Overcoming resistance to BRAF inhibition in

- BRAF-mutated metastatic melanoma. *Oncotarget* 5: 10206–10221, 2014. doi: 10.18632/oncotarget.2602.
45. **Subbiah V, Baik C, Kirkwood JM.** Clinical Development of BRAF plus MEK Inhibitor Combinations. *Trends in Cancer* 6: 797–810, 2020. doi: 10.1016/j.trecan.2020.05.009.
 46. **Mincu RI, Mahabadi AA, Michel L, Mrotzek SM, Schadendorf D, Rassaf T, Totzeck M.** Cardiovascular Adverse Events Associated with BRAF and MEK Inhibitors: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw Open* 2: 1–13, 2019. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2019.8890.
 47. **Fedorowicz A, Buczek E, Mateuszuk L, Czarnowska E, Sitek B, Jasztal A, Chmura-Skirińska A, Dib M, Steven S, Daiber A, Chlopicki S.** Comparison of Pulmonary and Systemic NO- and PGI₂-Dependent Endothelial Function in Diabetic Mice. *Oxid Med Cell Longev* 2018: 4036709, 2018. doi: 10.1155/2018/4036709.
 48. **Hogg N.** Detection of nitric oxide by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Free Radic Biol Med* 49: 122–9, 2010. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.009.
 49. **Bar A, Skórka T, Jasiński K, Sternak M, Bartel Ż, Tyrankiewicz U, Chlopicki S.** Retrospectively gated MRI for in vivo assessment of endothelium-dependent vasodilatation and endothelial permeability in murine models of endothelial dysfunction. *NMR Biomed* 29: 1088–1097, 2016. doi: 10.1002/NBM.3567.
 50. **Livak KJ, Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402–408, 2001. doi: 10.1006/METH.2001.1262.
 51. **Dikalov S, Fink B.** *ESR Techniques for the Detection of Nitric Oxide in Vivo and in Tissues*. 2004.
 52. **Lucas R, Xu S, Kelley EE, Chlopicki S, Proniewski B, Czarny J, Khomich TI, Kus K, Zakrzewska A, Chlopicki S.** Immuno-Spin Trapping-Based Detection of Oxidative Modifications in Cardiomyocytes and Coronary Endothelium in the Progression of Heart Failure in Tgαq*44 Mice. *Front Immunol* 9: 938, 2018. doi: 10.3389/FIMMU.2018.00938.
 53. **Pandian K, Huang L, Junaid A, Harms A, van Zonneveld AJ, Hankemeier T.** Tracer-based metabolomics for profiling nitric oxide metabolites in a 3D microvessels-on-chip model. *FASEB J* 38, 2024. doi: 10.1096/FJ.202400553R.
 54. **Noga MJ, Dane A, Shi S, Attali A, van Aken H, Suidgeest E, Tuinstra T, Muilwijk B, Coulier L, Luider T, Reijmers TH, Vreeken RJ, Hankemeier T.** Metabolomics of cerebrospinal fluid reveals changes in the central nervous system metabolism in a rat model of multiple sclerosis. *Metabolomics* 8: 253–263, 2012. doi: 10.1007/S11306-011-0306-3.
 55. **Smeda M, Jasztal A, Maleki EH, Bar A, Sternak M, Kwiatkowski G, Suraj-Prażmowska J, Proniewski B, Kieronska-Rudek A, Wojnar-Lason K, Skrzypek K, Majka M, Chrabaszcz K, Malek K, Chlopicki S.** Endothelial-mesenchymal transition induced by metastatic 4T1 breast cancer cells in pulmonary endothelium in aged mice. *Front Mol Biosci* 9, 2022. doi: 10.3389/FMOLB.2022.1050112.

56. **Chirumamilla CS, Fazil MHUT, Perez-Novo C, Rangarajan S, de Wijn R, Ramireddy P, Verma NK, Vanden Berghe W.** Profiling Activity of Cellular Kinases in Migrating T-Cells. *Methods Mol Biol* 1930: 99–113, 2019. doi: 10.1007/978-1-4939-9036-8_13.
57. **Karaś A, Bar A, Pandian K, Jasztal A, Kuryłowicz Z, Kutryb-Zajac B, Buczek E, Rocchetti S, Mohaissen T, Jędrzejewska A, Harms AC, Kaczara P, Chłopicki S, Karaś A, Bar · A, Jasztal · A, Kuryłowicz · Z, Buczek · E, Rocchetti · S, Mohaissen · T, Kaczara · P, Chłopicki S, Pandian K, Harms · A C, Kutryb-Zajac B, Jędrzejewska · A.** Functional deterioration of vascular mitochondrial and glycolytic capacity in the aortic rings of aged mice. 1: 3831–3844, 123AD. doi: 10.1007/s11357-024-01091-6.
58. **Noma K, Kihara Y, Higashi Y.** Striking crosstalk of ROCK signaling with endothelial function. *J Cardiol* 60: 1–6, 2012. doi: 10.1016/J.JJCC.2012.03.005.
59. **Reyes Gaido OE, Nkashama LJ, Schole KL, Wang Q, Umapathi P, Mesubi OO, Konstantinidis K, Luczak ED, Anderson ME.** CaMKII as a Therapeutic Target in Cardiovascular Disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 63: 249–272, 2023. doi: 10.1146/ANNUREV-PHARMTOX-051421-111814.
60. **Buczek E, Denslow A, Mateuszuk L, Proniewski B, Wojcik T, Sitek B, Fedorowicz A, Jasztal A, Kus E, Chmura-Skirlinska A, Gurbiel R, Wietrzyk J, Chłopicki S.** Alterations in NO- and PGI₂- dependent function in aorta in the orthotopic murine model of metastatic 4T1 breast cancer: Relationship with pulmonary endothelial dysfunction and systemic inflammation. *BMC Cancer* 18, 2018. doi: 10.1186/s12885-018-4445-z.
61. **Mount PF, Kemp BE, Power DA.** Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol* 42: 271–279, 2007. doi: 10.1016/J.YJMCC.2006.05.023.
62. **Wong MH, Samal AB, Lee M, Vlach J, Novikov N, Niedziela-Majka A, Feng JY, Koltun DO, Brendza KM, Kwon HJ, Schultz BE, Sakowicz R, Saad JS, Papalia GA.** The KN-93 Molecule Inhibits Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II (CaMKII) Activity by Binding to Ca²⁺/CaM. *J Mol Biol* 431: 1440–1459, 2019. doi: 10.1016/j.jmb.2019.02.001.
63. **Szczepaniak P, Siedlinski M, Hodorowicz-Zaniewska D, Nosalski R, Mikolajczyk TP, Dobosz AM, Dikalova A, Dikalov S, Streb J, Gara K, Basta P, Krolczyk J, Sulicka-Grodzicka J, Jozefczuk E, Dziewulska A, Saju B, Laksa I, Chen W, Dormer J, Tomaszewski M, Maffia P, Czesnikiewicz-Guzik M, Crea F, Dobrzyn A, Moslehi J, Grodzicki T, Harrison DG, Guzik TJ.** Breast cancer chemotherapy induces vascular dysfunction and hypertension through a NOX4-dependent mechanism. *J Clin Invest* 132, 2022. doi: 10.1172/JCI149117.
64. **Clayton ZS, Brunt VE, Hutton DA, VanDongen NS, D'Alessandro A, Reisz JA, Ziembra BP, Seals DR.** Doxorubicin-Induced Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction in Conduit Arteries Is Prevented by Mitochondrial-Specific Antioxidant Treatment. *JACC CardioOncology* 2: 475, 2020. doi: 10.1016/J.JACCAO.2020.06.010.
65. **He H, Wang L, Qiao Y, Zhou Q, Li H, Chen S, Yin D, Huang Q, He M.** Doxorubicin induces endotheliotoxicity and mitochondrial dysfunction via

- ROS/eNOS/NO pathway. *Front Pharmacol* 10: 1531, 2019. doi: 10.3389/FPHAR.2019.01531/FULL.
66. **Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Vita JA.** The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll. Cardiol.* 42: 1149–1160, 2003.
 67. **Schrörs B, Boegel S, Albrecht C, Bukur T, Bukur V, Holtsträter C, Ritzel C, Manninen K, Tadmor AD, Vormehr M, Sahin U, Löwer M.** Multi-Omics Characterization of the 4T1 Murine Mammary Gland Tumor Model. *Front Oncol* 10: 1195, 2020. doi: 10.3389/FONC.2020.01195/FULL.
 68. **Tao K, Fang M, Alroy J, Sahagian GG.** Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC Cancer* 8: 228, 2008. doi: 10.1186/1471-2407-8-228.
 69. **Kowanetz M, Wu X, Lee J, Tan M, Hagenbeek T, Qu X, Yu L, Ross J, Korsisaari N, Cao T, Bou-Reslan H, Kallop D, Weimer R, Ludlam MJ, Kaminker JS, Modrusan Z, van Bruggen N, Peale F V, Carano R, Meng YG, Ferrara N.** Granulocyte-colony stimulating factor promotes lung metastasis through mobilization of Ly6G+Ly6C+ granulocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 21248–21255, 2010. doi: 10.1073/pnas.1015855107.
 70. **DuPre' S a, Hunter KW.** Murine mammary carcinoma 4T1 induces a leukemoid reaction with splenomegaly: association with tumor-derived growth factors. *Exp Mol Pathol* 82: 12–24, 2007. doi: 10.1016/j.yexmp.2006.06.007.
 71. **Sleeman JP.** The metastatic niche and stromal progression. *Cancer Metastasis Rev* 31: 429–440, 2012. doi: 10.1007/s10555-012-9373-9.
 72. **Kong DH, Kim YK, Kim MR, Jang JH, Lee S.** Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. *Int J Mol Sci* 2018, Vol 19, Page 1057 19: 1057, 2018. doi: 10.3390/IJMS19041057.
 73. **Chen Q, Massagué J.** Molecular pathways: VCAM-1 as a potential therapeutic target in metastasis. *Clin Cancer Res* 18: 5520–5525, 2012. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2904/85013/AM/MOLECULAR-PATHWAYS-VCAM-1-AS-A-POTENTIAL.
 74. **Ferjančič Š, Gil-Bernabé AM, Hill SA, Allen PD, Richardson P, Sparey T, Savory E, McGuffog J, Muschel RJ.** VCAM-1 and VAP-1 recruit myeloid cells that promote pulmonary metastasis in mice. *Blood* 121: 3289–3297, 2013. doi: 10.1182/BLOOD-2012-08-449819.
 75. **Gao F, Lucke-Wold BP, Li X, Logsdon AF, Xu LC, Xu S, LaPenna KB, Wang H, Talukder MAH, Siedlecki CA, Huber JD, Rosen CL, He P.** Reduction of endothelial nitric oxide increases the adhesiveness of constitutive endothelial membrane ICAM-1 through Src-mediated phosphorylation. *Front Physiol* 8: 316300, 2018. doi: 10.3389/FPHYS.2017.01124/BIBTEX.
 76. **Lu Y, Yu T, Liang H, Wang J, Xie J, Shao J, Gao Y, Yu S, Chen S, Wang L, Jia L.** Nitric Oxide Inhibits Hetero-adhesion of Cancer Cells to Endothelial Cells: Restraining Circulating Tumor Cells from Initiating Metastatic Cascade. *Sci Rep* 4, 2014. doi: 10.1038/srep04344.
 77. **Chello M, Mastroberto P, Perticone F, Celi V, Colonna A.** Nitric Oxide Modulation of Neutrophil-Endothelium Interaction: Difference Between Arterial and

Venous Coronary Bypass Grafts 11 This work was supported in part by a grant from the Italian Ministry of University and Scientific Research, Rome, Italy. *J Am Coll Cardiol* 31: 823–826, 1998. doi: 10.1016/S0735-1097(97)00560-3.

78. **Kubes P, Suzuki M, Granger DN.** Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. [Online]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 4651–5, 1991. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=51723&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [30 Jul. 2015].
79. **Loscalzo J, Freedman J, Inbal A, Keaney JF, Michelson AD, Vita JA.** Nitric oxide insufficiency and arterial thrombosis. [Online]. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 111: 158–63, 2000. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2194373&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [24 Jun. 2014].
80. **Bambace NM, Holmes CE.** The platelet contribution to cancer progression. *J Thromb Haemost* 9: 237–49, 2011. doi: 10.1111/j.1538-7836.2010.04131.x.
81. **Erpenbeck L, Scho MP.** Review article Deadly allies : the fatal interplay between platelets and metastasizing cancer cells. 115: 3427–3436, 2010. doi: 10.1182/blood-2009-10-247296.
82. **Gay LJ, Felding-Habermann B.** Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer* 11: 123–34, 2011. doi: 10.1038/nrc3004.
83. **Smeda M, Przyborowski K, Stojak M, Chlopicki S.** The endothelial barrier and cancer metastasis: Does the protective facet of platelet function matter? *Biochem Pharmacol* 176: 113886, 2020. doi: 10.1016/J.BCP.2020.113886.
84. **Lucotti S, Cerutti C, Soyer M, Gil-Bernabé AM, Gomes AL, Allen PD, Smart S, Markelc B, Watson K, Armstrong PC, Mitchell JA, Warner TD, Ridley AJ, Muschel RJ.** Aspirin blocks formation of metastatic intravascular niches by inhibiting platelet-derived COX-1/thromboxane A2. *J Clin Invest* 129: 1845, 2019. doi: 10.1172/JCI121985.
85. **Smeda M, Kieronska A, Proniewski B, Jaształ A, Selmi A, Wandzel K, Zakrzewska A, Wojcik T, Przyborowski K, Derszniak K, Stojak M, Kaczor D, Buczek E, Watała C, Wietrzyk J, Chlopicki S, Smeda M, Kieronska A, Proniewski B, Jaształ A, Selmi A, Wandzel K, Zakrzewska A, Wojcik T, Przyborowski K, Derszniak K, Stojak M, Kaczor D, Buczek E, Watała C, Wietrzyk J, Chlopicki S, Smeda M, Kieronska A, Proniewski B, Jaształ A, Selmi A, Wandzel K, Zakrzewska A, Wojcik T, Przyborowski K, Derszniak K, Stojak M, Kaczor D, Buczek E, Watała C, Wietrzyk J, Chlopicki S.** Dual antiplatelet therapy with clopidogrel and aspirin increases mortality in 4T1 metastatic breast cancer-bearing mice by inducing vascular mimicry in primary tumour. *Oncotarget* 9: 17810–17824, 2018. doi: 10.18632/oncotarget.24891.
86. **Carlström M, Liu M, Yang T, Zollbrecht C, Huang L, Peleli M, Borniquel S, Kishikawa H, Hezel M, Persson AEG, Weitzberg E, Lundberg JO.** Cross-talk between Nitrate-Nitrite-NO and NO Synthase Pathways in Control of Vascular NO Homeostasis. *Antioxidants Redox Signal* 23: 295–306, 2015. doi: 10.1089/ARS.2013.5481/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE9.JPEG.

87. **Lobysheva II, Biller P, Gallez B, Beauloye C, Balligand JL.** Nitrosylated Hemoglobin Levels in Human Venous Erythrocytes Correlate with Vascular Endothelial Function Measured by Digital Reactive Hyperemia. *PLoS One* 8: e76457, 2013. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0076457.
88. **Zotti FD, Lobysheva II, Balligand JL.** Nitrosyl-hemoglobin formation in rodent and human venous erythrocytes reflects NO formation from the vasculature in vivo. *PLoS One* 13: e0200352, 2018. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0200352.
89. **Toya SP, Malik AB.** Role of endothelial injury in disease mechanisms and contribution of progenitor cells in mediating endothelial repair. *Immunobiology* 217: 569–580, 2012. doi: 10.1016/j.imbio.2011.03.006.
90. **Lechner M, Lirk P, Rieder J.** Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: The two sides of the same coin. *Semin. Cancer Biol.* 15: 277–89, 2005.
91. **Marcinkiewicz E, Marcinkiewicz J, Chłopicki S.** Nitric oxide – a pro-inflammatory and anti-inflammatory mediator. *Cent Eur J of Immunology* 28: 74–78, 2004.
92. **Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS.** Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology* 15: 252–259, 2007. doi: 10.1007/S10787-007-0013-X.
93. **Tripathi P, Tripathi P, Kashyap L, Singh V.** The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51: 443–452, 2007. doi: 10.1111/J.1574-695X.2007.00329.X.
94. **Stéphane S, Claude-Alain M, Dominique D, Philippe L, Maryse D.** Endocan as a Biomarker of Endothelial Dysfunction in Cancer. *J Cancer Sci Ther* 2: 47–52, 2010. doi: 10.4172/1948-5956.1000022.
95. **Mintz J, Vedenko A, Rosete O, Shah K, Goldstein G, Hare JM, Ramasamy R, Arora H.** Current Advances of Nitric Oxide in Cancer and Anticancer Therapeutics. *Vaccines* 2021, Vol 9, Page 94 9: 94, 2021. doi: 10.3390/VACCINES9020094.
96. **Zafirellis K, Zachaki A, Agrogiannis G, Gravani K.** Inducible nitric oxide synthase expression and its prognostic significance in colorectal cancer. *APMIS* 118: 115–124, 2010. doi: 10.1111/J.1600-0463.2009.02569.X.
97. **Kopaliani I, Elsaid B, Speier S, Deussen A.** Immune and Metabolic Mechanisms of Endothelial Dysfunction. *Int J Mol Sci* 2024, Vol 25, Page 13337 25: 13337, 2024. doi: 10.3390/IJMS252413337.
98. **Theofilis P, Sagris M, Oikonomou E, Antonopoulos AS, Siasos G, Tsioufis C, Tousoulis D.** Inflammatory Mechanisms Contributing to Endothelial Dysfunction. *Biomed* 2021, Vol 9, Page 781 9: 781, 2021. doi: 10.3390/BIOMEDICINES9070781.
99. **Dalaklioglu S, Tasatargil A, Kale S, Tanriover G, Dilmac S, Erin N.** Metastatic breast carcinoma induces vascular endothelial dysfunction in Balb-c mice: Role of the tumor necrosis factor- α and NADPH oxidase. *Vascul Pharmacol* 59: 103–111, 2013. doi: 10.1016/j.vph.2013.07.008.
100. **Eisa M, Fathy M, Nazmy M.** Potential COX2 mediated Therapeutic effect of Ciprofloxacin. *Minia J Med Res* 32: 47–57, 2021. doi: 10.21608/MJMR.2021.242989.

101. **Adelizzi RA.** COX-1 and COX-2 in health and disease. *J Am Osteopath Assoc* 99: S7–S12, 1999. doi: 10.7556/jaoa.1999.99.11.S7.
102. **Tzanakakis GN, Agarwal KC VM.** Inhibition of hepatic metastasis from a human pancreatic adenocarcinoma (RWP-2) in the nude mouse by prostacyclin, forskolin, and ketoconazole. *Cancer* 3: 446–51, 1990.
103. **Sava G, Perissin L, Zorzet S, Piccini P, Giraldi T.** Antimetastatic action of the prostacyclin analog iloprost in the mouse. *Clin Exp Metastasis* 7: 671–678, 1989.
104. **Blazejczyk A, Switalska M, Chlopicki S, Marcinek A, Gebicki J, Nowak M, Nasulewicz-Goldeman A, Wietrzyk J.** 1-methylnicotinamide and its structural analog 1,4-dimethylpyridine for the prevention of cancer metastasis. *J Exp Clin Cancer Res* 35: 110, 2016. doi: 10.1186/s13046-016-0389-9.
105. **Nadir Y, Brenner B.** Cancer and Thrombosis—New Insights. *Rambam Maimonides Med J* 9: e0033, 2018. doi: 10.5041/RMMJ.10349.
106. **Colonne CK, Favaloro EJ, Pasalic L.** The Intriguing Connections between von Willebrand Factor, ADAMTS13 and Cancer. *Healthcare* 10: 557, 2022. doi: 10.3390/HEALTHCARE10030557.
107. **Yang J, Wu Z, Long Q, Huang J, Hong T, Liu W, Lin J.** Insights Into Immunothrombosis: The Interplay Among Neutrophil Extracellular Trap, von Willebrand Factor, and ADAMTS13. *Front Immunol* 11: 610696, 2020. doi: 10.3389/FIMMU.2020.610696.
108. **Obermeier HL, Riedl J, Ay C, Koder S, Quehenberger P, Bartsch R, Kaider A, Zielinski CC, Pabinger I.** The role of ADAMTS-13 and von Willebrand factor in cancer patients: Results from the Vienna Cancer and Thrombosis Study. *Res Pract Thromb Haemost* 3: 503, 2019. doi: 10.1002/RTH2.12197.
109. **Leal AC, Mizurini DM, Gomes T, Rochael NC, Saraiva EM, Dias MS, Werneck CC, Sielski MS, Vicente CP, Monteiro RQ.** Tumor-Derived Exosomes Induce the Formation of Neutrophil Extracellular Traps: Implications For The Establishment of Cancer-Associated Thrombosis. *Sci Rep* 7, 2017. doi: 10.1038/S41598-017-06893-7.
110. **Smeda M, Kieronska A, Adamski MG, Proniewski B, Sternak M, Mohaissen T, Przyborowski K, Derszniak K, Kaczor D, Stojak M, Buczek E, Jasztal A, Wietrzyk J, Chlopicki S.** Nitric oxide deficiency and endothelial-mesenchymal transition of pulmonary endothelium in the progression of 4T1 metastatic breast cancer in mice. *Breast Cancer Res* 20: 1–15, 2018. doi: 10.1186/S13058-018-1013-Z/FIGURES/8.
111. **Charytan DM, Padera R, Helfand AM, Zeisberg M, Xu X, Liu X, Himmelfarb J, Cinelli A, Kalluri R, Zeisberg EM.** Increased concentration of circulating angiogenesis and nitric oxide inhibitors induces endothelial to mesenchymal transition and myocardial fibrosis in patients with chronic kidney disease. *Int J Cardiol* 176: 99–109, 2014. doi: 10.1016/J.IJCARD.2014.06.062.
112. **Dumanskiy Y V., Stoliarova OY, Syniachenko O V., Iegudina ED.** Endothelial dysfunction of vessels at lung cancer. *Exp Oncol* 37: 277–280, 2015. doi: 10.31768/2312-8852.2015.37(4):277-280.

113. **Tashakkor AY, Moghaddamjou A, Chen L, Cheung WY.** Predicting the risk of cardiovascular comorbidities in adult cancer survivors. *Curr Oncol* 20: e360, 2013. doi: 10.3747/CO.20.1470.
114. **Suzuki M, Tomoiike H, Sumiyoshi T, Nagatomo Y, Hosoda T, Nagayama M, Ishikawa Y, Sawa T, Iimuro S, Yoshikawa T, Hosoda S.** Incidence of cancers in patients with atherosclerotic cardiovascular diseases. *Int J Cardiol Hear Vasc* 17: 11, 2017. doi: 10.1016/J.IJCHA.2017.08.004.
115. **Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC, Bergenstal RM, Gapstur SM, Habel LA, Pollak M, Regensteiner JG, Yee D.** Diabetes and Cancer: A consensus report. *Diabetes Care* 33: 1674, 2010. doi: 10.2337/DC10-0666.
116. **Stone TW, McPherson M, Gail Darlington L.** Obesity and Cancer: Existing and New Hypotheses for a Causal Connection. *EBioMedicine* 30: 14–28, 2018. doi: 10.1016/J.EBIOM.2018.02.022.
117. **Tabariès S, Ouellet V, Hsu BE, Annis MG, Rose AA, Meunier L, Carmona E, Tam CE, Mes-Masson A-M, Siegel PM.** Granulocytic immune infiltrates are essential for the efficient formation of breast cancer liver metastases. *Breast Cancer Res* 17: 45, 2015. doi: 10.1186/s13058-015-0558-3.
118. **Salgado R, Junius S, Benoy I, Van Dam P, Vermeulen P, Van Marck E, Huget P, Dirix LY.** Circulating interleukin-6 predicts survival in patients with metastatic breast cancer. *Int J Cancer* 103: 642–6, 2003. doi: 10.1002/ijc.10833.
119. **Thompson DK, Haddow JE, Smith DE, Ritchie RF.** Elevated serum acute phase protein levels as predictors of disseminated breast cancer. [Online]. *Cancer* 51: 2100–4, 1983. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6188525> [26 Aug. 2015].
120. **Sansone P, Storci G.** IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland. *J ...* 117, 2007. doi: 10.1172/JCI32533DS1.
121. **Schafer Z, Brugge J.** IL-6 involvement in epithelial cancers. *J Clin Invest* 117: 1–4, 2007. doi: 10.1172/JCI34237.3660.
122. **Utsumi K, Takai Y, Tada T, Ohzeki S, Fujiwara H, Hamaoka T.** Enhanced production of IL-6 in tumor-bearing mice and determination of cells responsible for its augmented production. [Online]. *J Immunol* 145: 397–403, 1990. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1972720> [25 Jun. 2014].
123. **Brodt P, Fallavollita L, Bresalier RS, Meterissian S, Norton CR, Wolitzky B a.** Liver endothelial E-selectin mediates carcinoma cell adhesion and promotes liver metastasis. [Online]. *Int J Cancer* 71: 612–9, 1997. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9178816>.
124. **Schafer Z, Brugge J.** IL-6 involvement in epithelial cancers. *J Clin Invest* 117: 3660–3663, 2007. doi: 10.1172/JCI34237.
125. **Tawara K, Oxford JT, Jorcyk CL.** Clinical significance of interleukin (IL)-6 in cancer metastasis to bone: potential of anti-IL-6 therapies. *Cancer Manag Res* 3: 177–89, 2011. doi: 10.2147/CMR.S18101.

126. **Dempsey E, Rudd PM.** Acute phase glycoproteins: bystanders or participants in carcinogenesis? *Ann N Y Acad Sci* 1253: 122–32, 2012. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06420.x.
127. **Hansen MT, Forst B, Cremers N, Quagliata L, Ambartsumian N, Grum-Schwensen B, Klingelhöfer J, Abdul-Al A, Herrmann P, Osterland M, Stein U, Nielsen GH, Scherer PE, Lukanidin E, Sleeman JP, Grigorian M.** A link between inflammation and metastasis: serum amyloid A1 and A3 induce metastasis, and are targets of metastasis-inducing S100A4. .
128. **Guha A, Jain P, Fradley MG, Lenihan D, Gutierrez JM, Jain C, de Lima M, Barnholtz-Sloan JS, Oliveira GH, Dowlati A, Al-Kindi S.** Cardiovascular adverse events associated with BRAF versus BRAF/MEK inhibitor: Cross-sectional and longitudinal analysis using two large national registries. *Cancer Med* 10: 3862–3872, 2021. doi: 10.1002/cam4.3938.
129. **Pudil R, Danzig V, Veselý J, Málek F, Táborský M, Elbl L, Linhart A, Skalická H.** 2022 ESC Guidelines on cardio-oncology developed in collaboration with the European Hematology Association (EHA), the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ESTRO) and the International Cardio-Oncology Society (IC-OS). *Cor Vasa* 65: 350–434, 2023. doi: 10.33678/cor.2023.032.
130. **Glen C, Dobbin SJH, Mangion K, Macdonald E, Butler E, Brooksbank K, Coats C, Roditi G, Tan YY, Waterston A, Petrie MC, Lang NN.** Cardiovascular effects of BRAF and MEK inhibitors in patients with melanoma: a prospective study incorporating risk scores, cardiac biomarkers and cardiovascular magnetic resonance imaging. *Eur Heart J* 45, 2024. doi: 10.1093/EURHEARTJ/EHAE666.3219.
131. **Rose BA, Force T, Wang Y.** Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in the Heart: Angels Versus Demons in a Heart-Breaking Tale. *Physiol Rev* 90: 10.1152/physrev.00054.2009, 2010. doi: 10.1152/PHYSREV.00054.2009.
132. **Fleming I, Busse R.** Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284, 2003. doi: 10.1152/AJPREGU.00323.2002.
133. **Kashiwagi S, Atochin DN, Li Q, Schleicher M, Pong T, Sessa WC, Huang PL.** eNOS phosphorylation on serine 1176 affects insulin sensitivity and adiposity. *Biochem Biophys Res Commun* 431: 284–290, 2013. doi: 10.1016/J.BBRC.2012.12.110.
134. **Bromberger S, Zadorozhna Y, Ressler JM, Holzner S, Nawrocki A, Zila N, Springer A, Larsen MR, Schossleitner K.** Off-targets of BRAF inhibitors disrupt endothelial signaling and vascular barrier function. *Life Sci Alliance* 7: e202402671, 2024. doi: 10.26508/LSA.202402671.
135. **Dorard C, Cseh B, Ehrenreiter K, Wimmer R, Varga A, Hirschmugl T, Maier B, Kramer K, Furlinger S, Doma E, Baccarini M.** RAF dimers control vascular permeability and cytoskeletal rearrangements at endothelial cell-cell junctions. *FEBS J* 286: 2277–2294, 2019. doi: 10.1111/FEBS.14802.
136. **Van Nieuw Amerongen GP, Beckers CML, Achekar ID, Zeeman S, Musters RJP, Van Hinsbergh VWM.** Involvement of Rho kinase in endothelial barrier maintenance.

- Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 2332–2339, 2007. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.152322.
137. **Miyazaki T, Honda K, Ohata H.** m-Calpain antagonizes RhoA overactivation and endothelial barrier dysfunction under disturbed shear conditions. *Cardiovasc Res* 85: 530–541, 2010. doi: 10.1093/CVR/CVP311.
 138. **Amagai R, Fujimura T, Muto Y, Kambayashi Y, Furudate S, Ohuchi K, Okuma T, Hashimoto A, Aiba S.** Serum soluble CD163 and proinflammatory chemokines may be biomarkers of the onset of adverse events in dabrafenib plus trametinib combination therapy for advanced melanoma. *Dermatol Ther* 34: e14544, 2021. doi: 10.1111/DTH.14544.
 139. **Lee IC, Kim J, Bae JS.** Anti-inflammatory effects of dabrafenib in vitro and in vivo. *Can J Physiol Pharmacol* 95: 697–707, 2017. doi: 10.1139/CJPP-2016-0519.
 140. **Beck TC, Arhontoulis DC, Morningstar JE, Hyams N, Stoddard A, Springs K, Mukherjee R, Helke K, Guo L, Moore K, Gensemer C, Biggs R, Petrucci T, Kwon J, Stayer K, Koren N, Harvey A, Holman H, Dunne J, Fulmer D, Vohra A, Mai L, Dooley S, Weninger J, Vaena S, Romeo M, Muise-Helmericks RC, Mei Y, Norris RA.** Cellular and Molecular Mechanisms of MEK1 Inhibitor–Induced Cardiotoxicity. *JACC CardioOncology* 4: 535, 2022. doi: 10.1016/J.JACCAO.2022.07.009.
 141. **King AJ, Arnone MR, Bleam MR, Moss KG, Yang J, Fedorowicz KE, Smitheman KN, Erhardt JA, Hughes-Earle A, Kane-Carson LS, Sinnamon RH, Qi H, Rheault TR, Uehling DE, Laquerre SG.** Dabrafenib; Preclinical Characterization, Increased Efficacy when Combined with Trametinib, while BRAF/MEK Tool Combination Reduced Skin Lesions. *PLoS One* 8: e67583, 2013. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0067583.
 142. **Itamura H, Shindo T, Tawara I, Kubota Y, Kariya R, Okada S, Komanduri K V., Kimura S.** The MEK inhibitor trametinib separates murine graft-versus-host disease from graft-versus-tumor effects. *JCI Insight* 1: e86331, 2016. doi: 10.1172/JCI.INSIGHT.86331.
 143. **Kerstjens M, Pinhancos SS, Castro PG, Schneider P, Wander P, Pieters R, Stam RW.** Trametinib inhibits RAS-mutant MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemia at specific niche sites and reduces ERK phosphorylation in vivo. *Haematologica* 103: e147, 2018. doi: 10.3324/HAEMATOL.2017.174060.
 144. **Liang X xue, Wang R yu, Guo Y zheng, Cheng Z, Lv D yi, Luo M hao, He A, Luo S xin, Xia Y.** Phosphorylation of Akt at Thr308 regulates p-eNOS Ser1177 during physiological conditions. *FEBS Open Bio* 11: 1953–1964, 2021. doi: 10.1002/2211-5463.13194.
 145. **Mount PF, Kemp BE, Power DA.** Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol* 42: 271–279, 2007. doi: 10.1016/J.YJMCC.2006.05.023.
 146. **Merhi-Soussi F, Dominguez Z, Macovschi O, Dubois M, Nemoz G, Lagarde M, Prigent AF.** Mechanisms involved in the stimulation of prostacyclin synthesis by human lymphocytes in human umbilical vein endothelial cells. *Br J Pharmacol* 139: 321, 2003. doi: 10.1038/SJ.BJP.0705253.

147. **Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, Brandhuber BJ, Anderson DJ, Alvarado R, Ludlam MJC, Stokoe D, Gloor SL, Vigers G, Morales T, Aliagas I, Liu B, Sideris S, Hoeflich KP, Jaiswal BS, Seshagiri S, Koeppen H, Belvin M, Friedman LS, Malek S.** RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* 464: 431–435, 2010. doi: 10.1038/NATURE08833.
148. **Zhang C, Spevak W, Zhang Y, Burton EA, Ma Y, Habets G, Zhang J, Lin J, Ewing T, Matusow B, Tsang G, Marimuthu A, Cho H, Wu G, Wang W, Fong D, Nguyen H, Shi S, Womack P, Nespi M, Shellooe R, Carias H, Powell B, Light E, Sanftner L, Walters J, Tsai J, West BL, Visor G, Rezaei H, Lin PS, Nolop K, Ibrahim PN, Hirth P, Bollag G.** RAF inhibitors that evade paradoxical MAPK pathway activation. *Nature* 526: 583–586, 2015. doi: 10.1038/NATURE14982.
149. **Poulikakos PI, Persaud Y, Janakiraman M, Kong X, Ng C, Moriceau G, Shi H, Atefi M, Titz B, Gabay MT, Salton M, Dahlman KB, Tadi M, Wargo JA, Flaherty KT, Kelley MC, Misteli T, Chapman PB, Sosman JA, Graeber TG, Ribas A, Lo RS, Rosen N, Solit DB.** RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* 480: 387–390, 2011. doi: 10.1038/NATURE10662.
150. **Lito P, Rosen N, Solit DB.** Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nat Med* 2013 19(11): 1401–1409, 2013. doi: 10.1038/nm.3392.
151. **Poulikakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, Rosen N.** RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* 464: 427–430, 2010. doi: 10.1038/NATURE08902.
152. **Anjum R, Blenis J.** The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008 9(9): 747–758, 2008. doi: 10.1038/nrm2509.
153. **Hauge C, Frödin M.** RSK and MSK in MAP kinase signalling. *J Cell Sci* 119: 3021–3023, 2006. doi: 10.1242/JCS.02950.
154. **Klaeger S, Heinzlmeir S, Wilhelm M, Polzer H, Vick B, Koenig PA, Reinecke M, Ruprecht B, Petzoldt S, Meng C, Zecha J, Reiter K, Qiao H, Helm D, Koch H, Schoof M, Canevari G, Casale E, Re Depaolini S, Feuchtinger A, Wu Z, Schmidt T, Rueckert L, Becker W, Huenges J, Garz AK, Gohlke BO, Zolg DP, Kayser G, Vooder T, Preissner R, Hahne H, Tönisson N, Kramer K, Götze K, Bassermann F, Schlegl J, Ehrlich HC, Aiche S, Walch A, Greif PA, Schneider S, Felder ER, Ruland J, Médard G, Jeremias I, Spiekermann K, Kuster B.** The target landscape of clinical kinase drugs. *Science* 358: eaan4368, 2017. doi: 10.1126/SCIENCE.AAN4368.
155. **Zhou Q, Gensch C, Liao JK.** Rho-associated Coiled-coil Forming Kinase (ROCK): a potential target for the treatment of atherosclerosis and vascular disease. *Trends Pharmacol Sci* 32: 167, 2011. doi: 10.1016/J.TIPS.2010.12.006.
156. **Ravichandran N, Iyer M, Uvarajan D, Kirola L, Kumra SM, Babu H winster S, HariKrishnaReddy D, Vellingiri B, Narayanasamy A.** New insights on the regulators and inhibitors of RhoA-ROCK signalling in Parkinson's disease. *Metab Brain Dis* 2025 40(1): 1–26, 2025. doi: 10.1007/S11011-024-01500-X.
157. **Coleman ML, Olson MF.** Rho GTPase signalling pathways in the morphological

- changes associated with apoptosis. *Cell Death Differ* 9: 493–504, 2002. doi: 10.1038/SJ.CDD.4400987.
158. **Julian L, Olson MF.** Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): Structure, regulation, and functions. *Small GTPases* 5: e29846, 2014. doi: 10.4161/SGTP.29846.
 159. **Zhou Q, Liao JK.** Rho Kinase: An Important Mediator of Atherosclerosis and Vascular Disease. *Curr Pharm Des* 15: 3108–3115, 2009. doi: 10.2174/138161209789057986.
 160. **Yao L, Romero MJ, Toque HA, Yang G, Caldwell RB, Caldwell RW.** The role of RhoA/Rho kinase pathway in endothelial dysfunction. *J Cardiovasc Dis Res* 1: 165–170, 2010. doi: 10.4103/0975-3583.74258.
 161. **Shimokawa H, Sunamura S, Satoh K.** RhoA/Rho-Kinase in the Cardiovascular System. *Circ Res* 118: 352–366, 2016. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306532.
 162. **Shahbazi R, Baradaran B, Khordadmehr M, Safaei S, Baghbanzadeh A, Jigari F, Ezzati H.** Targeting ROCK signaling in health, malignant and non-malignant diseases. *Immunol Lett* 219: 15–26, 2020. doi: 10.1016/J.IMLET.2019.12.012.
 163. **Ratz PH, Berg KM, Urban NH, Miner AS.** Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. *Am J Physiol Cell Physiol* 288, 2005. doi: 10.1152/AJPCELL.00529.2004.
 164. **Yang G, Peng X, Wu Y, Li T, Liu L.** Involvement of connexin 43 phosphorylation and gap junctional communication between smooth muscle cells in vasopressin-induced ROCK-dependent vasoconstriction after hemorrhagic shock. *Am J Physiol Cell Physiol* 313: C362–C370, 2017. doi: 10.1152/AJPCELL.00258.2016.
 165. **Laufs U, Liao JK.** Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem* 273: 24266–24271, 1998. doi: 10.1074/JBC.273.37.24266.
 166. **Wolfrum S, Dendorfer A, Rikitake Y, Stalker TJ, Gong Y, Scalia R, Dominiak P, Liao JK.** Inhibition of Rho-kinase leads to rapid activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt and cardiovascular protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1842–1847, 2004. doi: 10.1161/01.ATV.0000142813.33538.82.
 167. **Shimada H, Rajagopalan LE.** Rho-kinase mediates lysophosphatidic acid-induced IL-8 and MCP-1 production via p38 and JNK pathways in human endothelial cells. *FEBS Lett* 584: 2827–2832, 2010. doi: 10.1016/J.FEBSLET.2010.04.064.
 168. **Anwar KN, Fazal F, Malik AB, Rahman A.** RhoA/Rho-associated kinase pathway selectively regulates thrombin-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells via activation of I kappa B kinase beta and phosphorylation of RelA/p65. *J Immunol* 173: 6965–6972, 2004. doi: 10.4049/JIMMUNOL.173.11.6965.
 169. **Eto M, Kozai T, Cosentino F, Joch H, Lüscher TF.** Statin prevents tissue factor expression in human endothelial cells: role of Rho/Rho-kinase and Akt pathways. *Circulation* 105: 1756–1759, 2002. doi: 10.1161/01.CIR.0000015465.73933.3B.
 170. **Nakakuki T, Ito M, Iwasaki H, Kureishi Y, Okamoto R, Moriki N, Kongo M,**

- Kato S, Yamada N, Isaka N, Nakano T.** Rho/Rho-kinase pathway contributes to C-reactive protein-induced plasminogen activator inhibitor-1 expression in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 2088–2093, 2005. doi: 10.1161/01.ATV.0000183607.50230.9F.
171. **Shimokawa H, Satoh K.** Light and dark of reactive oxygen species for vascular function: 2014 ASVB (Asian Society of Vascular Biology). *J Cardiovasc Pharmacol* 65: 412–418, 2015. doi: 10.1097/FJC.000000000000159.
 172. **Tlili A, Pintard C, Hurtado-Nedelec M, Liu D, Marzaioli V, Thieblemont N, Dang PMC, El-Benna J.** ROCK2 interacts with p22phox to phosphorylate p47phox and to control NADPH oxidase activation in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 120: e2209184120, 2023. doi: 10.1073/PNAS.2209184120.
 173. **Dokumacioglu E, Duzcan I, Iskender H, Sahin A.** RhoA/ROCK-1 Signaling Pathway and Oxidative Stress in Coronary Artery Disease Patients. *Brazilian J Cardiovasc Surg* 37: 212, 2022. doi: 10.21470/1678-9741-2020-0525.
 174. **Gaertner TR, Kolodziej SJ, Wang D, Kobayashi R, Koomen JM, Stoops JK, Waxham MN.** Comparative analyses of the three-dimensional structures and enzymatic properties of alpha, beta, gamma and delta isoforms of Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 279: 12484–12494, 2004. doi: 10.1074/JBC.M313597200.
 175. **Reyes Gaido OE, Nkashama LJ, Schole KL, Wang Q, Umapathi P, Mesubi OO, Konstantinidis K, Luczak ED, Anderson ME.** CaMKII as a Therapeutic Target in Cardiovascular Disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 63: 249, 2022. doi: 10.1146/ANNUREV-PHARMTOX-051421-111814.
 176. **Ozcan L, Cristina De Souza J, Harari AA, Backs J, Olson EN, Tabas I.** Activation of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II in Obesity Mediates Suppression of Hepatic Insulin Signaling. *Cell Metab* 18: 10.1016/j.cmet.2013.10.011, 2013. doi: 10.1016/J.CMET.2013.10.011.
 177. **Kahl CR, Means AR.** Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways. *Endocr Rev* 24: 719–736, 2003. doi: 10.1210/ER.2003-0008.
 178. **Bui JD, Calbo S, Hayden-Martinez K, Kane LP, Gardner P, Hedrick SM.** A role for CaMKII in T cell memory. *Cell* 100: 457–467, 2000. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80681-9.
 179. **Lisman J, Yasuda R, Raghavachari S.** Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat Rev Neurosci* 13: 169, 2012. doi: 10.1038/NRN3192.
 180. **Mi S, Chen H, Lin P, Kang P, Qiao D, Zhang B, Wang Z, Zhang J, Hu X, Wang C, Cui H, Li S.** CaMKII is a modulator in neurodegenerative diseases and mediates the effect of androgen on synaptic protein PSD95. *Front Genet* 13: 959360, 2022. doi: 10.3389/FGENE.2022.959360.
 181. **Lisman J, Schulman H, Cline H.** The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci* 3: 175–190, 2002. doi: 10.1038/NRN753.
 182. **Zhang P.** CaMKII: The molecular villain that aggravates cardiovascular disease (review). *Exp Ther Med* 13: 815–820, 2017. doi: 10.3892/ETM.2017.4034/HTML.

183. **Beckendorf J, van den Hoogenhof MMG, Backs J.** Physiological and unappreciated roles of CaMKII in the heart. *Basic Res Cardiol* 113: 29, 2018. doi: 10.1007/S00395-018-0688-8.
184. **Chelu MG, Sarma S, Sood S, Wang S, Van Oort RJ, Skapura DG, Li N, Santonastasi M, Müller FU, Schmitz W, Schotten U, Anderson ME, Valderrábano M, Dobrev D, Wehrens XHT.** Calmodulin kinase II-mediated sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak promotes atrial fibrillation in mice. *J Clin Invest* 119: 1940–1951, 2009. doi: 10.1172/JCI37059.
185. **Mesubi OO, Anderson ME.** Atrial remodelling in atrial fibrillation: CaMKII as a nodal proarrhythmic signal. *Cardiovasc Res* 109: 542–557, 2016. doi: 10.1093/CVR/CVW002.
186. **Anderson ME, Brown JH, Bers DM.** CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 51: 468–473, 2011. doi: 10.1016/J.YJMCC.2011.01.012.
187. **Hegyi B, Bers DM, Bossuyt J.** CaMKII signaling in heart diseases: Emerging role in diabetic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 127: 246–259, 2019. doi: 10.1016/J.YJMCC.2019.01.001.
188. **Daniels L, Bell JR, Delbridge LMD, McDonald FJ, Lamberts RR, Erickson JR.** The role of CaMKII in diabetic heart dysfunction. *Heart Fail Rev* 20: 589–600, 2015. doi: 10.1007/S10741-015-9498-3.
189. **Li N, Lin P, Zuo Z, You MJ, Shuai W, Orlowski R, Manasanch EE, Li S, Xu J, Garces S, Jelloul FZ, Tang Z, Wang W, Medeiros LJ, Yin CC.** Plasma cell myeloma with RAS/BRAF mutations is frequently associated with a complex karyotype, advanced stage disease, and poorer prognosis. *Cancer Med* 12: 14293–14304, 2023. doi: 10.1002/CAM4.6103.
190. **Zheng S, Wang X, Zhao D, Liu H, Hu Y.** Calcium homeostasis and cancer: insights from endoplasmic reticulum-centered organelle communications. *Trends Cell Biol* 33: 312–323, 2023. doi: 10.1016/J.TCB.2022.07.004/ATTACHMENT/186F6D15-ADF3-482A-B5EB-83F0956D2057/MMC1.DOCX.
191. **Heged L, as Garay T, Moln ar E, Varga K, Bilecz A, Pad anyi R, aszty KP, Wolf M, Grusch M, allay K, asz BD, Berger W, asz Heged B, Enyedi A.** The plasma membrane Ca 21 pump PMCA4b inhibits the migratory and metastatic activity of BRAF mutant melanoma cells. .
192. **Naffa R, Padányi R, Ignácz A, Hegyi Z, Jezsó B, Tóth S, Varga K, Homolya L, Hegedűs L, Schlett K, Enyedi A.** The Plasma Membrane Ca²⁺ Pump PMCA4b Regulates Melanoma Cell Migration through Remodeling of the Actin Cytoskeleton. *Cancers (Basel)* 13: 1354, 2021. doi: 10.3390/CANCERS13061354.
193. **Prasad AM, Nuno DW, Koval OM, Ketsawatsomkron P, Li W, Li H, Shen FY, Joiner MLA, Kutschke W, Weiss RM, Sigmund CD, Anderson ME, Lamping KG, Grumbach IM.** Differential control of calcium homeostasis and vascular reactivity by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)* 62: 434–441, 2013. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01508.
194. **Murthy S, Koval OM, Ramiro Diaz JM, Kumar S, Nuno D, Scott JA, Allamargot**

- C, Zhu LJ, Broadhurst K, Santhana V, Kutschke WJ, Irani K, Lamping KG, Grumbach IM.** Endothelial CaMKII as a regulator of eNOS activity and NO-mediated vasoreactivity. *PLoS One* 12: e0186311, 2017. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0186311.
195. **Schneider JC, El Kebir D, Chéreau C, Lanone S, Huang XL, De Buys Roessingh AS, Mercier JC, Dall'Ava-Santucci J, Dinh-Xuan AT.** Involvement of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in endothelial NO production and endothelium-dependent relaxation. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 284: 2311–2319, 2003. doi: 10.1152/AJPHEART.00932.2001/ASSET/IMAGES/LARGE/H40632292008.JPEG.
 196. **Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R.** Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res* 88, 2001. doi: 10.1161/HH1101.092677/ASSET/B125159A-E940-43B8-876D-9FD32F777882/ASSETS/GRAPHIC/HH1111587009.JPEG.
 197. **Kobayashi T, Nemoto S, Ishida K, Taguchi K, Matsumoto T, Kamata K.** Involvement of CaM kinase II in the impairment of endothelial function and eNOS activity in aortas of Type 2 diabetic rats. *Clin Sci (Lond)* 123: 375–386, 2012. doi: 10.1042/CS20110621.
 198. **Cesi G, Walbrecq G, Zimmer A, Kreis S, Haan C.** ROS production induced by BRAF inhibitor treatment rewires metabolic processes affecting cell growth of melanoma cells. *Mol Cancer* 16: 102, 2017. doi: 10.1186/S12943-017-0667-Y.
 199. **Bauer D, Werth F, Nguyen HA, Kiecker F, Eberle J.** Critical role of reactive oxygen species (ROS) for synergistic enhancement of apoptosis by vemurafenib and the potassium channel inhibitor TRAM-34 in melanoma cells. *Cell Death Dis* 2017 82 8: e2594–e2594, 2017. doi: 10.1038/cddis.2017.6.
 200. **Olkowicz M, Karas A, Berkowicz P, Kaczara P, Jasztal A, Kurylowicz Z, Fedak F, Rosales-Solano H, Roy KS, Kij A, Buczek E, Pawliszyn J, Chlopicki S.** Upregulation of ALOX12-12-HETE pathway impairs AMPK-dependent modulation of vascular metabolism in ApoE/LDLR-/- mice. *Pharmacol Res* 210, 2024. doi: 10.1016/J.PHRS.2024.107478.
 201. **Brookes PS.** Mitochondrial H⁺ leak and ROS generation: An odd couple. *Free Radic Biol Med* 38: 12–23, 2005. doi: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2004.10.016.
 202. **Waldschmidt JM, Kloeber JA, Anand P, Frede J, Kokkalis A, Dimitrova V, Potdar S, Nair MS, Vijaykumar T, Im NG, Guillaumet-Adkins A, Chopra N, Stuart H, Budano L, Sotudeh N, Guo G, Grassberger C, Yee AJ, Laubach JP, Richardson PG, Anderson KC, Raje NS, Knoechel B, Lohr JG.** Single-cell profiling reveals metabolic reprogramming as a resistance mechanism in BRAF-mutated multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 27: 6432–6444, 2021. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-21-2040.
 203. **Jain SS, Paglialunga S, Vigna C, Ludzki A, Herbst EA, Lally JS, Schrauwen P, Hoeks J, Tupling AR, Bonen A, Holloway GP.** High-Fat Diet-Induced Mitochondrial Biogenesis Is Regulated by Mitochondrial-Derived Reactive Oxygen Species Activation of CaMKII. *Diabetes* 63: 1907–1913, 2014. doi: 10.2337/DB13-0816.

204. **Mollova MY, Katus HA, Backs J.** Regulation of CaMKII signaling in cardiovascular disease. *Front Pharmacol* 6: 154843, 2015. doi: 10.3389/FPHAR.2015.00178/BIBTEX.
205. **De Nicolo B, Cataldi-Stagetti E, Diquigiovanni C, Bonora E.** Calcium and Reactive Oxygen Species Signaling Interplays in Cardiac Physiology and Pathologies. *Antioxidants* 12: 353, 2023. doi: 10.3390/ANTIOX12020353.
206. **Backs J.** CaMKII Transforms Glucose Into Reactive Oxygen Species. *Circ Res* 126: 1327–1329, 2020. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.316982/ASSET/BFF7F6A4-32CB-4CF9-AFF5-32DA76FE8AD4/ASSETS/IMAGES/LARGE/CIRCRESAHA.120.316982.FIG01.JPG .
207. **Pandey D, Gratton JP, Rafikov R, Black SM, Fulton DJR.** Calcium/calmodulin-dependent kinase II mediates the phosphorylation and activation of NADPH oxidase 5. *Mol Pharmacol* 80: 407–415, 2011. doi: 10.1124/MOL.110.070193.
208. **Chen F, Yu Y, Haigh S, Johnson J, Lucas R, Stepp DW, Fulton DJR.** Regulation of NADPH oxidase 5 by protein kinase C isoforms. *PLoS One* 9, 2014. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0088405.
209. **Burgoyne JR, Eaton P.** Oxidant Sensing by Protein Kinases A and G Enables Integration of Cell Redox State with Phosphoregulation. *Sensors 2010, Vol 10, Pages 2731–2751* 10: 2731–2751, 2010. doi: 10.3390/S100402731.
210. **Balligand JL.** Heat shock protein 90 in endothelial nitric oxide synthase signaling: Following the lead(er)? *Circ Res* 90: 838–841, 2002. doi: 10.1161/01.RES.0000018173.10175.FF/ASSET/84E4E877-8C6F-479C-BAEC-6F9AFC544379/ASSETS/GRAPHIC/G4FF1.JPEG.
211. **Vicari RM, Chaitman B, Keefe D, Smith WB, Chrysant SG, Tonkon MJ, Bittar N, Weiss RJ, Morales-Ballejo H, Thadani U.** Efficacy and Safety of Fasudil in Patients With Stable Angina: A Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 2 Trial. *J Am Coll Cardiol* 46: 1803–1811, 2005. doi: 10.1016/J.JACC.2005.07.047.
212. **Shi J, Wei L.** Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology: the effect of fasudil. *J Cardiovasc Pharmacol* 62: 10.1097/FJC.0b013e3182a3718f, 2013. doi: 10.1097/FJC.0B013E3182A3718F.
213. **Zhu Q, Hao L, Shen Q, Pan J, Liu W, Gong W, Hu L, Xiao W, Wang M, Liu X, Ding Y, Lu G.** CaMK II Inhibition Attenuates ROS Dependent Necroptosis in Acinar Cells and Protects against Acute Pancreatitis in Mice. *Oxid Med Cell Longev* 2021, 2021. doi: 10.1155/2021/4187398.
214. **Pellicena P, Schulman H.** CaMKII inhibitors: from research tools to therapeutic agents. *Front Pharmacol* 5, 2014. doi: 10.3389/FPHAR.2014.00021.
215. **CaMKII-IN-1 | CaMK Inhibitor | MedChemExpress [Online].** https://www.medchemexpress.com/CaMKII-IN-1.html?srsltid=AfmBOorq6BSa65vJ7E0mUzExn1LwfzuGt5b0SARbN1_iNdiaBiK8Ao6G [24 Jan. 2025].
216. **Qu J, Mei Q, Niu R.** Oxidative CaMKII as a potential target for inflammatory disease

- (Review). *Mol Med Rep* 20: 863–870, 2019. doi: 10.3892/mmr.2019.10309.
217. **Huynh K.** Ruxolitinib is a CaMKII inhibitor that can be repurposed to prevent arrhythmias. *Nat Rev Cardiol* 2023 209 20: 580–580, 2023. doi: 10.1038/s41569-023-00910-1.
 218. **Guo Q, Huo Y, Liu Q, Zhou S, Xiao Y.** Ruxolitinib as a CaMKII inhibitor for treatment of cardiac arrhythmias: Applications and prospects. *Hear Rhythm* 22: 231–239, 2025. doi: 10.1016/J.HRTHM.2024.07.118.
 219. **Schwartz DM, Kanno Y, Villarino A, Ward M, Gadina M, O’Shea JJ.** JAK inhibition as a therapeutic strategy for immune and inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 17: 78, 2017. doi: 10.1038/NRD.2017.267.
 220. **Knock GA.** NADPH oxidase in the vasculature: Expression, regulation and signalling pathways; role in normal cardiovascular physiology and its dysregulation in hypertension. *Free Radic Biol Med* 145: 385–427, 2019. doi: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2019.09.029.
 221. **Sylvester AL, Zhang DX, Ran S, Zinkevich NS.** Inhibiting NADPH Oxidases to Target Vascular and Other Pathologies: An Update on Recent Experimental and Clinical Studies. *Biomolecules* 12: 823, 2022. doi: 10.3390/BIOM12060823.
 222. **Bedard K, Krause KH.** The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87: 245–313, 2007. doi: 10.1152/PHYSREV.00044.2005.
 223. **Nazari B, Jaquet V, Krause KH.** NOX family NADPH oxidases in mammals: Evolutionary conservation and isoform-defining sequences. *Redox Biol* 66: 102851, 2023. doi: 10.1016/J.REDOX.2023.102851.
 224. **Boshtam M, Kouhpayeh S, Amini F, Azizi Y, Najaflu M, Shariati L, Khanahmad H.** Anti-inflammatory effects of apocynin: a narrative review of the evidence. *All Life* 14: 997–1010, 2021. doi: 10.1080/26895293.2021.1990136/ASSET/D1C1C514-8EDF-44E4-B0B9-34F0B1A4FD1E/ASSETS/IMAGES/TFLS_A_1990136_F0001_OC.JPG.
 225. **Invernizzi P, Carbone M, Jones D, Levy C, Little N, Wiesel P, Nevens F.** Setanaxib, a first-in-class selective NADPH oxidase 1/4 inhibitor for primary biliary cholangitis: A randomized, placebo-controlled, phase 2 trial. *Liver Int* 43: 1507–1522, 2023. doi: 10.1111/LIV.15596.
 226. **Zinovkin RA, Lyamzaev KG, Chernyak B V.** Current perspectives of mitochondria-targeted antioxidants in cancer prevention and treatment. *Front Cell Dev Biol* 11: 1048177, 2023. doi: 10.3389/FCELL.2023.1048177/BIBTEX.
 227. **Wang PF, Xie K, Cao YX, Zhang A.** Hepatoprotective Effect of Mitochondria-Targeted Antioxidant Mito-TEMPO against Lipopolysaccharide-Induced Liver Injury in Mouse. *Mediators Inflamm* 2022: 6394199, 2022. doi: 10.1155/2022/6394199.
 228. **Arulkumaran N, Pollen SJ, Tidswell R, Gaupp C, Peters VBM, Stanzani G, Snow TAC, Duchon MR, Singer M.** Selective mitochondrial antioxidant MitoTEMPO reduces renal dysfunction and systemic inflammation in experimental sepsis in rats. *Br J Anaesth* 127: 577–586, 2021. doi: 10.1016/J.BJA.2021.05.036.

229. **Ni R, Cao T, Xiong S, Ma J, Fan GC, Lacefield JC, Lu Y, Tissier S Le, Peng T.** Therapeutic inhibition of mitochondrial reactive oxygen species with mito-TEMPO reduces diabetic cardiomyopathy. *Free Radic Biol Med* 90: 12–23, 2016. doi: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2015.11.013.
230. **Dikalova AE, Bikineyeva AT, Budzyn K, Nazarewicz RR, McCann L, Lewis W, Harrison DG, Dikalov SI.** Therapeutic Targeting of Mitochondrial Superoxide in Hypertension. *Circ Res* 107: 106, 2010. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.214601.
231. **Tambe PK, Mathew AJ, Bharati S.** Cardioprotective potential of mitochondria-targeted antioxidant, mito-TEMPO, in 5-fluorouracil-induced cardiotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol* 91: 389, 2023. doi: 10.1007/S00280-023-04529-4.
232. **Neuzil J, Rohlena J, Werner L, Bielikova Z.** MitoTam-01 Trial: Mitochondrial Targeting as Plausible Approach to Cancer Therapy. Comment on Yap et al. Complex I Inhibitor of Oxidative Phosphorylation in Advanced Solid Tumors and Acute Myeloid Leukemia: Phase I Trials. *Nat. Med.* 2023, 29, 115–126. *Cancers* 2023, Vol 15, Page 4476 15: 4476, 2023. doi: 10.3390/CANCERS15184476.
233. **Albertini MC, Ozawa Y, Lichtenberg D, Haroutounian SA, Omaye S, Luo M, Zhou L, Huang Z, Li B, Nice EC, Xu J, Huang C.** Antioxidant Therapy in Cancer: Rationale and Progress. *Antioxidants* 11: 1128, 2022. doi: 10.3390/ANTIOX11061128.
234. **Harris IS, DeNicola GM.** The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer. *Trends Cell Biol* 30: 440–451, 2020. doi: 10.1016/J.TCB.2020.03.002.
235. **Ambrosone CB, Zirpoli GR, Hutson AD, McCann WE, McCann SE, Barlow WE, Kelly KM, Cannioto R, Sucheston-Campbell LE, Hershman DL, Unger JM, Moore HCF, Stewart JA, Isaacs C, Hobday TJ, Salim M, Hortobagyi GN, Gralow JR, Budd GT, Albain KS.** Dietary supplement use during chemotherapy and survival outcomes of patients with breast cancer enrolled in a cooperative group clinical trial (SWOG S0221). *J Clin Oncol* 38: 804–814, 2020. doi: 10.1200/JCO.19.01203/ASSET/CD986CAB-1C8B-4F7A-B66C-1498A08DD94C/ASSETS/IMAGES/LARGE/JCO.19.01203TA3.JPG.
236. **Pizzimenti S, Ribero S, Cucci MA, Grattarola M, Monge C, Dianzani C, Barrera G, Muzio G.** Oxidative Stress-Related Mechanisms in Melanoma and in the Acquired Resistance to Targeted Therapies. *Antioxidants* 10: 1942, 2021. doi: 10.3390/ANTIOX10121942.
237. **Vincent DT, Ibrahim YF, Espey MG, Suzuki YJ.** The role of antioxidants in the era of cardio-oncology. *Cancer Chemother Pharmacol* 72: 1157, 2013. doi: 10.1007/S00280-013-2260-4.
238. **Gal K Le, Ibrahim MX, Wiel C, Sayin VI, Akula MK, Karlsson C, Dalin MG, Akyürek LM, Lindahl P, Nilsson J, Bergo MO.** Antioxidants can increase melanoma metastasis in mice. *Sci Transl Med* 7, 2015. doi: 10.1126/SCITRANSLMED.AAD3740.
239. **Miura K, Green AC.** Dietary Antioxidants and Melanoma: Evidence from Cohort and Intervention Studies. *Nutr Cancer* 67: 867–876, 2015. doi: 10.1080/01635581.2015.1053499.

240. **Piskounova E, Agathocleous M, Murphy MM, Hu Z, Huddlestun SE, Zhao Z, Leitch AM, Johnson TM, DeBerardinis RJ, Morrison SJ.** Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. *Nature* 527: 186, 2015. doi: 10.1038/NATURE15726.
241. **Queirolo P, Spagnolo F, Picasso V, Spano L, Tanda E, Fontana V, Giorello L, Merlo DF, Simeone E, Grimaldi AM, Curvietto M, Del Vecchio M, Bruzzi P, Ascierto PA.** Combined vemurafenib and fotemustine in patients with BRAF V600 melanoma progressing on vemurafenib. *Oncotarget* 9: 12408–12417, 2016. doi: 10.18632/ONCOTARGET.10589.

SPIS PUBLIKACJI AUTORKI

Publikacje związane z rozprawą doktorską:

1. **Buczek E**, Denslow A, Mateuszuk L, Proniewski B, Wojcik T, Sitek B, Fedorowicz A, Jasztal A, Kus E, Chmura- Skirlinska A, Gurbiel R, Wietrzyk J, Chlopicki S *Alterations in NO- and PGI₂- dependent function in aorta in the orthotopic murine model of metastatic 4T1 breast cancer: Relationship with pulmonary endothelial dysfunction and systemic inflammation*. BMC Cancer, 2018
2. **Buczek E**, Bar A, Karas A, Pyka J, Marczyk B, Gdula A, Maleki EH, Kaczara P, Pandian K, Rocchetti S, Smęda M, Chlopicki S *Effect of BRAF and MEK inhibitors on the endothelial function in murine aorta in vivo and ex vivo* – manuskrypt w przygotowaniu

Pozostałe publikacje:

1. Chlopicki S, Kij A, Kieronska-Rudek A, Bar A, Czyzyska-Cichon I, Strus M, Kozien L, Wiecek G, Zeber-Lubecka N, Kulecka M, Kwiatkowski G, Przyborowski K, Mohaissen T, Sternak M, **Buczek E**, Zakrzewska A, Proniewski B, Kus K, Franczyk-Zarow M, Kostogrys RB, Pieterman EJ, Princen HMG *Low phylloquinone intake deteriorates endothelial function in normolipidemic and dyslipidaemic mice*. Journal of Nutritional Biochemistry, 2025
2. Olkiewicz M, Karas A, Berkowicz P, Kaczara P, Jasztal A, Kuryłowicz Z, Fedak F, Rosales-Solano H, Roy K S, Kij A, **Buczek E**, Pawliszyn J, Chlopicki S *Upregulation of ALOX12-12-HETE pathway impairs AMPK-dependent modulation of vascular metabolism in ApoE/LDLR^{-/-} mice* Pharmacological Research, 2024
3. Karas A, Bar A, Pandian K, Jasztal A, Kuryłowicz Z, Kutryb-Zajac B, **Buczek E**, Rocchetti S, Mohaissen T, Jędrzejewska A, Harms AC, Kaczara P, Stefan Chlopicki S *Functional deterioration of vascular mitochondrial and glycolytic capacity in the aortic rings of aged mice*. GeroScience, 2024

4. **Kij A, Bar A, Czyzyska-Cichon I, Przyborowski K, Proniewski B, Mateuszuk L, Kurylowicz Z, Jaształ A, Buczek E, Kurpinska A, Suraj-Prazmowska J, Marczyk B, Matyjaszczyk-Gwarda K, Daiber A, Oelze M, Walczak M, Chlopicki S** Vascular protein disulfide isomerase A1 mediates endothelial dysfunction induced by angiotensin II in mice. *Acta Physiologica*, 2024
5. **Kieronska-Rudek A, Kij A, Bar A, Kurpinska A, Mohaissen T, Grosicki M, Stojak M, Sternak M, Buczek E, Proniewski B, Kuś K, Suraj-Prazmowska J, Panek A, Pietrowska M, Zapotoczny S, Shanahan CM, Szabo C, Chlopicki S** Phylloquinone improves endothelial function, inhibits cellular senescence, and vascular inflammation. *GeroScience*, 2024
6. **Mohaissen T, Kij A, Bar A, Marczyk B, Wojnar-Lason K, Buczek E, Karas A, Garcia-Redondo AB, Briones AM, Chlopicki S** Chymase-independent vascular Ang-(1–12)/Ang II pathway and TXA2 generation are involved in endothelial dysfunction in the murine model of heart failure. *European Journal of Pharmacology*, 2024
7. **Dutka M, Garczorz W, Kosowska A, Buczek E, Godek P, Wojakowski W, Francuz T,** Osteoprotegerin is essential for the development of endothelial dysfunction induced by angiotensin II in mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024
8. **Smeda M, Stojak M, Przyborowski K, Sternak M, Suraj-Prazmowska J, Kus K, Derszniak K, Jaształ A, Kij A, Kurpinska A, Kieronska-Rudek A, Wojnar-Lason K, Buczek E, Mohaissen T, Chlopicki S** Direct thrombin inhibitor dabigatran compromises pulmonary endothelial integrity in a murine model of breast cancer metastasis to the lungs; the role of platelets and inflammation-associated haemostasis. *Frontiers in Pharmacology*, 2022
9. **Proniewski B, Bar A, Kieronska-Rudek A, Suraj-Prazmowska J, Buczek E, Czamara K, Majka Z, Czyzyska-Cichon I, Kwiatkowski G, Matyjaszczyk-Gwarda K, Chlopicki S** Systemic Administration of Insulin Receptor Antagonist Results in Endothelial and Perivascular Adipose Tissue Dysfunction in Mice. *Cells*, 2021
10. **Fedorowicz A, Buczek E, Mateuszuk L, Czarnowska E, Sitek B, Jaształ A, Chmura-Skirlińska A, Dib M, Steven S, Daiber A, Chlopicki S** *Comparison of Pulmonary and Systemic NO- and PGI2-Dependent Endothelial Function in Diabetic Mice*. *Oxid Med Cell Longev*, 2018

11. Staniszevska-Slezak E, Wiercigroch E, Fedorowicz A, **Buczek E**, Mateuszuk L, Baranska M, Chlopicki S, Malek K. A possible Fourier transform infrared-based plasma fingerprint of angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced reversal of endothelial dysfunction in diabetic mice. *J Biophotonics*, 2018
12. Smeda M, Kieronska A, Adamski MG, Proniewski B, Sternak M, Mohaissen T, Przyborowski K, Derszniak K, Kaczor D, Stojak M, **Buczek E**, Jasztal A, Wietrzyk J, Chlopicki S *Nitric oxide deficiency and endothelial-mesenchymal transition of pulmonary endothelium in the progression of 4T1 metastatic breast cancer in mice*. *Breast Cancer Res*, 2018
13. Smeda M, Kieronska A, Proniewski B, Jasztal A, Selmi A, Wandzel K, Zakrzewska A, Wojcik T, Przyborowski K, Derszniak K, Stojak M, Kaczor D, **Buczek E**, Watala C, Wietrzyk J, Chlopicki S *Dual antiplatelet therapy with clopidogrel and aspirin increases mortality in 4T1 metastatic breast cancer-bearing mice by inducing vascular mimicry in primary tumour*. *Oncotarget*, 2018
14. Chrabaszc K, Kochan K, Fedorowicz A, Jasztal A, **Buczek E**, Leslie LS, Bhargava R, Malek K, Chlopicki S, Marzec KM *FT-IR- and Raman-based biochemical profiling of the early stage of pulmonary metastasis of breast cancer in mice*. *Analyst*, 2018
15. Smeda M, Przyborowski K, Proniewski B, Zakrzewska A, Kaczor D, Stojak M, **Buczek E**, Nieckarz Z, Zoladz JA, Wietrzyk J, Chlopicki S *Breast cancer pulmonary metastasis is increased in mice undertaking spontaneous physical training in the running wheel; a call for revising beneficial effects of exercise on cancer progression*. *American Journal of Cancer Research*, 2017
16. Pacia MZ, **Buczek E**, Blazejczyk A, Gregorius A, Wietrzyk J, Chlopicki S, Baranska M, Kaczor A *3D Raman imaging of systemic endothelial dysfunction in the murine model of metastatic breast cancer*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016
17. Pacia MZ, Mateuszuk Ł, **Buczek E**, Chlopicki Stefan, Błażejczyk A, Wietrzyk J, Barańska M, Kaczor A *Rapid biochemical profiling of endothelial dysfunction in diabetes, hypertension and cancer metastasis by hierarchical cluster analysis of Raman spectra*. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2016

18. Jezkova K, Rathouska J, Nemeckova I, Fikrova P, Dolezelova E, Varejckova M, Vitverova B, Tysonova K, Serwaczak A, Buczek E, Bernabeu C, Lopez-Novoa JM, Chlopicki S, Nachtigal P High levels of soluble endoglin induce a proinflammatory and oxidative-stress phenotype associated with preserved NO-dependent vasodilatation in aortas from mice fed a high-fat diet. *Journal of Vascular Research*, 2016
19. Wojcik T, Buczek E, Majzner K, Kolodziejczyk A, Miszczyk J, Kaczara P, Kwiatek W, Baranska M, Szymonski M, Chlopicki S. Comparative endothelial profiling of doxorubicin and daunorubicin in cultured endothelial cells. *Toxicology in Vitro*, 2015
20. Maslak E, Buczek E, Szumny A, Szczepinski W, Franczyk-Zarow M, Kopec A, Chlopicki S, Leszczynska T, Kostogrys RB. Individual CLA isomers, c9t11 and t10c12, prevent excess liver glycogen storage and inhibit lipogenic genes expression induced by high-fructose diet in rats *BioMed Research International*, 2015
21. Chlopicki S, Lomnicka M, Fedorowicz A, Grochal E, Kramkowski K, Mogielnicki A, Buczek W, Motterlini R Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs): comparison with NO donors *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2012
22. Mackiewicz U, Czarnowska E, Brudek M, Pająk B, Duda M, Emanuel K, Csanyi G, Fedorowicz A, Grochal E, Tyrankiewicz U, Skórka T, Mende U, Lewartowski B, Chlopicki S Preserved cardiomyocyte function and altered desmin pattern in transgenic mouse model of dilated cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2012
23. Kramkowski K, Leszczynska A, Mogielnicki A, Chlopicki S, Fedorowicz A, Grochal E, Mann B, Brzoska T, Urano T, Motterlini R, Buczek W Antithrombotic properties of water-soluble carbon monoxide-releasing molecules. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2012