

Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we
Wrocławiu

Wydział Nauk Medycznych

lek. Agata Forkasiewicz

**Rola białka LDH-A w ucieczce przed
apoptozą komórek raka przelyku w
odpowiedzi na TNF- α**

Rozprawa doktorska
napisana pod kierunkiem
Dr hab. Katarzyny Augoff

Wrocław, 2023

Streszczenie

Rak przełyku, plasujący się na ósmym miejscu co do częstości występowania na świecie, jest jednym z najbardziej agresywnych nowotworów złośliwych. Cechuje się niską przeżywalnością i szybkim przerzutowaniem. Wyróżnia się jego dwa główne typy histologiczne: rak płaskonabłonkowy (ESCC) i gruczolakorak (EAC). Rak płaskonabłonkowy, będący najczęściej diagnozowanym typem ogółem na świecie, dominuje w krajach rozwijających się, podczas gdy rak gruczolowy jest dominującym typem w krajach rozwiniętych, zwłaszcza w Ameryce i w Europie, w tym w Polsce.

W patogenezie raka przełyku bierze udział wiele czynników, włączając stan zapalny, obecnie uznawany za jeden z dziesięciu znaków szczególnych nowotworów.

Wśród mediatorów stanu zapalnego, uwalnianych do mikrośrodowiska guza i uważanych za kluczowe dla rozwoju nowotworów są cytokiny, wśród których jedną z najlepiej poznanych jest czynnik martwicy nowotworów α (TNF- α).

TNF- α , jak większość cytokin, charakteryzuje się działaniem plejotropowym. Z jednej strony ma zdolność indukcji apoptozy (zaprogramowanej śmierci komórki) lub nekrozy, procesów prowadzących do śmierci komórki. Z drugiej strony wiadomo, że poprzez aktywację ścieżki sygnałowej związanej z NF κ B stymuluje komórki w kierunku proliferacji, promując ich przeżycie, co w przypadku nowotworów przekłada się na progresję choroby. Jak pokazały ostatnie badania, jednym z najważniejszych działań TNF- α w kontekście inwazji i przerzutowania nowotworów jest zdolność do indukcji ekspresji i aktywacji białek proteolitycznych, przede wszystkim metaloproteinazy macierzy 9 (MMP9), której podwyższone poziomy charakteryzują większość nowotworów i korelują z ich inwazyjnością i przerzutowaniem. Wiadomo też, że TNF- α ma wpływ na regulację metabolizmu lipidów i komórkowej homeostazy glukozy. Są dowody, że działając jako potencjalny induktor efektu Warburga, może odgrywać istotną rolę w przeprogramowaniu metabolicznym komórek nowotworowych, w którym kluczowym enzymem jest dehydrogenaza mleczanowa (LDH), odpowiadająca nie tylko za dostosowanie komórek nowotworowych do specyficznych wymagań metabolicznych ale też za wzrost kwasowości mikrośrodowiska guza, co sprzyja inwazji, neoangiogenezie, przerzutowaniu, immunosupresji i oporności na leczenie.

Mechanizmy, które determinują pro- i antyapoptotyczny efekt TNF- α na komórki nie są jasne. Pytanie więc, czy zmiany metaboliczne związane z adaptacją metabolizmu zależnego od LDH przez komórki nowotworowe mają wpływ na zdolność przełączania ścieżki transmisji sygnału stymulowanego przez TNF- α z prowadzącego do apoptozy na promujący przeżycie,

pozostaje otwarte. Dlatego celem tej pracy była próba oceny udziału LDH, w szczególności podjednostki A (LDHA), w ucieczce komórek nowotworowych przed apoptozą, indukowaną cytokiną prozapalną TNF- α , na przykładzie komórek raka przełyku.

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem danych, zgromadzonych w internetowej bazie TNMplot, dotyczących poziomu ekspresji wybranych genów (*LDHA*, *LDHB*, *TNFA*, *TNFRSF1A*, *TNFRSF1B* oraz *MMP9*) w guzach pierwotnych przełyku i tkankach przerzutowych; materiału klinicznego w formie preparatów parafinowych raka przełyku, barwionych metodą immunohistochemii (IHC); oraz linii komórkowych, KYSE150 oraz EC7, reprezentujących odpowiednio płaskonabłonkowego raka przełyku oraz gruczolakoraka przełyku, które analizowano za pomocą testów komórkowych takich jak: test żywotności (MTT), proliferacji, migracji, senescencji i apoptozy (przy użyciu cytometrii przepływownej), oraz takich metod jak: elektroforeza w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) i natywnych (zymografia), Western blotting, reakcja łańcuchowa polimerazy (qPCR) i kolorymetryczny pomiar stężenia mleczanu. W celu zahamowania aktywności LDHA w komórkach raka przełyku użyto specyficznego dla LDHA inhibitora, oksamatu sodu (SO) i wyciszono ekspresję genu *LDHA* za pomocą siRNA.

Wykazano, że ekspresja *LDHA* była znacząco zwiększona w tkankach guzów pierwotnych ($p < 0,00001$) i znacząco zmniejszona ($p < 0,00001$) w tkankach przerzutowych w porównaniu z tkankami prawidłowymi. Ekspresja *LDHB* zwiększała się istotnie w tkankach guzów pierwotnych ($p < 0,00001$) oraz w tkankach przerzutowych ($p < 0,05$) w porównaniu z tkankami prawidłowymi. Ekspresja *TNFA* w tkankach guzów pierwotnych nie różniła się od tej w tkankach prawidłowych ($p > 0,05$) ale zwiększała się znacząco w tkankach przerzutowych ($p < 0,00001$). Ekspresja genu kodującego receptor 1 TNF- α , *TNFRSF1A*, w tkankach guzów pierwotnych nieznacznie się zmniejszała, a w tkankach przerzutowych nie zmieniła się w porównaniu z tkankami prawidłowymi ($p > 0,05$). Ekspresja genu kodującego receptor 2 TNF- α , *TNFRSF1B*, w tkankach guzów pierwotnych nie różniła się od tej w tkankach prawidłowych, ale zwiększyła się istotnie w tkankach przerzutowych ($p < 0,00001$). Ekspresja *MMP9* zwiększała się istotnie zarówno w tkankach guzów pierwotnych ($p < 0,00001$) jak i w tkankach przerzutowych ($p < 0,00001$) w porównaniu z tkankami prawidłowymi, przy czym poziom ekspresji *MMP9* w tkankach przerzutowych był istotnie większy niż w tkankach pierwotnych ($p < 0,00001$). Analiza zmian ekspresji LDHA na poziomie białka, oznaczonego metodą IHC, w tkankach nowotworowych przełyku (N=10) wykazała istotnie większy poziom w porównaniu z histologicznie prawidłowym nabłonkiem przełyku (N=10), pochodzącym z marginesu resekcji ($p < 0,00001$).

Wykorzystując metodę RT-qPCR do analizy zmian ekspresji *LDHA* i *LDHB* w odpowiedzi na TNF- α w warunkach *in vitro* wykazano, że traktowanie komórek KYSE150 TNF- α powodowało istotne zwiększenie ekspresji obu podjednostek (FC=1,98 \pm 0,08 i 1,88 \pm 0,2, odpowiednio dla LDHA i LDHB, p<0,005). W przypadku EC7 traktowanie TNF- α znacząco zwiększyło ekspresję LDHA (FC= 2,28 \pm 0,26; p<0,001) ale nie LDHB (FC=1,47 \pm 0,39; p>0,05). Analiza poziomu LDHA i LDHB za pomocą metody Western blotting pokazała brak pozytywnej reakcji dla LDHB w EC7 co było zgodne z izoenzymogramem LDH. W komórkach KYSE150 obserwowano aktywność wszystkich izoenzymów LDH (LD1-LD5), natomiast w komórkach EC7 aktywna była tylko izoforma LD5, zbudowana z podjednostek A.

Analiza ilościowa apoptozy metodą cytometrii przepływownej, w populacji komórek EC7 transfekowanych siRNA LDHA i traktowanych TNF- α (30 ng/ml/24h) wykazała, że wyciszenie ekspresji LDHA nie uwrażliwiło komórek raka przełyku na proapoptotyczne działanie TNF- α . Całkowita liczba komórek apoptotycznych w populacji komórek z wyciszoną ekspresją LDHA i traktowanych TNF- α (7,75%) nie zmieniła się znacząco w porównaniu z komórkami kontrolnymi (8,8% i 9,19%, odpowiednio transfekowanych siRNA kontrolnym i nietransfekowanych). Podobnie, hamowanie aktywności LDHA za pomocą SO (50 mM/48h) nie uwrażliwiło komórek EC7 na proapoptotyczne działanie TNF- α . Całkowita liczba komórek apoptotycznych w populacji komórek traktowanych SO i TNF- α (16,41%) nie zmieniła się znacząco w porównaniu z komórkami kontrolnymi (19,28%, traktowanymi wyłącznie SO). Efekt ten został potwierdzony w badaniach z użyciem metody Western blotting, oceniających zmiany w aktywacji markerów apoptozy. Zmniejszanie aktywności LDHA, zarówno za pomocą siRNA, jak i SO, w KYSE150 i EC7 nie powodowało aktywacji kaspazy 8 i kaspazy 3 oraz PARP1 w odpowiedzi na TNF- α .

Analiza procentowego udziału komórek pozytywnie barwiących się w kierunku lizosomalnej β -galaktozydazy w populacji komórek traktowanych SO i TNF- α (12,5 \pm 1,9%) wykazała brak różnic statystycznych (p>0,05) w stosunku do populacji komórek traktowanych wyłącznie SO (11,3 \pm 1,5%) co pokazało, że hamowanie aktywności LDHA za pomocą SO (50 mM) również nie miało wpływu na senescencję indukowaną TNF- α .

Hamowanie LDHA za pomocą SO nie miało też znaczącego wpływu na żywotność i proliferację komórek raka przełyku. Żywotność komórek KYSE150 i EC7 mierzono po 48-godzinnej ekspozycji na SO w stężeniach 25 mM i 50 mM przy użyciu testu MTT. Komórki były dodatkowo traktowane lub nie TNF- α (30 ng/ml/24h). Użycie SO samego, jak i w kombinacji z TNF- α nie powodowało znaczących zmian w żywotności komórek (p>0,05). Analiza ilościowa potencjału proliferacyjnego komórek EC7 traktowanych SO (50 mM)

wykazała, że hamujący wpływ na proliferację można było obserwować po 72 h ($p < 0,001$) i 96 h ($p < 0,005$) ale nie po 24 h ekspozycji na SO ($p > 0,05$)

Natomiast SO skutecznie hamował wydzielanie mleczanu w KYSE150 i EC7, a obserwowane różnice w stosunku do kontroli były istotne statystycznie ($p < 0,005$). Wyciszenie ekspresji genu *LDHA* za pomocą siRNA również skutkowało zmniejszeniem produkcji mleczanu w obu liniach komórkowych, jednak zmiany te były nieznaczne i statystycznie nieistotne w stosunku do kontroli ($P > 0,05$). Wyniki uzyskane w teście migracji pokazały, że SO istotnie hamował efekt indukowanej przez TNF- α (30 ng/ml) migracji komórek raka przełyku ($p < 0,005$). Podobny efekt obserwowano w komórkach z wyciszoną ekspresją LDHA. TNF- α istotnie zwiększał potencjał migracyjny komórek kontrolnych, ale nie komórek transfekowanych siRNA LDHA ($p > 0,05$).

Analizując wpływ hamowania aktywności LDHA oraz wpływ mleczanu na indukowaną przez TNF- α sekrecję i aktywację MMP9 w komórkach raka przełyku wykazano, że mleczan działa synergistycznie z TNF- α , potęgując jego efekt na sekrecję i aktywację MMP9 w komórkach KYSE150 (FC=1,38) w porównaniu z kontrolą natomiast, SO znacząco ten efekt hamuje (FC=0,47), co wykazano za pomocą zymografii żelatynowej. Wyciszenie ekspresji LDHA w KYSE150 za pomocą siRNA znacząco obniżyło sekrecję MMP9 indukowaną przez TNF- α w porównaniu z komórkami kontrolnymi, zarówno nietransfekowanymi, jak i transfekowanymi kontrolnym siRNA (odpowiednio FC=0,79 i FC=0,5).

Podsumowując, w tej pracy wykazano, że hamowanie aktywności LDHA w komórkach raka przełyku nie odblokowuje ścieżki apoptotycznej związanej z TNF- α , a więc nie generuje zmiany odpowiedzi komórkowej na TNF- α z pronowotworowej na antynowotworową.

Udowodniono jednak, że użycie specyficznego inhibitora LDHA znosi promigracyjny efekt TNF- α na komórki raka przełyku oraz hamuje indukowaną przez TNF- α sekrecję MMP9, co wiąże się z osłabieniem aktywacji ścieżki sygnałowej związanej z Erk1/2. Potwierdzono tym samym bezpośrednią zależność pomiędzy statusem metabolicznym glukozy i skutecznością odpowiedzi komórek nowotworowych na pronowotworowe działanie TNF- α , jednej z głównych cytokin prozapalnych, związanych z kancerogenezą i progresją nowotworową.

Udowodniono ponadto skuteczność SO w hamowaniu sekrecji mleczanu oraz jego antyproliferacyjne działanie na komórki raka przełyku. Uzyskane w tej pracy wyniki dają podstawę do rozważenia zastosowania inhibitora LDHA w projektowaniu terapii uzupełniającej u pacjentów z rakiem przełyku.

Abstract

Esophageal cancer, the eighth most common cancer in the world, is one of the most aggressive malignancies. It is characterized by low survival rate and rapid metastasis. There are two main histological types: squamous cell carcinoma (ESCC) and adenocarcinoma (EAC). Squamous cell carcinoma, being the most commonly diagnosed type overall in the world, predominates in the developing countries, while adenocarcinoma is the dominant type in developed countries, especially in America and Europe, including Poland.

Many factors are involved in the pathogenesis of esophageal cancer, one of which is inflammation, currently recognized as one of the hallmarks of cancer.

Among the mediators of inflammation, released into the tumor microenvironment and considered crucial for the development of cancer, there are cytokines, among which one of the best known is tumor necrosis factor α (TNF- α).

TNF- α , like most cytokines, is pleiotropic. On the one hand, it has the ability to induce apoptosis (programmed cell death) or necrosis, processes leading to cell death. On the other hand, it is known that by activating the signaling pathway associated with NF κ B, it stimulates cells to proliferate, promoting their survival, which in the case of cancer leads to disease progression. As recent studies have shown, one of the most important functions of TNF- α regarding the tumor invasion and metastasis is its ability to induce the expression and activation of proteolytic proteins, primarily matrix metalloproteinase 9 (MMP9), whose elevated levels characterize most cancers and correlate with their invasiveness and metastasis. TNF- α is also known to influence the regulation of lipid metabolism and cellular glucose homeostasis. There is evidence that acting as a potential inducer of the Warburg effect, it may play an important role in the metabolic reprogramming of cancer cells, in which the key enzyme is lactate dehydrogenase (LDH), responsible not only for adapting cancer cells to specific metabolic requirements, but also for increasing the acidity of the tumor microenvironment which promotes invasion, neo-angiogenesis, metastasis, immunosuppression and treatment resistance.

The mechanisms that determine the pro- and anti-apoptotic effect of TNF- α on cells are not clear. Thus, the question of whether the metabolic changes associated with the adaptation of LDH-dependent metabolism by cancer cells affect the ability to switch the TNF- α -stimulated signaling pathway from the one leading to apoptosis to the one promoting survival remains open. Therefore, the aim of this study was to assess the role of LDH, in particular the A subunit (LDHA), in the escape of cancer cells from apoptosis, induced by the proinflammatory cytokine TNF- α , based on the example of esophageal cancer cells.

The study was conducted using data collected in the online database TNMplot, concerning the level of expression of selected genes (*LDHA*, *LDHB*, *TNFA*, *TNFRSF1A*, *TNFRSF1B* and *MMP9*) in primary esophageal tumors and metastatic tissues; clinical material in the form of paraffin preparations of esophageal cancer stained by immunohistochemistry (IHC); and cell lines, KYSE150 and EC7, representing esophageal squamous cell carcinoma and esophageal adenocarcinoma, respectively, which were analyzed by cell assays such as MTT, proliferation, migration, senescence and apoptosis (using flow cytometry), and methods such as denaturing (SDS-PAGE) and native (zymography) electrophoresis, Western blotting, polymerase chain reaction (qPCR) and colorimetric measurement of lactate concentration. To inhibit LDHA activity in esophageal cancer cells, the LDHA-specific inhibitor sodium oxamate (SO) was used and LDHA gene expression was silenced with siRNA.

It was shown that *LDHA* expression was significantly increased in primary tumor tissues ($p < 0.00001$) and significantly decreased ($p < 0.00001$) in metastatic tissues compared to normal tissues. *LDHB* expression was significantly increased in primary tumor tissues ($p < 0.00001$) and metastatic tissues ($p < 0.05$) compared to normal tissues. *TNFA* expression in primary tumor tissues did not differ from normal tissues ($p > 0.05$) but was significantly increased in metastatic tissues ($p < 0.00001$). The expression of the TNF- α receptor 1 gene, *TNFRSF1A*, was slightly decreased in primary tumor tissues and remained unchanged in metastatic tissues compared to normal tissues ($p > 0.05$). Expression of the gene encoding TNF- α receptor 2, *TNFRSF1B*, in primary tumor tissues did not differ from that in normal tissues, but was significantly increased in metastatic tissues ($p < 0.00001$). *MMP9* expression was significantly increased in both primary tumor tissues ($p < 0.00001$) and metastatic tissues ($p < 0.00001$) compared to normal tissues, with *MMP9* expression levels significantly higher in metastatic tissues than in primary tissues ($p < 0.00001$). The analysis of changes in LDHA expression at the protein level, determined by IHC, in esophageal cancer tissues (N=10) showed a significantly higher level compared to histologically normal esophageal epithelium (N=10) from the resection margin ($p < 0.00001$).

Using the RT-qPCR method to analyze changes in the expression of *LDHA* and *LDHB* in response to TNF- α in vitro, it was shown that treatment of KYSE150 cells with TNF- α significantly increased the expression of both subunits (FC=1.98 \pm 0.08 and 1.88 \pm 0.2 for LDHA and LDHB, respectively, $p < 0.005$). For EC7, TNF- α treatment significantly increased expression of LDHA (FC=2.28 \pm 0.26; $p < 0.001$) but not LDHB (FC=1.47 \pm 0.39; $p > 0.05$). Analysis of LDHA and LDHB levels by Western blotting showed no positive reaction for LDHB in EC7, which was consistent with the LDH isoenzyme. In KYSE150 cells, the activity

of all LDH isoenzymes (LD1-LD5) was observed, while in EC7 cells only the LD5 isoform, built of A subunits, was active.

Quantitative analysis of apoptosis by flow cytometry in a population of EC7 cells transfected with LDHA siRNA and treated with TNF- α (30 ng/ml/24h) showed that suppression of LDHA expression did not sensitize esophageal cancer cells to the pro-apoptotic effects of TNF- α . The total number of apoptotic cells in the population of LDHA-silenced and TNF- α -treated cells (7.75%) did not change significantly compared to control cells (8.8% and 9.19%, transfected with control siRNA and not transfected, respectively). Similarly, inhibition of LDHA activity with SO (50 mM/48 h) did not sensitize EC7 cells to the pro-apoptotic effects of TNF- α . The total number of apoptotic cells in the population of cells treated with SO and TNF- α (16.41%) did not change significantly compared to control cells (19.28%, treated with SO alone). This effect was confirmed in studies using the Western blotting method, evaluating changes in the activation of apoptosis markers. Silencing of LDHA expression by both siRNA and SO in KYSE150 and EC7 did not activate caspase 8 and caspase 3 and PARP1 in response to TNF- α .

Analysis of the percentage of cells staining positively for lysosomal β -galactosidase in the population of cells treated with SO and TNF- α ($12.5 \pm 1.9\%$) showed no statistical differences ($p > 0.05$) in relation to the population of cells treated with SO alone ($11.3 \pm 1.5\%$), which showed that inhibition of LDHA activity with SO (50 mM) also had no effect on TNF- α -induced senescence.

Inhibition of LDHA with SO also had no significant effect on the viability and proliferation of esophageal cancer cells. KYSE150 and EC7 cell viability was measured after 48-hour exposure to SO at 25 mM and 50 mM using the MTT assay. Cells were additionally treated with or without TNF- α (30 ng/ml/24h). The use of SO alone and in combination with TNF- α did not cause significant changes in cell viability ($p > 0.05$). Quantification of the proliferative potential of EC7 cells treated with SO (50 mM) showed that the inhibitory effect on proliferation could be observed after 72 h ($p < 0.001$) and 96 h ($p < 0.005$) but not after 24 h exposure to SO ($p > 0.05$).

On the other hand, SO effectively inhibited lactate secretion in KYSE150 and EC7, and the observed differences in relation to the control were statistically significant ($*p < 0.005$). Silencing of LDHA gene expression with siRNA also resulted in a decrease in lactate production in both cell lines, but these changes were small and not statistically significant compared to controls ($P > 0.05$). The results obtained in the migration test showed that SO significantly inhibited the effect of TNF- α (30 ng/ml) induced migration of esophageal cancer

cells ($p < 0.005$). A similar effect was observed in cells with suppressed LDHA expression. TNF- α significantly increased the migration potential of control cells, but not cells transfected with LDHA siRNA ($p > 0.05$).

By analyzing the effect of inhibition of LDHA activity and the effect of lactate on TNF- α -induced MMP9 secretion and activation in esophageal cancer cells, it was shown that lactate acts synergistically with TNF- α , enhancing its effect on MMP9 secretion and activation in KYSE150 cells (FC=1.38) in compared to the control, SO significantly inhibited this effect (FC=0.47), as demonstrated by gelatin zymography. Silencing of LDHA expression in KYSE150 with siRNA significantly reduced MMP9 secretion induced by TNF- α compared to control cells, both untransfected and transfected with control siRNA (FC=0.79 and FC=0.5, respectively).

In summary, this study showed that inhibition of LDHA activity in esophageal cancer cells does not unblock the apoptotic pathway associated with TNF- α , and thus does not generate a change in the cellular response to TNF- α from pro-cancer to anti-cancer.

However, it has been proven that the use of a specific LDHA inhibitor abolishes the promigratory effect of TNF- α on esophageal cancer cells and inhibits the secretion of MMP9 induced by TNF- α . Thus, a direct relationship between the metabolic status of glucose and the effectiveness of the response of cancer cells to the pro-cancer effect of TNF- α , one of the main pro-inflammatory cytokines associated with carcinogenesis and cancer progression, was confirmed.

Moreover, the effectiveness of SO in inhibiting lactate secretion and its anti-proliferative effect on esophageal cancer cells has been proven. The results obtained in this work provide grounds for considering the use of an LDHA inhibitor in the design of adjuvant therapy in patients with esophageal cancer.

Spis treści

1. Wprowadzenie
 - 1.1. Rak przełyku
 - 1.1.1. Typy histologiczne
 - 1.1.2. Występowanie
 - 1.1.3. Czynniki ryzyka
 - 1.1.3.1. Płeć i rasa
 - 1.1.3.2. Palenie i alkohol
 - 1.1.3.3. Dieta i składniki odżywcze
 - 1.1.3.4. Leki
 - 1.1.3.5. Czynniki genetyczne
 - 1.1.3.6. Choroba refluksowa przełyku i przełyk Barretta
 - 1.1.3.7. Otyłość
 - 1.1.3.8. Zapalenie
 - 1.2. Zapalenie w raku
 - 1.2.1. TNF- α jako cząsteczka sygnałowa
 - 1.2.2. Funkcja biologiczna TNF- α
 - 1.2.3. Udział TNF- α w formowaniu mikrośrodowiska nowotworowego
 - 1.2.4. Wpływ TNF- α na metabolizm komórek
 - 1.2.5. Wpływ TNF- α na migrację i przerzutowanie komórek nowotworowych
 - 1.3. Przeprogramowanie metaboliczne w transformacji nowotworowej
 - 1.3.1. Rola LDH w efekcie Warburga
2. Cel pracy
3. Prace związane z niniejszą rozprawą
4. Wyniki
 - 4.1. Ekspresja *LDHA*, *LDHB*, *TNFA*, *TNFRSF1A*, *TNFRSF1B* oraz *MMP9* jest zaburzona w raku przełyku
 - 4.2. TNF- α indukuje wzrost ekspresji genów *LDHA* i *LDHB*
 - 4.3. Wyciszenie ekspresji genu *LDHA* nie powoduje uwrażliwienia komórek raka przełyku na proapoptotyczne działanie TNF- α
 - 4.4. Oksamat sodu (SO) nie odblokowuje mechanizmów apoptozy zależnej od TNF- α w komórkach raka przełyku

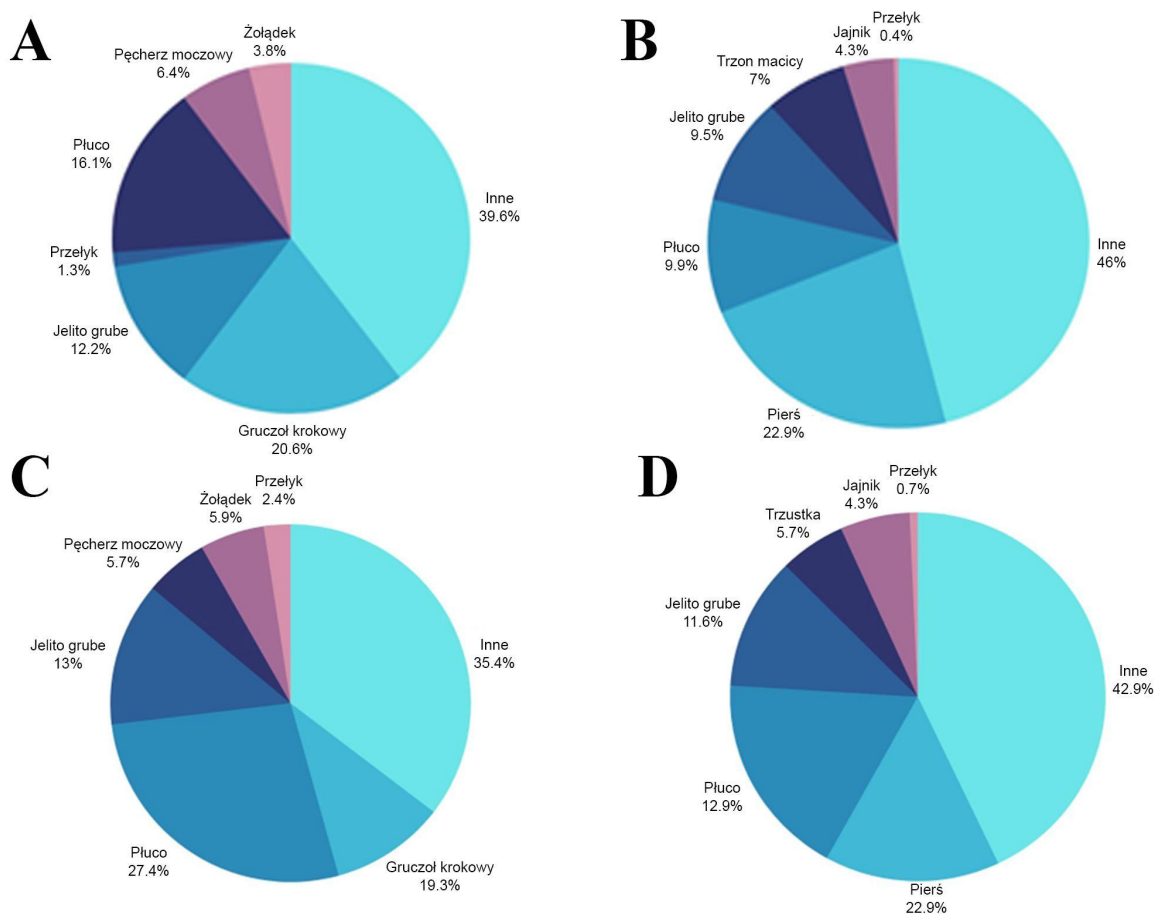
- 4.5. Oksamat sodu (SO) zmniejsza wydzielanie kwasu mlekowego i hamuje proliferację komórek raka przełyku
- 4.6. Hamowanie aktywności LDHA zaburza indukowaną przez TNF- α migrację komórek raka przełyku i sekrecję MMP9
5. Dyskusja
6. Wnioski
7. Materiały i metody
 - 7.1. Analiza ekspresji wybranych genów w raku przełyku
 - 7.2. Linie komórkowe i warunki prowadzenia hodowli komórek *in vitro*
 - 7.3. Test żywotność komórek (MTT) i proliferacji
 - 7.4. Przygotowanie lizatów komórkowych
 - 7.5. Zymografia
 - 7.6. SDS-PAGE i Western blotting
 - 7.7. Pomiar stężenia mleczanu
 - 7.8. Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (qPCR)
 - 7.9. Transfekcja komórek siRNA (small interfering RNA)
 - 7.10. Barwienie immunohistochemiczne (IHC)
 - 7.11. Test migracji komórek (wound healing assay)
 - 7.12. Test komórkowej senescencji
 - 7.13. Pomiar apoptozy za pomocą cytometrii przepływowej
 - 7.14. Analiza statystyczna
8. Literatura

1. Wprowadzenie

Nowotwory złośliwe odnoszą się do dużej grupy chorób, które mają jedną wspólną cechę: wszystkie rozwijają się z normalnych komórek, które zaczynają dzielić się w niekontrolowany sposób. Dzięki zdolności do namnażania się i penetracji okolicznych struktur, komórki nowotworowe mogą tworzyć guzy, niszcząc otaczające je normalne tkanki. Mogą również, poprzez krwioobieg, rozprzestrzeniać się do odległych narządów, zwiększając swoją niszczycielską moc, czyniąc tę chorobę śmiertelną. Nowoczesne techniki, umożliwiające wczesne wykrywanie i innowacyjne metody leczenia sprawiły, że obecnie na raka umiera mniej osób niż dwie dekady temu, ale nadal jest to druga najczęstsza przyczyna zgonów na świecie. W związku z tym istnieje ciągła potrzeba badań w celu zrozumienia złożonego procesu nowotworzenia i roli czynników odpowiedzialnych za jego inicjację, aby pomóc ludziom przede wszystkim zapobiegać nowotworom, ale także wprowadzać skuteczne terapie.

1.1. Rak przełyku

Rak przełyku (EC, ang. esophageal cancer) jest obok raka płuc, raka piersi, raka prostaty, raka jelita grubego oraz raka żołądka i wątroby, jednym z najbardziej śmiertelnych, źle rokującym nowotworem na świecie. Stanowi bardzo ważne wyzwanie dla zdrowia publicznego, głównie ze względu na swój niezwykle agresywny charakter, niską przeżywalność oraz szybkość przerzutowania (<https://www.wcrf.org/cancer-trends/worldwide-cancer-data/>). Rak przełyku najczęściej daje przerzuty do węzłów chłonnych, wątroby, płuc, kości i mózgu (Wu i in., 2018). Już współcześnie stanowi rosnący problem zdrowotny, ale jego częstość występowania, jak się szacuje, jeszcze wzrośnie w ciągu najbliższych 10 lat nawet o 140% (Lambert i Hainaut, 2017). Rak przełyku jest 6. najczęstszą przyczyną zgonów z powodu nowotworów złośliwych (odpowiada za ponad 500 000 zgonów związanych z rakiem każdego roku) i 8. najczęstszym pod względem liczby rozpoznawanych rocznie nowych przypadków w Polsce (Ryc.1) i na świecie (Tab.1), przy czym kraje rozwijające się odpowiadają za ponad 80% wszystkich przypadków i zgonów (Herszényi i Tulassay, 2010, <https://www.wcrf.org/cancer-trends/worldwide-cancer-data/>, Huang i in., 2021). Pomimo postępów w diagnostyce i leczeniu, coraz większej świadomości, identyfikacji chorych wysokiego ryzyka i nadzoru endoskopowego, bardzo duży odsetek pacjentów zgłasza się już z zaawansowaną chorobą, a ogólny pięcioletni wskaźnik przeżycia osób z rakiem przełyku wynosi od 15% do 20% na całym świecie (Absi i in., 2013).



Rycina 1. Zachorowania i zgony związane z nowotworami w Polsce (2019). Zachorowania wśród mężczyzn (A) i wśród kobiet (B). Zgony wśród mężczyzn (C) i wśród kobiet (D).

W Polsce w roku 2019 zanotowano 1470 nowych przypadków raka przełyku oraz 1648 zgonów z tegoż powodu. W naszym kraju zdecydowana większość zachorowań dotyczy mężczyzn (1139 vs. 331 wśród kobiet). U mężczyzn odnotowuje się również dużo większą umieralność z powodu raka przełyku (1311 vs. 334) (Krajowy Rejestr Nowotworów: Przełyk - onkologia.org.pl). W Polsce zachorowalność oraz umieralność w związku z EC utrzymuje się od ostatnich 20 lat na niemal niezmiennym poziomie w przypadku populacji kobiet, a w przypadku mężczyzn w latach 1999 do 2007 notowano znaczny spadek zachorowalności i od tego roku liczba nowych zachorowań w tej grupie utrzymuje się na stałym poziomie (Krajowy Rejestr Nowotworów: Przełyk - onkologia.org.pl).

#	Typ raka	% wszystkich zachorowań	Liczba nowych przypadków
1	Piers	12,5	2261419
2	Płuco	12,2	2206771
3	Jelito grube	10,7	1931590
4	Prostata	7,8	1414259
5	Żołądek	6	1089103
6	Wątroba	5	905677
7	Szyjka macicy	3,3	604127
8	Przełyk	3,3	604100
9	Tarczycyca	3,2	586202
10	Pęcherz	3,2	573278

Tabela 1. Zachorowalność na raka na świecie (2020). Wykaz dziesięciu najczęstszych typów raka w całej światowej populacji w odniesieniu do całkowitej liczby zdiagnozowanych nowotworów, szacowanej na 18,094,716 przypadków (Worldwide cancer data | World Cancer Research Fund International (wcrf.org)).

1.1.1. Typy histologiczne

Jako jednostka chorobowa, rak przełyku składa się głównie z dwóch odrębnych histologicznie, epidemiologicznie i patologicznie typów - raka płaskonabłonkowego (ESCC, ang. esophageal squamous cell carcinoma) i gruczolakoraka (EAC, ang. esophageal adenocarcinoma). Podtypy te stanowią ponad 95% złośliwych guzów przełyku. Wśród rzadkich podtypów raka przełyku, stanowiących razem 5% ogółu, najczęściej diagnozuje się raka drobnokomórkowego (Tab.2). Ogólnie, raki przełyku stanowią 80% wszystkich zmian nowotworowych występujących w obrębie przełyku, pozostałe 20%, to nowotwory łagodne, takie jak brodawczak, gruczolak, czy leiomyoma (Yoon i. in., 2015).

Łagodne nowotwory nabłonkowe i prekursorzy	Złośliwe nowotwory nabłonkowe
Brodawczak płaskonabłonkowy	Gruczolakorak
Dysplazja gruczołowa przełyku (śródnabłonkowa neoplazja) niskiego stopnia	Rak gruczołowo-torbielowaty
Dysplazja gruczołowa przełyku (śródnabłonkowa neoplazja) wysokiego stopnia	Rak śluzowo-naskórkowy
Śródnabłonkowa neoplazja płaskonabłonkowa przełyku (dysplazja) niskiego stopnia	Rak gruczolakowaty
Śródnabłonkowa neoplazja płaskonabłonkowa przełyku (dysplazja) wysokiego stopnia	Rak płaskonabłonkowy
	Rak płaskonabłonkowy brodawkowy
	Rak płaskonabłonkowy komórek wrzecionowatych
	Rak płaskonabłonkowy podstawnokomórkowy
	Rak niezróżnicowany
	Rak podobny do nabłonka limfatycznego
	Rak neuroendokryny
	Wielkokomórkowy rak neuroendokryny
	Rak neuroendokryny drobnokomórkowy
	Mieszany nowotwór neuroendokryno- nieneuroendokryny
	Rak złożony drobnokomórkowy - gruczolakorak
	Rak złożony drobnokomórkowy - płaskonabłonkowy

Tabela 2. Klasyfikacja histologiczna nowotworów przełyku wg WHO (BJMP 2015;8(1):a804.).

1.1.2. Występowanie

Istnieją znaczne różnice w częstości występowania raka przełyku w zależności od umiejscowienia geograficznego czy zróżnicowania rasowego, które można powiązać z częstością i intensywnością ekspozycji na różnorakie czynniki ryzyka – stąd EC stanowi od drugiego najczęściej występującego nowotworu złośliwego w niektórych regionach do jednego z najrzadziej występujących nowotworów złośliwych w innych (Tab.3). Rak płaskonabłonkowy jest najczęstszym typem histologicznym raka przełyku na świecie, z większą częstością występowania w krajach rozwijających się, nieuprzemysłowionych. Jest dominującym typem w Azji Południowo-Wschodniej i Afryce (World Cancer Research Fund International. Oesophageal cancer statistics. <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/data-specific-cancers/oesophageal-cancer-statistics>. Accessed June 21, 2016). ESCC wyrasta z komórek nabłonka płaskiego przełyku, częściej występuje w środkowym lub górnym przełyku (odpowiednio: 46,4% i 21,3% przypadków). Wraz ze wzrostem częstości występowania choroby refluksowej przełyku (GERD) i otyłości w krajach rozwiniętych, częstość występowania gruczolaka przełyku dramatycznie wzrosła w ciągu ostatnich 40 lat, czyniąc EAC dominującym rakiem przełyku w krajach rozwiniętych - w Europie i Ameryce Północnej (Napier i in., 2014). Gruczolak przełyku wyrasta z komórek gruczołowych nabłonka i jest charakterystyczny dla dystalnej części przełyku (88,8% przypadków). W wielu przypadkach zmianą prekursorową, na bazie, której rozwija się EAC, jest przełyk Barretta (BE) - stan, w którym normalne komórki przełyku są zastępowane przez komórki nabłonka jelitowego o różnym stopniu dysplazji (Jain i Dhingra, 2017). Pod względem histologicznym, utkanie tkankowe gruczolaka przełyku przypomina jelitowy typ gruczolaka umiejscowionego w proksymalnej części żołądka, jak również w połączeniu żołądkowo-przełykowym (Stachler i in., 2021).

O ile czterdzieści lat temu rak płaskonabłonkowy był odpowiedzialny za ponad 90% przypadków raka przełyku w Stanach Zjednoczonych, to w czasach obecnych obserwuje się dominację gruczolaka, stanowiącego 80% wszystkich diagnozowanych przypadków (Absi i in., 2013). W 1975 roku gruczolak przełyku dotykał cztery osoby na milion, natomiast w 2001 roku wskaźnik ten wzrósł do dwudziestu trzech osób na milion, co stawia go na czele najszybciej rozwijających się nowotworów w USA (Napier i in., 2014).

Ze względu na najwyższą zachorowalność na raka przełyku typu płaskonabłonkowego, jaką odnotowuje się w Azji Wschodniej, obszar ten nazywany jest „azjatyckim pasem raka przełyku”. Zaliczamy doń: Turcję, Iran, Kazachstan oraz północne i środkowe Chiny, gdzie

szacowana liczba przypadków tego typu raka wynosi ponad 100 na 100 000 mieszkańców. (Eslick, 2009). W obszarze „azjatyckiego pasa raka przełyku” wskaźniki zachorowalności na ESCC u mężczyzn wynoszą około 23 przypadków/100 000 i 16 przypadków/100 000 u kobiet (Arnal i in., 2015). Kolejnym obszarem, gdzie odnotowuje się wysoką częstość występowania ESCC jest południowo-wschodnia Afryka ze wskaźnikami podobnymi do tych odnotowywanych w krajach wschodnich (Zhang, 2013).

W przypadku EAC, najwyższą częstością jego występowania odznaczała się Holandia, Wielka Brytania oraz Irlandia (Huang i in., 2021).

Rak płaskonabłonkowy przełyku	Gruzołowy rak przełyku
Chiny	Ameryka Północna
Azja Centralna	Europa
Azja Południowo-Wschodnia	
Afryka Południowa	
Afryka Wschodnia	

Tabela 3. Rozkład geograficzny podstawowych typów histologicznych raka przełyku, ESCC i ECA.

1.1.3. Czynniki ryzyka

W patogenezie nowotworów przełyku wyróżnia się wiele różnych czynników, które istotnie zwiększają ryzyko rozwoju choroby, w tym fizjologicznych, genetycznych i demograficznych, ale również, co ważne, środowiskowych i behawioralnych, a więc tych ściśle związanych ze stylem życia i zachowania (Tab.4).

1.1.3.1. Wiek

Postępujący wiek uważany jest za jeden z najważniejszych czynników ryzyka zachorowania na raka ogółem. Analizując występowanie wszystkich nowotworów, wskaźniki zachorowalności względem wieku rosną od mniej niż 25 przypadków na 100 000 osób poniżej

20 roku życia, przez około 350 na 100 000 osób w wieku 45-59 lat, do ponad 1000 na 100 000 osób w grupach wiekowych 60 lat i starszych. W przypadku raka przełyku, najwyższe specyficzne dla wieku współczynniki zachorowalności obserwuje się wśród osób w wieku 80-84 lat (22,99 przypadków na 100 000 osób) (Liu i in., 2022). Według źródeł Amerykańskiego Towarzystwa Onkologicznego, mniej niż 15% diagnozowanych nowych przypadków dotyczy osób poniżej 55 roku życia (<https://www.cancer.org/cancer/types/esophagus-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html>). Jednak, ostatnie badania pokazały, że roczna zapadalność na EAC w tej grupie wiekowej wzrosła ponad trzykrotnie, z 0,08/100 000 do 0,27/100 000 latach 1975-2015 (Codipilly i in., 2021).

1.1.3.2. Płeć i rasa

Częstość występowania gruczolakoraka przełyku jest 8-krotnie większa u mężczyzn niż u kobiet i 5-krotnie większa u osób rasy białej niż u osób rasy czarnej, jak pokazują wyniki badań w Stanach Zjednoczonych. Rak płaskonabłonkowy jest najczęstszym typem histologicznym u osób rasy czarnej i białych kobiet, podczas gdy gruczolakorak dominuje u mężczyzn rasy białej ($p < 0,001$) (Wheeler i in., 2012). Częstość występowania raka płaskonabłonkowego przełyku jest generalnie wyższa u mężczyzn niż u kobiet w większości krajów, w tym w Polsce, a u mężczyzn rasy czarnej trzykrotnie większa w porównaniu z białymi w Stanach Zjednoczonych (Krajowy Rejestr Nowotworów: Przełyk - onkologia.org.pl; Hammad i Wani, 2021).

1.1.3.3. Palenie i alkohol

Jedynymi z głównych czynników ryzyka wystąpienia ESCC są: spożywanie alkoholu oraz palenie tytoniu. Palacze mają 5-krotnie większe ryzyko zachorowania na płaskonabłonkowego raka przełyku w porównaniu z osobami niepalącymi. Równie ważnym czynnikiem wzrostu wystąpienia ryzyka raka płaskonabłonkowego jest alkohol. Względne ryzyko (RR – relative risk) zachorowania można oszacować biorąc pod uwagę objętość spożywanego alkoholu w ujęciu tygodniowym, gdzie wraz ze wzrostem objętości obserwuje się wzrost ryzyka zachorowania (Wheeler i in., 2012). Badania sugerują, iż palenie w połączeniu ze spożywaniem alkoholu może działać synergistycznie i zwiększać ryzyko względne. Względne ryzyko u mężczyzn, którzy zarówno palili tytoń jak i spożywali alkohol, wynosiło 35,4 u mężczyzn rasy kaukaskiej i 149,2 u mężczyzn rasy czarnej, w porównaniu z

mężczyznami tej samej rasy i regionu, którzy nie korzystali z tych używek. Mechanizm, zgodnie z którym połączenie tytoniu i alkoholu prowadzi do zwiększonego ryzyka raka przełyku jest szeroko badany. Dostępne dane sugerują, iż alkohol może uszkadzać komórki DNA, redukować komórkową aktywność metaboliczną, zmniejszając zdolność detoksykacji, indukując jednocześnie stres oksydacyjny. Alkohol ze względu na swoje właściwości rozpuszczalnika organicznego ułatwia również przenikanie przez nabłonek przełyku niebezpiecznych substancji rakotwórczych zawartych w dużych ilościach w wyrobach tytoniowych, takich jak węglowodory wielopierścieniowe, aminy aromatyczne, nitrozoaminy, aldehydy i fenole (Napier i in., 2014).

1.1.3.4. Dieta i składniki odżywcze

Dieta może odgrywać kluczową rolę w predysponowaniu do wystąpienia raka przełyku. Sposób odżywiania bazujący na mięsie przetworzonym, daniach typu fast food, coraz częściej określanej mianem „diety zachodniej”, zwiększa ryzyko wystąpienia raka Barretta i następnego rozwoju gruczolaka. Natomiast dieta bogata w kwasy tłuszczowe omega-3, tłuszcze wielonienasycone, pełnoziarniste zboża i błonnik, pełna owoców, warzyw, tłustych ryb, określana modelem śródziemnomorskim, wiąże się z kolejno ze zmniejszonym ryzykiem wystąpienia raka Barretta, tak więc i mniejszym ryzykiem przekształcenia w gruczolaka przełyku. Badania przeprowadzone w Holandii wykazały, że odżywianie się w modelu śródziemnomorskim wiązało się ze zmniejszonym ryzykiem zarówno ESCC, jak i EAC (Schulpen i in., 2019). Jednym z powodów może być to, iż w tej diecie znajdziemy wysoki udział antyoksydantów, które wpływają na zmniejszenie uszkodzeń oksydacyjnych DNA i pomagają zminimalizować stan zapalny w obrębie tkanek. Dowiedziono, iż obecność w diecie nieskrobiowych warzyw, owoców oraz błonnika pokarmowego wpływa na zmniejszenie ryzyka powstania raka przełyku (Bradbury i in., 2014). Spożycie przetworzonego mięsa czerwonego może prowadzić do rozwoju raka przełyku poprzez wytwarzanie mutagennych amin heterocyklicznych i wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, gdy jest ono przygotowywane w wysokich temperaturach. Mięso w trakcie obróbki termicznej staje się źródłem azotanów i azotynów, co może prowadzić do powstawania związków N-nitrozowych, które mają właściwości rakotwórcze. Spożycie mięsa czerwonego zostało powiązane z występowaniem płaskonabłonkowego raka przełyku, a spożycie mięsa o wysokiej zawartości żelaza hemowego z występowaniem gruczolaka przełyku (Cross i in., 2011; Abid i in., 2014). Z uwagi na fakt, iż dieta śródziemnomorska jest uboga w mięso przetworzone, opisane

powyżej szkodliwe skutki spożywania mięsa są znacznie mniejsze. Spożycie witaminy D, beta-karotenu i witaminy C ma również działanie ochronne przed wystąpieniem przełyku Barretta, dlatego też, dieta uboga w owoce, warzywa, nieobfitująca w mikroelementy, takie jak karotenoidy, ryboflawina, selen, cynk, witaminy A, C i E, wiąże się z ryzykiem wystąpienia ESCC. (Chela i in., 2022).

W niektórych badaniach wykazano również, że spożywanie marynowanych warzyw jest czynnikiem ryzyka ESCC. Wzrost kolonii drożdży oraz grzybów w kiszonych warzywach może prowadzić do powstawania toksycznych związków, takich jak mikotoksyny (zwłaszcza aflatoksyna B1 oraz fumonizyna B1) i N-nitrozoaminy (Kamangar i in., 2009; Chela i in., 2022, Xue i in.; 2019; Lu i in., 1986).

Poza samymi składnikami diety, również temperatura spożywanych pokarmów jest istotna, gdy poruszamy problem nowotworzenia dotyczący przełyku. Uszkodzenie termiczne przełyku, mogące wystąpić w wyniku spożycia gorących pokarmów i napojów, również może zwiększyć ryzyko powstania ESCC (Islami i in., 2009). Same napoje, takie jak herbata, yerba mate i kawa były również przedmiotem badań jako potencjalne czynniki ryzyka, związane z rakiem przełyku i jego rozmieszczeniem geograficznym, szczególnie w regionach Ameryki Południowej. Odkryto wpływ ilości spożycia oraz wysokiej temperatury yerba mate na rakotwórczość, wzrastającą u osób spożywających ponad 3l yerba mate dziennie (Kamangar i in., 2009).

1.1.3.5. Leki

Stosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ lub NSAID), inhibitorów pompy protonowej (PPI) i statyn u pacjentów z przełykiem Barretta zostało powiązane ze zmniejszeniem progresji do gruczolakoraka przełyku. (Deng i in., 2019; Fortuny i in., 2007; Hvid-Jensen i in., 2014; Masclee i in., 2015; Wang i in., 2011).

U pacjentów regularnie stosujących niesteroidowe leki przeciwzapalne odnotowano 40-50% spadek śmiertelności z powodu raka przełyku w porównaniu z osobami nieleczonymi NLPZ (Thun i in., 1993; Farrow i in., 1998, Wang i in. 2011; Jayaprakash i in., 2006). Według niektórych badań stosowanie aspiryny zmniejszyło ryzyko wystąpienia raka przełyku nawet o 90% (Funkhouser i Sharp, 1995).

Wykazano również wpływ statyn na raka przełyku. Dowiedziono, iż stosowanie statyn o 35% zmniejszyło ryzyko zachorowania na EAC (Nguyen i in., 2015) oraz o 43% zmniejszyło ryzyko progresji przełyku Barretta do raka przełyku (Singh i in., 2013). Łączne stosowanie

statyn i inhibitora cyklooksygenazy wykazywało się synergizmem działania ochronnego, a finalnie redukcją ryzyka progresji do EAC o 74% (Beales i in., 2013).

1.1.3.6. Czynniki genetyczne

Podobnie jak w przypadku innych nowotworów, zmiany na poziomie genomu odgrywają istotną rolę również w patogenezie raka przełyku. Wykazano, że w ESCC, geny kodujące białka związane z regulacją cyklu komórkowego, naprawą DNA, autofagią, senescencją lub apoptozą, takie jak inhibitor kinazy zależnej od cyklin 2A (*CDKN2A*), różne czynniki transkrypcyjne, w tym głównie TP53 (tumor antigen p53), RB1 (retinoblastoma protein 1) i NFE2L2 (nuclear factor, erythroid 2 like 2), czy kinazy serynowo-treoninowe, jak CHEK1 i CHEK2, są często zmutowane lub, tak jak w przypadku cykliny D1 (*CCND1*), kinaz zależnych od cyklin (*CDK4* i *CDK6*) oraz ligazy ubikwitynowej E3 (*MDM2*), ulegają nadekspresji (Booka i in., 2021). W ESCC częste są też mutacje w genach biorących udział w różnicowaniu komórek, jak *NOTCH1* i *NOTCH2* (Sasaki i in., 2016; Sawada i in., 2016). Nadmierna ekspresja receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGF) jest również obserwowana u pacjentów z ESCC i wiąże się z gorszym rokowaniem. Podobnie jak mutacje w genach kodujących receptorowe kinazy tyrozynowe (RTKs), takich jak proto-onkogen *c-KIT*, czy genach kodujących białka związane z aktywacją kinazowych kaskad sygnałowych RAF/MAP, takich jak *RASA3* (RAS p21 protein activator 3). Zmiany epigenetyczne, takie jak modyfikacja histonów, metylacja DNA i utrata imprintingu genomu, dotyczące m. in. genów supresorowych jak *APC* (adenomatous polyposis coli) i *CDKN2A*, czy genu kodującego nabłonkową kadherynę 1 (*CDH1*), okazały się być również zaangażowane w rozwój raka przełyku i to zarówno ESCC, jak EAC. W ostatnich latach prowadzone na szeroką skalę badania oparte na sekwencjonowaniu całego genomu i całego eksomu wykazały, że EAC charakteryzuje bardzo duża liczba mutacji w TP53, sięgającą 70% badanych przypadków, co by potwierdzało szczególną rolę tego genu w patogenezie również raka gruczołowego przełyku (Dulak i in., 2013; Fisher i in., 2017; Frankell i in., 2019).

W przypadku EAC obserwowano, że zwiększona ekspresja genu translokacji limfocytów B 3 (*BCL3*), kodującego białko modulujące progresję cyklu komórkowego, koreluje z przerzutami do węzłów chłonnych oraz stopniem zaawansowania zmian nowotworowych. Wykazano też, że zwiększona ekspresja czynnika wzrostu śródbłonka naczyń C (VEGF-C) wraz z wysokim poziomem cykliny E (kodowanej przez gen *CCNE1*) odgrywa rolę w progresji gruczolakoraka (Liu i in., 2011; Zhou i in., 2014).

Znane są też choroby o podłożu genetycznym, które są wyraźnie związane z rozwojem raka przełyku. Przykładem jest rodzinna tyloza (tylosis palmoplantaris), rzadka choroba dziedziczona autosomalnie dominująco, charakteryzująca się hiperkeratozą dłoni i podeszew, wywołana mutacją w genie *RHBDF2*, kodującym proteazę serynową iRhom2. Pacjenci z wariantem epidermolitycznym tylozy mają do 40% większe szanse na rozwój płaskonabłonkowego raka przełyku. Skojarzenie tylosis palmoplantaris z rakiem przełyku nazywane zostało zespołem Howela-Evansa (Ellis, i in., 2015). Inny, chociaż również bardzo rzadko diagnozowany, zespół Plummera-Vinsona (występujący też pod nazwą: zespół Patersona-Kelly'ego), który charakteryzuje klasyczna triada objawów: niedokrwistość z niedoboru żelaza, dysfagia i zanikowe zapalenie sieci przełykowej, rozwija się prawdopodobnie na bazie procesów autoimmunologicznych i uważany jest obecnie za stan przednowotworowy przełyku, prowadzący do rozwoju płaskonabłonkowego raka przełyku (Novacek, 2006).

1.1.3.7. Choroba refluksowa przełyku (GERD) i przełyk Barretta

Gruczolakorak przełyku występuje w dystalnej części przełyku w około trzech czwartych przypadków i ma wyraźny związek z chorobą refluksową przełyku (GERD). Częstość występowania GERD w populacji krajów zachodnich wynosi około 10%-20%, a jego występowanie szacowane jest między trzydziestoma, a sześćdziesięcioma milionami ludzi w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej. Choroba refluksowa przełyku prowadzi do nawracającego zapalenia przełyku. Nieleczony GERD może rozwinąć się do przełyku Barretta (BE), gdzie nabłonek wielowarstwowy płaski, który normalnie wyściela przełyk, zostaje zastąpiony walcowatym nabłonkiem gruczołowym. Obecność w przełyku metaplastycznego nabłonka gruczołowego, zawierającego komórki kubkowe, tzw. nabłonek Barretta, jest czynnikiem ryzyka dysplazji i gruczolakoraka przełyku (Sharma, 2022; Anderson i in., 2007). Zwiększona częstość występowania BE w ciągu ostatnich 30 lat jest skorelowana ze zwiększoną częstością występowania gruczolakoraka w tym samym przedziale czasowym. Większość przypadków GERD występuje u osób dorosłych w wieku powyżej 50 lat, a zapadalność wśród osób w wieku 65 lat i starszych wynosi od 11,8 do 16,3 na 100 000 osobolat, z ośmiokrotnie wyższym ryzykiem u pacjentów płci męskiej w porównaniu z kobietami i pięciokrotnie wyższym ryzykiem u osób rasy białej w porównaniu z rasą czarną. Przełyk Barretta jest zmianą przednowotworową, która rozwija się u 2,3-8,3% pacjentów z GERD, z czego u około 1,2-5,6% rozwinię się gruczolakorak (Sharma, 2022). Wysoki wskaźnik masy ciała (BMI), dieta uboga w owoce i warzywa oraz palenie tytoniu są czynnikami ryzyka

przekształcenia się przełyku Barretta w raka gruczołowego przełyku (Lesley i in., 2007). Eksperymenty z wykorzystaniem modelu refluksu dwunastniczo-żołądkowego lub dwunastniczo-żołądkowo-żołądkowego u gryzoni potwierdziły, że EAC może rozwijać się sekwencyjnie jako zapalenie-metaplazja-gruczolakorak, bez podawania jakichkolwiek czynników rakotwórczych (Fujimura i in., 2011). Wykazano też, że to sok dwunastniczy, a nie sok żołądkowy, jest niezbędny do rozwoju gruczolakoraka przełyku (Cheng i in., 2013). Chirurgia antyrefluksowa i użycie inhibitorów pompy protonowej, niesteroidowych leków przeciwzapalnych, selektywnych inhibitorów cyklooksygenazy-2, zielonej herbaty, kwasu retinowego i tioproliny wykazały prewencyjny wpływ na rozwój gruczolakoraka z przełyku Barretta w modelach zwierzęcych, ale pozostaje otwarte pytanie, czy działania antyrefluksowe mogą cofnąć zmiany BE i zapobiegać rozwojowi raka przełyku w praktyce klinicznej (Abrams, 2008). CBET (Chemoprevention for Barrett's Esophagus Trial), wieloośrodkowe, randomizowane, podwójnie zaślepienie badania fazy IIb z zastosowaniem 200 mg celekoksybu (leku z grupy NSAID) dwa razy dziennie przez 48 tygodni u pacjentów z przełykiem Barretta nie potwierdziły jego ochronnego działania przed progresją do raka przełyku (Heath i in., 2007).

1.1.3.8. Helicobacter Pylori

U osób z zakażeniem Helicobacter pylori obserwowano natomiast zmniejszenie ryzyka wystąpienia gruczolakoraka przełyku o 41%. Uważa się, że wydzielanie kwasu żołądkowego, które przyczynia się do choroby refluksowej i przełyku Barretta, jest zmniejszone w wyniku zaniku błony śluzowej żołądka spowodowanego przez H. Pylori (Xie i in., 2013). Związek ten jest nadal badany, a leczenie zakażenia H. pylori jest zalecane zgodnie z obowiązującymi wytycznymi (Chey i in., 2017).

1.1.3.9. Otyłość

Podwyższone BMI jest czynnikiem ryzyka wystąpienia wielu rodzajów nowotworów złośliwych (Renehan i in., 2008). Otyłość jest głównym i stałym czynnikiem ryzyka rozwoju gruczolakoraka przełyku, szczególnie u osób z rozmieszczeniem tłuszczu głównie w obrębie jamy brzusznej, a co za tym idzie, wysokim poziomem tłuszczu trzewnego. Przerośnięte adipocyty i komórki zapalne w obrębie złogów tłuszczu tworzą środowisko stanu zapalnego o niskim stopniu złośliwości i sprzyjają rozwojowi nowotworu poprzez uwalnianie adipokin i cytokin. Adipocyty w mikrośrodowisku guza dostarczają energii oraz wspierają wzrost i

progresję guza. Ponadto, również wzrost częstości występowania GERD u osób otyłych możemy uznać za pośredni wpływ otyłości na rozwój raka przełyku (Long i in., 2014; Corley i Kubo, 2006; Domper i in., 2015;). Ponadto wyższy współczynnik zachorowalności na raka gruczołowego przełyku w stosunku do raka płaskonabłonkowego pozytywnie koreluje z częstszym występowaniem otyłości i podwyższonym poziomem cholesterolu (Huang i in., 2021). Również badania obserwacyjne wykazały pozytywną korelację między otyłością, a nowotworzeniem w obrębie m.in. przełyku (Kubo i in., 2006).

Otyłość w krajach rozwiniętych stała się poważną chorobą społeczną, w dodatku bardzo szybko postępującą i obejmującą coraz większy procent społeczeństwa. W Polsce w 2010 21,7% kobiet oraz 21,4% mężczyzn było otyłych. W 2016 r. już natomiast, wśród osób w wieku 20 lat i więcej 53% kobiet i 68% mężczyzn miało nadwagę, a 23% kobiet i 25% mężczyzn było otyłych. W przypadku osób poniżej 20 roku życia, nadwagę miało 20% dziewcząt i 31% chłopców, a 5% dziewcząt i 13% chłopców było otyłych. Zgodnie z wyliczeniami, na rok 2025 przewidywany jest wzrost odsetka populacji otyłej odpowiednio do 25,9% u kobiet oraz 30,3% u mężczyzn (<https://ncdrisc.org/country-profile.html>).

Rak płaskonabłonkowy przełyku (ESCC)	Rak gruczołowy przełyku (EAC)
Wiek między 60-70 lat	Wiek między 50-60 lat
Achalazja (10-krotny wzrost ryzyka)	Płeć męska (8-krotny wzrost ryzyka)
Palenie (9-krotny wzrost ryzyka)	Rasa biała (5-krotny wzrost ryzyka)
Spożywanie alkoholu (od 3 do 5-krotny wzrost ryzyka przy \geq trzech drinkach dziennie)	Choroba refluksowa przełyku (5-7 wzrost ryzyka, w zależności od częstości występowania objawów)
Rasa czarna (3-krotny wzrost ryzyka)	Otyłość (2,4-krotny wzrost ryzyka wraz we wzrostem BMI > 30 kg na m ²)
Dieta wysokoskrobiowa bez owoców i warzyw	Palenie (2-krotny wzrost ryzyka)
	Przełyk Barretta

Tabela 4. Czynniki predysponujące do rozwoju raka przełyku. Główne czynniki ryzyka ESCC i EAC, wymienione od najbardziej do najmniej typowych.

1.1.3.10. Urazy i uszkodzenia przełyku

Bezpośrednie narażenie przełyku na działanie czynników urazowych, prowadzi do uszkodzenia, a nawet perforacji ściany przełyku, wywołując miejscowy stan zapalny lub ogólnoustrojową odpowiedź zapalną, która może przybierać formę stanu przewlekłego. Jak pokazały badania duńskich naukowców, którzy wykorzystali dane zgromadzone w latach 1974 – 2002, obejmujące grupę ponad 11 tys. pacjentów ze zdiagnozowanym wcześniej zapaleniem przełyku, stan zapalny zwiększa pięciokrotnie ryzyko wystąpienia raka przełyku (Lassen i in., 2006). Natomiast regularne stosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych zmniejszyło częstość zachorowania na raka przełyku, potwierdzając bezpośredni związek zapalenia z rozwojem nowotworów (Loomans-Kropp i in., 2021).

Wpływ zapalenia na nowotworzenie może być większy przy współistnieniu takich czynników jak otyłość, brak aktywności fizycznej, palenie papierosów, spożywanie alkoholu i przewlekłe infekcje, które sprzyjają ogólnoustrojowym zapaleniu niskiego stopnia. Wyniki ostatnich badań wskazują, że ogólnoustrojowe zapalenie przyspiesza rozwój raka, w tym raka przełyku, zmieniając dynamikę mikrośrodowiska nowotworu (ang. tumor microenvironment; TME) i indukując dalszą jego reorganizację, co sprzyja progresji choroby (Furman i in., 2019; Chela i in., 2022). Histogeneza metaplazji nabłonka kolumnowego Barretta, uważanego za formę prekursorową gruczolaka przełyku, może być związana z przewlekłym stanem zapalnym wywołanym GERD (Abdel-Latif i in., 2009; Chela i in., 2022). Co ciekawe, używając mysiego modelu przełyku Barretta wykazano, że stosowanie diety wysokotłuszczowej może wywołać stan zapalny i w konsekwencji dysplazję, poprzez wpływ na zmianę mikrośrodowiska przełyku oraz mikrobiomu jelitowego (Sharma i in., 2022).

1.2. Zapalenie w raku

Jednym z ważniejszych odkryć ostatnich dwóch dekad w medycynie było wykazanie kluczowego udziału układu odpornościowego i procesów zapalnych w rozwoju większości zaburzeń zdrowotnych, które dominują obecnie w światowej zachorowalności i śmiertelności, w tym chorób nowotworowych (Furman i in., 2019; Kartikasari i in., 2021; Mantovani i in., 2008; Murata i in., 2018; Coussens i Werb, 2022; Candido i Hagemann, 2013; Flossmann i Rothwell 2007).

W 2000 roku uważano, że infekcje mogą odpowiadać za rozwój ponad 15% wszystkich nowotworów złośliwych na świecie (Kuper i in., 2000). Niespełna 20 lat później wykazano, że

były one bezpośrednią przyczyną rozwoju 25% raków ogółem (Murata i in., 2018). Zapalenie pełni ważną rolę nie tylko w inicjacji, ale także w progresji choroby nowotworowej. Z jednej strony, generując stres oksydacyjny i uwalniając nadmierne ilości reaktywnych form tlenu (ROS - reactive oxygen species) i azotu (RNS - reactive nitrogen species) może bezpośrednio przyczyniać się do wzrostu ryzyka mutagenyzy (Balkwill i Mantovani, 2001; Reuter i in., 2010). Z drugiej strony, poprzez udział w organizowaniu specyficznego mikrośrodowiska nowotworowego, zapalenie może mieć wpływ na inwazyjność i przerzutowanie komórek nowotworowych do organów odległych, a także na budowanie oporności na terapię (Calorini i Bianchini, 2010; Coussens i Werb, 2002; Han i Zhang, 2022; Sharma i in., 2022; Chen i in., 2017). Dlatego też stan zapalny uznawany jest obecnie za jeden z dziesięciu znaków szczególnych nowotworów (Hanahan, 2022). Formowanie TME ściśle wiąże się z rekrutacją i akumulacją komórek zapalnych w stromie guza oraz uwalnianiem różnego typu mediatorów stanu zapalnego, wśród których, kluczową rolę odgrywają cytokiny (Abdulkhaleq i in., 2018; Khandia i Munjal, 2020; Vendramini-Costa i in., 2012). Cytokiny są dużą grupą małych białek o zróżnicowanym działaniu, wytwarzanych i uwalnianych do przestrzeni pozakomórkowej głównie przez monocyty, makrofagi i limfocyty ale też, w przypadku nowotworów, przez same komórki nowotworowe. Zostały one sklasyfikowane w kilka nadrodzin (SF), w tym nadrodzinę interferonów (INFSF), interleukin (ILSF), czynników martwicy nowotworów (TNFSF), transformujących czynników wzrostu (TGFSF), cytokin chemotaktycznych (chemokin) i czynników stymulujących kolonie (CSFSF). W tkance nowotworowej poszczególne cytokiny pośredniczą w interakcjach między komórkami nowotworowymi, komórkami odpornościowymi i komórkami nieimmunologicznymi. Poprzez działanie autokryne, parakryne lub endokryne mają bezpośredni lub pośredni udział w regulacji odpowiedzi układu odpornościowego, indukcji stanów zapalnych, czy angiogenezy, utrzymaniu nowotworowych komórek macierzystych, inwazji i formowaniu przerzutów, a także w innych procesach komórkowych, ważnych dla przetrwania i wzrostu (Morris i in., 2022). Coraz więcej danych literaturowych wskazuje też na znaczącą rolę cytokin w promowaniu procesu przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT), w którym ściśle przylegające do siebie komórki nabłonkowe różnicują do migrujących komórek podobnych do mezenchymalnych, mogących przemieszczać się do sąsiednich lub odległych tkanek. Proces ten ma kluczowe znaczenie dla procesów zarówno fizjologicznych, jak i patologicznych, w tym rozwoju embrionalnego oraz gojenia się ran. EMT ma też istotny udział w progresji raka i tworzeniu wtórnych guzów w odległych lokalizacjach (Suarez-Carmona i in., 2017; Chaffer i in., 2016).

Cytokiny biorą udział w regulacji homeostazy immunologicznej. Większość cytokin charakteryzuje zjawisko plejotropii, czyli zdolność jednej cytokiny do wykazywania różnorodnych funkcji oraz redundancji, definiowanej jako nakładanie się efektów działań różnych cytokin. Cytokiny, stymulując mechanizmy efektorowe układu odpornościowego mogą albo hamować rozwój guza albo alternatywnie prowadzić do przewlekłego stanu zapalnego, który sprzyja nowotworzeniu. Plejotropowy efekt działania cytokin może być związany z nadmierną ilością receptorów na powierzchni danych komórek lub wynikać ze zdolności cytokin do aktywacji różnych szlaków sygnałowych, a tym samym do indukcji różnych funkcji. Ponadto, większość cytokin nie tylko działa poprzez więcej niż jeden receptor, ale każdy z tych receptorów może mieć więcej niż jedną funkcjonalną formę dla pojedynczej cytokiny, jak na przykład formy receptora IL2 o pośrednim i wysokim powinowactwie. Same receptory natomiast mogą być aktywowane przez więcej niż jedną cytokinę (Ozaki i in., 2002). Wiadomo też, że efekt działania cytokin zależy w dużej mierze od ich stężenia. Podawanie dużych dawek cytokin może działać toksycznie na komórki, prowadząc do martwicy nowotworowo zmienionej tkanki, tak jak to się dzieje w przypadku czynnika martwicy nowotworów α (TNF- α), natomiast długotrwała ekspozycja na te same cytokiny w małych dawkach może powodować efekt odwrotny - może wspierać funkcje życiowe, działając bezpośrednio - poprzez aktywację ścieżek sygnałowych związanych z promowaniem przeżycia, jak i pośrednio, poprzez indukcję ekspresji innych cytokin (Szlosarek i in., 2006; Charles i in., 2009; Suarez-Cuervo i in., 2003; Balkwill, 2002).

Utrzymująca się długofalowo produkcja cytokin, poprzez działanie na komórki układu immunologicznego oraz komórki nowotworowe na zasadzie sprzężenia zwrotnego, może prowadzić do wydzielania jeszcze większej ich ilości, doprowadzając do burzy cytokinowej (Candido i Hagemann, 2013; Kartikasari i in., 2021). Nadekspresja cytokin oraz ich receptorów jest zjawiskiem często obserwowanym w nowotworach. Dotyczy to szczególnie takich cytokin jak czynnik hamujący migrację makrofagów (MIF), TNF- α , interleukina 6 (IL6), interleukina 8 (IL8), interleukina 10 (IL10), interleukina 18 (IL18) i transformujący czynnik wzrostu β (TGF β) (Turnquist i in., 2020).

Ponieważ wysokie stężenia niektórych cytokin, jak IL6 lub IL10, są skorelowane z negatywnymi rokowaniami, monitorowanie ich poziomu w surowicy pacjentów z określonym typem nowotworu okazało się być użytecznym markerem prognostycznym i predykcyjnym (Michalaki i in., 2004; Verma i in., 2022; Czajka-Francuz i in., 2020).

1.2.1. TNF- α jako cząsteczka sygnałowa

Jedną z najlepiej poznanych cytokin, uważaną za główny mediator procesów zapalnych, jest czynnik martwicy nowotworów α (TNF- α), nazywany również kachektyną. Jest to małe białko o masie cząsteczkowej 26 000 Da, w skład którego wchodzi 233 reszt aminokwasowych, z czego pierwszych 76 określa się mianem sekwencji liderowej (LS). Ludzki gen *TNF/TNFA* kodujący TNF- α zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu 6 (6p21.3) i składa się z czterech eksonów i trzech intronów. Pierwszy ekson zawiera sekwencję peptydu liderowego, natomiast pozostała część białka w większości kodowana jest przez ekson czwarty (ponad 80% sekwencji dojrzałego TNF- α) (Parameswaran i in., 2010).

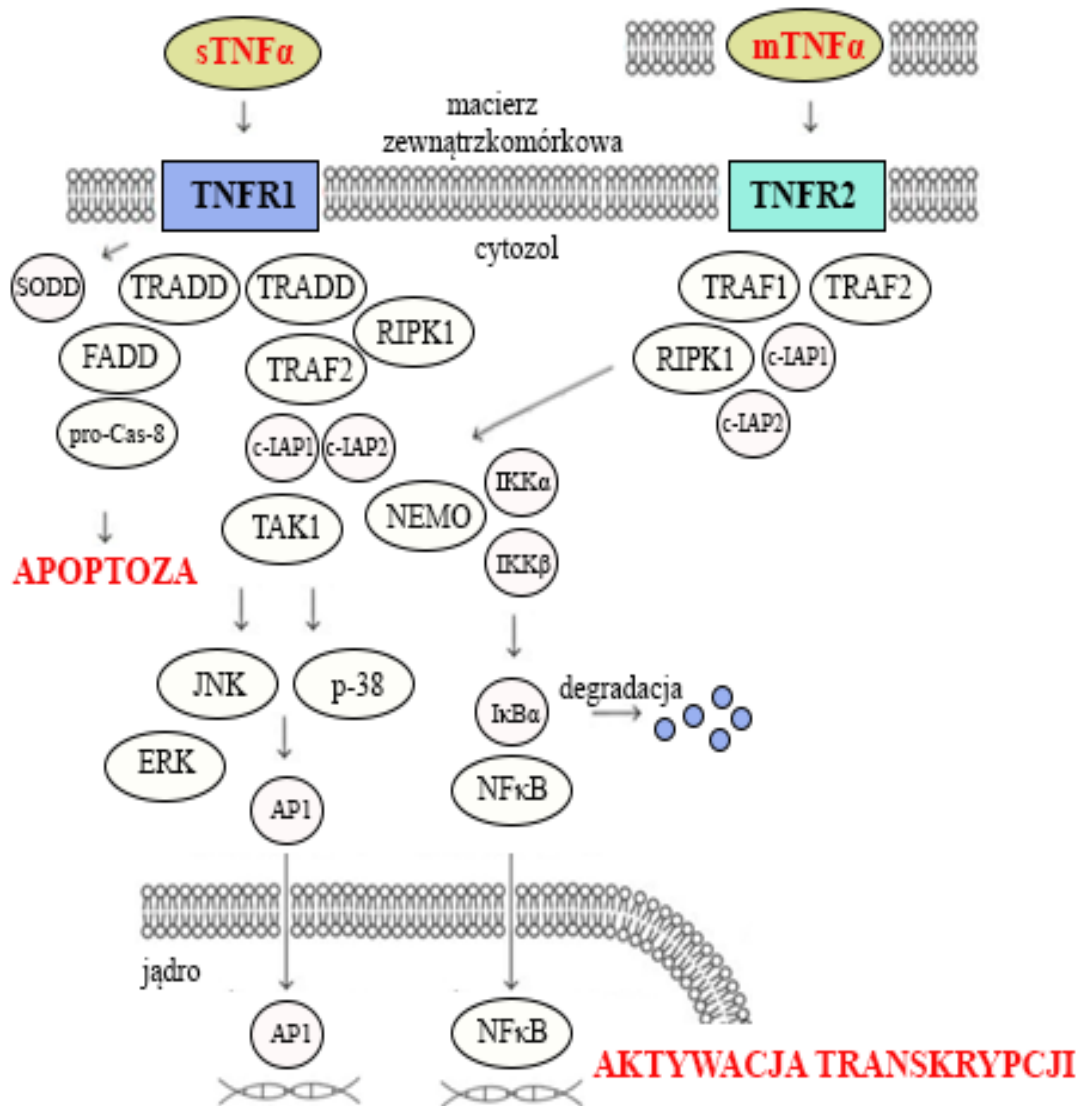
TNF- α sklasyfikowany został jako białko błonowe typu II, funkcjonujące w postaci stabilnego homotrimeru. Początkowo syntetyzowany jest w formie związanego z błoną prekursora (mTNF- α). Za jego kotwiczenie w błonie odpowiada peptyd LS, który składa się z N-końcowych 30 reszt aminokwasowych domeny wewnątrzkomórkowej (ICD), 26 reszt aminokwasowych domeny transbłonowej i 20 reszt aminokwasowych domeny zewnątrzkomórkowej. Prekursorowy mTNF- α jest następnie cięty pomiędzy Ala⁷⁶ i Val⁷⁷ przez enzym konwertujący TNF- α (TACE lub ADAM-17), w miejscu oddzielającym charakterystyczną dla białek nadrodziny cytokin TNF domenę homologii TNF (THD) od domeny transbłonowej i wewnątrzkomórkowej. W wyniku proteolizy, uwalniany jest do przestrzeni pozakomórkowej 17-kDa protomer, który agreguje, tworząc rozpuszczalną formę homotrimeryczną o masie cząsteczkowej 51 kDa (sTNF- α) (Bazzoni i Beutler, 1996; Horiuchi i in., 2010). Domena ICD fragmentu LS, który pozostaje nadal zakotwiczony w błonie może zostać uwolniona przez wewnątrzbłonową proteazę, peptydazę peptydu sygnałowego (SPPLs) i translokować do jądra komórkowego aktywując sygnał do produkcji IL12 (Friedmann i in., 2006). Zarówno forma związana z błoną, mTNF- α , jak i forma rozpuszczalna, sTNF- α , są biologicznie aktywne i generują sygnał wewnątrzkomórkowy poprzez wiązanie się z dwoma różnymi receptorami błonowymi TNF- α – TNF- α receptorem 1 (TNFR1 lub CD120a), o masie 55 000 Da i TNF- α receptorem 2 (TNFR2 lub CD120b), o masie 75 000 Da (Idriss i Naismith, 2000). Związany z błoną mTNF- α pełni swoją funkcję biologiczną ważną w kontekście kontaktów komórka-komórka, co różni się od właściwości rozpuszczalnego sTNF- α , który działa również w miejscach odległych od komórek wytwarzających TNF- α (Perez i in., 1990; Horiuchi i in., 2010). Chociaż zarówno sTNF- α jak i mTNF- α mogą wiązać się do obu receptorów, to ich aktywność biologiczna wydaje się być związana preferencyjnie odpowiednio z TNFR1 i TNFR2. Wiele dowodów wskazuje też na to, że mTNF- α działa zarówno jako ligand,

jak i receptor, indukując sygnał dwukierunkowo, co wydaje się odgrywać szczególną rolę w formowaniu mikrośrodowiska nowotworowego (Qu i in., 2017). Oba receptory są białkami transmembranowymi typu I, które w formie aktywnej funkcjonują jako homodimery. TNFR1 jest białkiem ekspresjonowanym powszechnie prawie we wszystkich komórkach, natomiast receptor TNFR2, występuje głównie w komórkach układu odpornościowego, neuronach i komórkach śródbłonna. O ile domeny zewnątrzkomórkowe obu receptorów wykazują dużą homologię, oba posiadają podobny motyw bogaty w cysteinę (CRD) w czterech powtórzeniach, to ich regiony wewnątrzkomórkowe są strukturalnie różne, nie posiadają żadnych homologicznych sekwencji i aktywują odmienne szlaki sygnałowe. Rola więc każdego receptora jest zależna od kontekstu i może być specyficzna dla określonego typu komórek lub tkanek (Wajant i in., 2019; Dembic i in., 1990). Podobnie jak w przypadku TNF- α , ektodomeny transmembranowych receptorów TNF- α mogą również być uwalniane do macierzy pozakomórkowej na drodze proteolizy, czego efektem jest formowanie rozpuszczalnych mediatorów sygnalizacyjnych, które działają jako antagoniści TNF- α . Istnieją dowody na to, że za proteolityczne przetwarzanie receptorów TNFR2 również odpowiada TACE/ADAM-17 (Peschon i in., 1998; Aderka i in., 1992).

Wiązanie TNF- α do receptora powierzchniowego komórki, niezależnie od jego typu, powoduje rekrutację transduktorów sygnału, które następnie aktywują różne białka efektorowe (Ryc.2). Poprzez złożone kaskady sygnalizacyjne, efekторы te prowadzą do aktywacji dwóch kluczowych dla procesów zapalnych oraz przeżycia czynników transkrypcyjnych, białka aktywatorowego 1 (AP1) oraz czynnika jądrowego kappa B (NF κ B) (Qiao i in., 2016; Hayden i in., 2014). Proces aktywacji TNFR1 i kaskady sygnalizacyjne uruchamiane w wyniku interakcji TNF- α -TNFR1 są znacznie lepiej poznane. TNFR1 zawiera wewnątrzkomórkową domenę śmierci (DD), która pod nieobecność ligandu pozostaje związana z białkiem SODD (ang. silencer of death domains), utrzymującym TNFR1 w nieaktywnym, monomerycznym stanie. Wiązanie TNF- α destabilizuje kompleks SODD-TNFR1 i wymusza trimeryzację receptora, prowadząc do utworzenia kompleksu sygnalizacyjnego, określanego mianem kompleksu I. Formowanie trimery i tym samym agregacja domen DD jest sygnałem do wiązania białka adaptorowego TRADD (ang. TNFR-associated DEATH domain) i RIPK1 (ang. receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1). TRADD następnie rekrutuje białko adaptorowe TRAF2 (czynnik związany z receptorem TNF 2), co umożliwia zaangażowanie ligaz E3 komórkowych inhibitorów apoptozy 1 i 2 (c-IAP1, c-IAP2) i w konsekwencji ubikwitynację różnych składników kompleksu I, w tym przede wszystkim RIPK1. Białko RIPK1 wydaje się pełnić rolę kluczowego regulatora decyzji komórkowej w wyborze między

promowaniem przeżycia poprzez aktywację ścieżki sygnałowej związanej z NFκB lub śmierci komórki poprzez aktywację kaspaz, zależnie od stanu jego ubikwitynacji (Wajant i in., 2019; Mifflin i in., 2020; Webster i in., 2020). Specyficzny układ łańcuchów poliubikwityny sprawia, że białko RIPK1 traci aktywność kinazy, co umożliwia rekrutację dwóch kompleksów: kompleksu TAK1 (kinazy 1 aktywowanej transformującym czynnikiem wzrostu beta) wraz z białkami wiążącymi, oraz kompleksu IKK (inhibitora kinazy kappa B), obejmującego dwie kinazy IKKα i IKKβ oraz podjednostkę regulatorową NFκB, IKKγ (znaną również jako NEMO). Rekrutacja tych dwóch kompleksów, TAK1 i IKK, inicjuje proteosomalną degradację inhibitora kappa B-alpha (IκBα) i uwolnienie podjednostek p65/p50 NFκB, które translokują do jądra i aktywują transkrypcję zależnych od NFκB genów prozapalnych, antyapoptotycznych i prożyciowych, takich jak interleukina 6 i 8 (IL-6, IL-8), inhibitor kaspazy-8 cFLIP (komórkowe białko inhibitorowe FLICE (Enzym konwertujący IL-1β podobny do FADD)) i komórkowy inhibitor apoptozy 2 (c-IAP2) (Wajant i in., 2019; Webster i in., 2020). Białka kompleksu TAK1, mogą też zwiększać ekspresję genów prozapalnych niezależnie od NFκB, poprzez fosforylację kinaz białkowych aktywowanych mitogenami (MAPK), takich jak kinaza JNK (ang. c-jun N-terminal kinase) i p38, i/lub indukcję czynnika transkrypcyjnego AP1 (Lousa i in., 2022; Wajant i in., 2019; Webster i in., 2020).

Modyfikacje potranslacyjne RIPK1 oraz innych składników kompleksu I mogą przełączać sygnał prozapalny na sygnał prowadzący do śmierci komórki. Gdy ubikwitynacja RIPK1 jest hamowana lub negatywnie regulowana przez deubikwitynazy (DUBs), RIPK1 dysocjuje z kompleksu I, co sprzyja tworzeniu w cytozolu kompleksów indukujących śmierć (IIa, IIb lub IIc) i prowadzi do apoptozy lub nekrozy (Wajant i in., 2019). W tych warunkach NFκB jest dezaktywowany, a uwolniony RIPK1 wiąże domenę śmierci związaną z Fas (FADD: ang. Fas-associated death domain), formując platformę do rekrutacji i aktywacji kaspazy 8. Aktywowana kaspaza 8 inicjuje następnie kaskadę proteolityczną, która obejmuje inne kaspazy (kaspazy 6 i 7) i ostatecznie indukuje apoptozę. Kaspaza 8, poprzez uwalnianie tBID (ang. truncated BH3 interacting death domain), może też powodować uwalnianie czynników proapoptotycznych z błony mitochondrialnej, co w konsekwencji prowadzi do aktywacji takich kaspaz, jak kaspaza 9 i kaspaza 3 (Lousa i in., 2022). Ponadto, jak pokazały badania, kiedy użyto inhibitorów NFκB lub czynników, które zaburzały ekspresję NFκB, takich jak aktynomycyna D lub cykloheksymid, sygnał generowany poprzez interakcje TNF-α z TNFR1 indukował apoptozę na drodze niezależnej od RIPK1, potwierdzając kluczową rolę ścieżki sygnałowej NFκB w promowaniu przeżycia komórek przez TNF-α (Micheau i in., 2003).



Rycina 2. Ścieżki sygnałowe indukowane wiązaniem TNF- α do TNFR1 i TNFR2. Interakcja TNF- α z TNFR1 wyzwała uwolnienie SODD z receptora, jego trimeryzację i rekrutację białka TRADD i białkowej kinazy RIPK1. RIPK1, poprzez formowanie kompleksu I, za pośrednictwem kompleksów TAK1 i IKK, prowadzi do aktywacji NF κ B lub MAPK/JNK i p38 – ścieżek sygnałowych promujących zapalenie i przeżycie. Poprzez formowanie cytozolowych kompleksów II (a, b lub c), za pośrednictwem białka FADD rekrutuje i aktywuje kaspazę 8, odpowiedzialną za włączenie kaskady procesów prowadzących do apoptozy lub nekrozy. Interakcja TNF- α z receptorem TNFR2, który nie posiada domeny DD, prowadzi bezpośrednio do rekrutacji białek TRAF1 z TRAF2, z pominięciem białka TRADD, i aktywacji albo kanonicznej albo, za pośrednictwem kinazy NIK, niekanonicznej ścieżki sygnałowej NF κ B. Aktywacja TNFR2 może również prowadzić do indukcji sygnałów prozapalnych i prożyciowych, związanych z kinazami JNK i p-38, a także kinazami PI3K i ASK-1.

TNFR2, inaczej niż TNFR1, ze względu na brak domeny DD nie rekrutuje TRADD ale oddziałuje bezpośrednio z TRAF1, a poprzez TRAF1 z TRAF2 dzięki czemu ma możliwość aktywacji kanonicznego szlaku sygnałowego NFκB. Wiadomo też, że TNFR2 poprzez promowanie aktywacji kinazy indukującej NFκB (NIK) może również aktywować niekanoniczną ścieżkę sygnałową NFκB (Wajant i in., 2019). Jak pokazały badania na fibroblastach, wiązanie TNF-α do TNFR2 aktywowało również ścieżki sygnałowe związane z kinazami Erk (ang. extracellular regulated kinase), p-38 i JNK, przy znaczącej roli TRAF2 i kompleksu TAK1 oraz odpowiednio kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K) i kinazy regulującej sygnał apoptozy-1 (ASK-1) (Reinhard i in., 1997).

1.2.2. Funkcja biologiczna TNF-α

TNF-α jest syntetyzowany i uwalniany głównie przez aktywowane makrofagi, limfocyty T i komórki NK, neutrofile i komórki tuczne, ale również przez komórki nieimmunologiczne, takie jak fibroblasty, komórki śródbłonna, mioocyty, neurony i inne, w tym komórki nowotworowe. Opisany został po raz pierwszy w 1975 roku przez Carswella i in. jako czynnik naśladujący działanie nekrotyczne, charakterystyczne dla endotoksyny uwalnianej po zakażeniu *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) i wywołującej "krwotoczną martwicę" guzów u myszy z wszczepionymi mięsakami, wyindukowanymi metylocholanrenem (Carswell i in., 1975). Dzięki temu zyskał swoją nazwę. Jak się później okazało, efekt indukowanej przez TNF-α nekrozy nowotworu był ściśle związany z jego zdolnością do wywoływania apoptozy komórek śródbłonna w tkance guza (Robaye i in., 1991).

TNF-α należy do nadrodziny cytokin TNF (TNFSF, ang. tumor necrosis factor superfamily) liczącej ogółem 19 ligandów, w tym TNF-β (czynnik nekrotyczny nowotworu β, występujący też pod nazwą limfotoksyna alfa, LTα), LTβ (limfotoksyna β), CD27L, CD30L, CD40L i FasL. TNF-α, podobnie jak i pozostałe czynniki z tej rodziny, odgrywa istotną rolę w typowej odpowiedzi immunologicznej ze znacznym udziałem wrodzonej odporności. Jest też głównym inicjatorem reakcji zapalnych, charakteryzujących początkowy etap odpowiedzi immunologicznej, wykazując przy tym działanie wielokierunkowe, prowadzące do skrajnie odmiennych efektów. TNF-α ma zarówno zdolność aktywacji apoptozy (zaprogramowanej śmierci komórki) lub nekrozy, prowadząc w konsekwencji do śmierci komórki, jak i stymulacji komórek w kierunku proliferacji, promując ich przeżycie (Aggarwal, 2003; Croft i in., 2017; Larrick and Wright, 1990). Takie funkcjonalnie różne właściwości TNF-α sprawiają, że w przypadku zaburzonej ekspresji może on sprzyjać rozwojowi wielu różnych procesów

patologicznych. Nadmierna produkcja TNF- α wiąże się z rozwojem takich chorób jak reumatoidalne zapalenie stawów (RZS), nieswoiste zapalenie jelit (NZJ), łuszczycowe zapalenie stawów (PsA), łuszczyca (PS), czy choroba Leśniowskiego-Crohna, zwłaszcza u ludzi w średnim i starszym wieku (Celis i in., 2019; Choy i Panayi, 2001; Adegbola i in., 2018; Jang i in., 2021; Bradley, 2008). Jest też wiele dowodów na to, że nadmiar TNF- α może mieć związek z chorobami układu sercowo-naczyniowego. Wiadomo, że bierze udział w rozszerzaniu naczyń i powstawaniu obrzęków oraz adhezji leukocytów do śródbłonna poprzez wpływ na ekspresję białek adhezyjnych; reguluje krzepnięcie krwi, przyczynia się do powstawania stresu oksydacyjnego w miejscach zapalenia i pośrednio wywołuje gorączkę (Ferrari, 1999). Z drugiej strony, badania z wykorzystaniem mysich modeli z niedoborem TNF- α pokazały, że jego brak negatywnie wpływa na produkcję cytokin zapalnych, takich jak IL6, IL10, TGF β i IF γ , prowadząc do zmian patologicznych w płucach i śmierci podczas wirusowej infekcji dróg oddechowych (Tuazon i in., 2020). Jednak, jak się okazało, deficyt TNF- α zmniejszał prawdopodobieństwo rozwoju guza do 25% w porównaniu ze zwierzętami typu dzikiego, wskazując na istotną rolę TNF- α w rozwoju chorób nowotworowych co potwierdziły kolejne badania (Moore i in., 1999). Obecnie TNF- α jest uważany za jeden z głównych mediatorów zapalenia związanego z nowotworem. Jego podwyższony poziom został znaleziony w różnych litych guzach, takich jak rak piersi, żołądka, trzustki, jajnika, jelita grubego i jamy ustnej, ale też w białaczkach i chłoniakach (Binder i in., 2018; Cruceriu i in., 2020; Egberts i in., 2008; Gupta i in., 2016; Li i in., 2016; Tang i in., 2017; Zhao i in., 2010).

1.2.3. TNF- α - udział w formowaniu mikrośrodowiska nowotworowego

Mikrośrodowisko guza (TME) to dynamiczny układ specyficznego ekosystemu tkanki nowotworowej, formowanego na bazie aktywnej komunikacji pomiędzy komórkami nowotworowymi, a wszystkimi komponentami otaczającego je środowiska, budowanego przy udziale sieci połączeń adherentnych oraz cząsteczek sygnałowych, uwalnianych bezpośrednio z komórek lub za pośrednictwem wydzielanych proteaz, z białek macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) (Laha i in., 2021). Komórki nowotworowe wykorzystują te wzajemne interakcje do stymulacji komórek prawidłowych stromy w kierunku fenotypów, których aktywność przyczynia się do wspierania i promowania proliferacji, indukcji EMT, wzrostu potencjału migracyjnego, inwazyjnego i metastatycznego komórek nowotworowych. Mikrośrodowisko guza różni się w zależności od typu nowotworu, ale cechą wspólną jest obecność komórek odpornościowych, które mogą wykazywać zarówno działanie pro-, jak i

antynowotworowe (Anderson i Simon, 2020). Makrofagi, które uchodzą za główne źródło TNF- α , na skutek zwiększonej rekrutacji monocytów i/lub ekspansji makrofagów rezydujących w tkankach, mogą stanowić nawet do 50% masy guza. Za rekrutację makrofagów do miejsca nowotworowo zmienionego odpowiedzialne są głównie chemokiny, takie jak CCL2, CCL3 i CCL5, których produkcja i uwalnianie do macierzy zewnątrzkomórkowej związane jest z miejscowym niedotlenieniem, stanem zapalnym i wysokim poziomem kwasu mlekowego (Hourani i in., 2021; Lee i in., 2013). Monocyty w TME polaryzują klasycznie do prozapalnych makrofagów typu M1 lub alternatywnie, szczególnie w obszarach okołonaczyniowych i niedotlenionych, bogatych w IL-4, IL-10 i IL-13, do makrofagów podobnych do typu M2, o właściwościach przeciwzapalnych (Lee i in., 2013). Oba typy makrofagów są zdolne do produkcji wysokiego poziomu TNF- α , co w przypadku M1 przekłada się głównie na indukcję stresu oksydacyjnego, związanego z generowaniem wysokiego stężenia reaktywnych form tlenu i azotu, a w przypadku M2 z indukcją EMT i stymulacją fenotypu charakterystycznego dla nowotworowych komórek macierzystych. Uwalniany do przestrzeni międzykomórkowej TNF- α działa lokalnie na prawie każdy rodzaj komórek, w tym na same makrofagi, kontrolując ich przeżycie i śmierć (Laha i in. 2021). Eksperymenty na zwierzętach pokazały, że TNF- α stymuluje rekrutację neutrofilów do naczyń krwionośnych i zwiększa transmigrację leukocytów poprzez udział w reorganizacji cytoszkieletu oraz kontroli ekspresji neutrofilowych chemokin, takich jak CXCL1, CXCL2 i CXCL5 oraz E-selektyny w komórkach śródbłoka (Griffin i in., 2012; Laha i in. 2021). Działa również aktywująco na fibroblasty, które kiedy traktowane TNF- α nabierają specyficznych cech fibroblastów związanych z rakiem (ang. cancer associated fibroblasts; CAFs), i w takiej formie pełnią kluczową rolę w progresji raka (Laha i in. 2021; Zhou i in., 2015). TNF- α poprzez bezpośredni wpływ na ekspresję czynnika wzrostu śródbłoka naczyniowego C (VEGFC) może pośrednio kontrolować aktywację receptora czynnika wzrostu śródbłoka naczyniowego (VEGFR), który ma wpływ na proces neoangiogenezy w TME. Potwierdziły to badania *in vivo* u myszy z utratą funkcji TNFR1 (Tnfr1(-/-)). Pokazano, że deficyt TNFR1 ogranicza limfangiogenezę w guzie i formowanie przerzutów w węzłach chłonnych (Ji i in., 2014). W TME TNF- α pełni też ważną rolę w generowaniu środowiska immunosupresyjnego. Poprzez aktywację receptora TNFR2 może indukować akumulację komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego (MDSC) i hamować ich różnicowanie, ograniczając tym samym udział tego typu komórek w odpowiedzi immunologicznej (Sade-Feldman i in., 2013).

1.2.4. Wpływ TNF- α na metabolizm komórek

Na początku lat 90-tych XX wieku, po przypadkowej obserwacji, że poziom TNF- α utrzymuje się na istotnie podwyższonym poziomie w tkance tłuszczowej otyłych i insulinoopornych gryzoni oraz, że może pośredniczyć w insulinooporności, TNF- α określony został mianem adipokiny (Hotamisligil i in., 1993). Dalsze badania wykazały, że TNF- α ma bezpośredni wpływ na kontrolę homeostazy glukozy i metabolizm lipidów. Jak pokazano, poprzez hamowanie zarówno aktywności, jak i ekspresji lipazy lipoproteinowej (LPL), TNF- α ogranicza w adipocytach wychwyt wolnych kwasów tłuszczowych (FFA) i syntezę trójglicerydów przy jednoczesnym zwiększeniu lipolizy (Chen i in., 2009; Hauner i in., 1995). Szereg badań przeprowadzonych na adipocytach sugeruje, że TNF- α może również działać bezpośrednio na ekspresję genu kodującego białkowy transporter glukozy typu 4 (*GLUT4*), a tym samym regulować transport glukozy do komórek (Hauner i in., 1995). Vaughan i współpracownicy, badając wpływ TNF- α na metabolizm komórek raka prostaty, obserwowali zwiększoną tlenową glikolizę, wzrost produkcji ATP i wydzielanie mleczanu oraz zmniejszony metabolizm oksydacyjny i funkcję mitochondriów. To wskazało, że TNF- α może brać udział w indukcji efektu Warburga w komórkach nowotworowych (Vaughan i in., 2013). Badania te były zgodne z wcześniejszymi obserwacjami, że podczas różnicowania komórek macierzystych TNF- α działał stymulująco na wychwyt glukozy oraz zwiększał ekspresję i aktywność podjednostki A dehydrogenazy mleczanowej (LDHA), co korelowało ze zwiększoną produkcją mleczanu (Nehar i in., 1997). Podobne obserwacje poczyniono w badaniach nad chłoniakami nieziarniczymi, podczas których stwierdzono, że TNF- α generuje zmiany w wewnątrzkomórkowym profilu izoenzymów LDH w limfocytach, przekierowując metabolizm pirogronianu na produkcję mleczanu, co było ściśle związane ze stopniem aktywacji komórek i odpowiedzią na chemioterapię (Jurisic i in., 2004). Z drugiej strony wiadomo, że eksperymentalne zaburzenie metabolizmu białek, poprzez zastosowanie inhibitorów transkrypcji lub transkrypcji, wysoce uwrażliwia komórki na cytotoksyczne działanie TNF- α , co sugeruje ścisły związek między stanem metabolicznym komórki, a jej odpowiedzią na TNF- α (Larrick and Wright, 1990).

1.2.5. Wpływ TNF- α na migrację i przerzutowanie komórek nowotworowych

W kontekście inwazji i przerzutowania nowotworów jednym z najważniejszych działań TNF- α jest jego zdolność do indukcji ekspresji białek proteolitycznych, przede wszystkim

metaloproteinazy macierzy 9 (MMP9), ale też peptydaz dipeptydylowych CD26 i FAP- α , oraz ich lokowania w tratwach lipidowych w komórkach nowotworowych, poprzez aktywację szlaku sygnałowego MAPK/ERK (Wolczyk i in., 2016). MMP9, endopeptydaza zależna od cynku i wapnia (znana również jako kolagenaza typu IV o masie 92 000 Da lub żelatynaza B), jako jeden z głównych mediatorów degradacji białek zewnątrzkomórkowych, takich jak kolagen, fibronektyna i laminina, bierze udział w reorganizacji ECM i usuwaniu fizycznych barier dla migracji komórek. Jej aktywność proteolityczna nie tylko ułatwia rozprzestrzenianie się inwazyjnych komórek nowotworowych i napływ komórek odpornościowych do zrębu guza, ale też umożliwia tworzenie nowych naczyń krwionośnych i limfatycznych, które są niezbędne do zaopatrywania tkanki nowotworowej w składniki odżywcze i tlen. MMP9, poprzez uwalnianie z macierzy różnego rodzaju bioaktywnych peptydów, ma wpływ na aktywację ścieżek sygnałowych, które stymulują migrację komórek nowotworowych ale też ekspresję czynników wzrostu i cytokin, w tym VEGF, bFGF, TGF- β , TNF- α , PDGF lub IL-8. Aktywność proteolityczna MMP9 ma również istotne znaczenie w regulacji interakcji komórka-komórka poprzez udział w obniżaniu poziomu E-kadheryny, cząsteczki adhezyjnej o kluczowym znaczeniu dla utrzymania struktury nabłonka. Podwyższone poziomy MMP9 są często obserwowane w różnych typach nowotworów i korelują z inwazyjnością i przerzutowaniem (Augoff K i in., 2022; Cowden i in., 2008; Hryniewicz-Jankowska i in., 2021; Zaremba-Czogalla i in., 2018). Ostatnie badania pokazały, że MMP9 jest też ważnym składnikiem niszy przerzutowej. Wykorzystując model raka piersi, pokazano, że blokowanie MMP9 za pomocą przeciwciał monoklonalnych, specyficznych dla aktywnej formy MMP9, hamuje kolonizację komórek nowotworowych w przedprzerzutowej niszy płucnej (Owyong i in., 2019). Badania eksperymentalne z wykorzystaniem pierwotnych komórek macierzystych potrójnie ujemnego raka piersi (BCSC) pokazały, że TNF α nie tylko promował przejście nabłonkowo-mezenchymalne komórek macierzystych, ich proliferację i migrację ale też stymulował neowaskulogenezę w niszy przedprzerzutowej poprzez indukcję cząsteczki adhezji komórek naczyniowych-1 (VCAM-1) w wątrobie myszy z wszczepionym guzem (Narasimhan i in., 2022).

1.3. Przeprogramowanie metaboliczne w transformacji nowotworowej

W ciągu ostatnich kilku dekad stawało się coraz bardziej jasne, że nieprawidłowy wzrost komórek, towarzyszący transformacji nowotworowej, pociąga za sobą zmiany adaptacyjne metabolizmu komórkowego, które są niezbędne do zapewnienia wystarczającej ilości

substratów i energii, wymaganych do szybkiego podziału. W ten proces adaptacyjny zaangażowane są przede wszystkim szlaki metaboliczne dotyczące przemian glukozy, glutaminy oraz biogenezy i aktywności mitochondriów (Hanahan i Weinberg, 2000). Aktywność metaboliczna komórek prawidłowych, w normalnych warunkach z prawidłowym dostępem tlenu, opiera się głównie na mitochondrialnej fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS), która generuje energię z wykorzystaniem adenozyno 5'-trifosforanu (ATP). W warunkach normoksji jest to najbardziej efektywny szlak, dzięki któremu komórka z każdej cząsteczki glukozy jest w stanie wygenerować poprzez łańcuch oddechowy 36 cząsteczek ATP. Komórki nowotworowe, chociaż preferencyjnie wykorzystują glukozę do produkcji energii, to jednak w ograniczonym zakresie korzystają z fosforylacji oksydacyjnej, przekierowując szlak glikolizy na przemianę pirogronianu w mleczan, nawet w warunkach normoksji (Vander i in., 2009). To odróżnia ten proces od normalnej glikolizy beztlenowej, która jest aktywowana w prawidłowych komórkach w warunkach niedotlenienia. Efekt ten jako pierwszy opisał pod koniec lat dwudziestych ubiegłego wieku Otto Warburg, określając go mianem glikolizy tlenowej (obecnie znany jako efekt Warburga) (Warburg, 1930). Podczas metabolizowania glukozy do mleczanu powstają tylko 2 cząsteczki ATP na cząsteczkę glukozy. Ten niewielki zysk energetyczny komórki nowotworowe rekompensują zwiększeniem wychwytu i tempa przemian glukozy, czemu towarzyszy zwiększona ekspresja transporterów glukozy (GLUTs) oraz głównych enzymów glikolitycznych, heksokinazy (HK), w tym głównie izoformy 2 (HK2) i fosfofruktokinazy 1 (PFK-1), związana między innymi z zaburzeniami w aktywacji protoonkogenu *Myc* (Gordan i in., 2007; Hsu i Sabatini, 2008).

Rozkład glukozy do mleczanu nie tylko szybko dostarcza energii ale też umożliwia odtworzenie NAD^+ , zapewniając ciągłość glikolizy, a także omija mechanizm hamowania cyklu kwasu trikarboksylowego (TCA), który jest włączany w odpowiedzi na wzrastające stężenie zredukowanego dwunukleotydu adeninowego (NADH) (Nguyen i in., 2018). Wysoka produkcja mleczanu, który usuwany jest z komórki za pomocą zlokalizowanych w błonie transporterów monokarboksylowych MCT (ang. monocarboxylate transporters), generuje lokalnie kwaśne środowisko, tak charakteryczne dla tkanek nowotworowych (de la Cruz-López i in., 2019). Rola kwasu mlekowego w rozwoju raka przyciąga ostatnio coraz większą uwagę badaczy jako onkometabolit, którego obecność wydaje się niezbędna do rozwoju nowotworów, szczególnie w kontekście hamowania antynowotworowej odpowiedzi immunologicznej (Choi i in., 2013).

Sam proces glikolizy dostarcza też wiele metabolitów, z których część może być wykorzystywana w szlaku pentozofosforanowym (PPP) do produkcji erytrozo-4-fosforanu

(E4P), będącego prekursorem syntezy aminokwasów aromatycznych lub formowania rybozo-5-fosforanu (R5P), użytego następnie do produkcji nukleotydów, niezbędnych dla proliferującej komórki (Vander i in., 2009). Takie przekierowanie glikolitycznych produktów pośrednich na szlaki biosyntezy umożliwia dimeryczna izoforma M2 kinazy pirogronianowej (PKM2) o niskiej aktywności katalitycznej, preferencyjnie ekspresjonowana w komórkach nowotworowych, która spowalnia konwersję fosfoenolopirogronianu (PEP) do pirogronianu i w konsekwencji powoduje nadmierne gromadzenie się metabolitów glikolizy (Zahra i in., 2020). Niewielki procent pirogronianu, który dostaje się do mitochondriów i wchodzi w cykl TCA, zostaje w formie cytrynianu przekierowany za pośrednictwem mitochondrialnego transportera trikarboksylanów do cytozolu, gdzie po przekształceniu w acetylo-CoA zostaje wykorzystywany jako prekursor do biosyntezy lipidów i acetylacji białek (Nguyen i in., 2018).

Glikoliza nie jest jednak jedynym procesem dostarczającym komórkom nowotworowym zarówno energii, jak i metabolitów. Glutaminoliza, proces katabolizmu glutaminy, jest ważną alternatywą dla mitochondrialnej produkcji energii z glukozy. W komórkach nowotworowych glutamina może bezpośrednio przyczyniać się do biosyntezy nukleotydów na przykład poprzez syntetazę karbamoilofosforanową (CAD) lub ulegać przekształceniu w reakcji katalizowanej przez glutaminazę (GLS) do glutaminianu, a następnie deaminacji przy udziale GLUD1/dehydrogenazy glutaminianowej (GDH) lub aminotransferazy takiej jak transaminaza glutaminianowo-oksaloocetanova (GOT) do α -ketoglutaranu (α -KG), który wchodzi do cyklu TCA w celu wytworzenia energii lub podlega karboksylacji redukcyjnej, stanowiącej drogę do syntezy lipidów (Nguyen i in., 2018). Poza udziałem w wielu szlakach metabolicznych, α -KG pełni również ważną rolę w regulacji metylacji histonów i DNA, będąc substratem dla jądrowych dioksygenaz zależnych od α -KG/ Fe^{2+} , takich jak TET (ang. ten-eleven translocation) czy demetylaz histonowych zawierających domenę JmjC (JHDM) (Teperino i in., 2010). Co ciekawe, wykazano też, że wpływ glutaminy z komórki jest sprzężony z jednoczesnym importem, poprzez zlokalizowany w błonie plazmatycznej antyporter neutralnego aminokwasu LAT1, egzogennych aminokwasów takich jak leucyny, izoleucyny, waliny, metioniny, tryptofanu i fenyloalaniny (Yanagida i in., 2001). Wysokie zużycie glutaminy jest często obserwowane w nowotworach i koreluje zarówno z żywotnością komórek nowotworowych, jak i z proliferacją, wspierając rozwój choroby (Lukey i in., 2013).

W początkowej fazie rozwoju guza brak odpowiedniego unaczynienia formującej się tkanki generuje stan niedotlenienia. W odpowiedzi na taki stan uruchamiane są reakcje stresowe, które działają jako kluczowy inicjator przeprogramowania metabolicznego komórek nowotworowych (Muz i in., 2015). Mechanizmy molekularne, leżące u ich podstaw są złożone

i obejmują aktywację wielu kluczowych regulatorów. Najważniejszym z nich wydaje się czynnik indukowany hipoksją-1 α (HIF-1 α), będący jednym z najlepiej poznanych czynników transkrypcyjnych, wrażliwych na wahania stężenia tlenu. W warunkach normoksji, kiedy jest wystarczająca ilość tlenu, HIF-1 α jest szybko degradowany w komórkach. Natomiast w warunkach niedotlenienia proces ten jest wstrzymywany i następuje szybka akumulacja HIF-1 α , który jest następnie transportowany do jądra komórkowego, gdzie poprzez wiązanie do konsensusowych sekwencji HRE (ang. hypoxia-responsive element) promotorów, aktywuje transkrypcję genów zaangażowanych zarówno w metabolizm glukozy, jak i angiogenezę, umożliwiając komórkom nowotworowym adaptację do środowiska o niskiej zawartości tlenu, ale też promując formowanie nowych naczyń krwionośnych (Wicks i in., 2022). Wiadomo, że HIF-1 α indukuje ekspresję genów takich białek jak GLUT1 i GLUT3, należących do rodziny transporterów glukozy GLUT, dzięki którym możliwy jest zwiększony pobór glukozy do komórek nowotworowych. HIF-1 α jest też głównym regulatorem ekspresji genów kodujących enzymy glikolityczne, w tym fosfofruktokinazę typu wątrobowego (PFKL), aldolazę (ALDA), kinazę fosfoglicerynową-1 (PGK1), enolazę (ENOL) oraz podjednostkę A dehydrogenazy mleczanowej (LDHA) (Kierans i Taylor, 2021; Muz i in., 2015; Wicks i in., 2022).

Oprócz HIF-1 α ważnym regulatorem metabolizmu komórek nowotworowych jest szlak PI3K/Akt/mTOR, który promuje wychwyt glukozy i innych składników odżywczych, a także syntezę makrocząsteczek niezbędnych do wzrostu i podziału komórek. Podobnie jak szlak kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMPK), który kiedy indukowany w odpowiedzi na stres energetyczny promuje glikolizę i utlenianie kwasów tłuszczowych (Muz i in., 2015). Ważnym regulatorem efektu Warburga jest też białko supresorowe guza, p53. Białko to odgrywa kluczową rolę w regulacji wzrostu i podziału komórek. Mutacje w genie *Tp53* są jednymi z najczęściej identyfikowanych mutacji związanych z kancerogenezą i spotyka się je w większości ludzkich nowotworów (Hollstein i in., 1991). Podczas prawidłowego funkcjonowania p53 może hamować efekt Warburga, promując fosforylację oksydacyjną i ograniczając glikolizę (Simabuco i in., 2018).

1.3.1. Rola LDH w efekcie Warburga

Cechą charakterystyczną efektu Warburga (glikolizy tlenowej) jest produkcja i sekrecja przez komórki nowotworowe wysokich poziomów mleczanu. Reakcją odpowiedzialną za ten efekt jest konwersja pirogronianu do mleczanu z jednoczesnym utlenianiem NADH do NAD⁺, którą katalizuje (odwracalnie) dehydrogenaza mleczanowa (LDH). Enzym ten występuje w

pięciu izoformach (LD1-5, lub B4, A1B3, A2B2, A3B1 i A4), które chociaż katalizują tę samą reakcję, to różnią się strukturą molekularną, powinowactwem do substratu, wrażliwością na temperaturę i specyficznnością tkankową (Krieg i in., 1967). Aktywne izoformy LDH są homo- lub heterotetramerycznymi kombinacjami dwóch podjednostek, A (występującej też pod nazwą M) i B (znanej też jako H), o masie cząsteczkowej około 35 000 Da każda. Podjednostki A i B kodowane przez dwa odrębne geny, *LDHA* i *LDHB*, zlokalizowane odpowiednio na chromosomach 11p15.4 i 12p12.2-p12.1 (Fondy i Kaplan, 1965). Znany jest dodatkowy, trzeci typ podjednostki LDH, określanej jako C, który jest kodowany przez gen *LDHC* (lub *LDHX*) zlokalizowany na chromosomie 11p15.5-p15.3. Jednak formuje on wyłącznie specyficzne tkankowo homotetramery, ograniczone do plemników i jąder. Formy splicingowe genu *LDHC* wyjątkowo można obserwować w ludzkich nowotworach, głównie w raku płuc, czerniaku i raku piersi, ale nigdy w zdrowych tkankach kontrolnych (Gupta, 2012).

Podjednostka A, która charakteryzuje się wysokim powinowactwem do pirogronianu, predysponuje izoformy LDH do przekształcania pirogronianu w mleczan, podczas gdy izoformy, w których dominuje podjednostka B, kinetycznie sprzyjają konwersji mleczanu do pirogronianu, przy jednoczesnej redukcji NAD^+ . Każda z podjednostek determinuje więc specyficzne właściwości metaboliczne poszczególnych izoform. Uważa się, że izoenzymy LDH wzbogacone w podjednostkę A, takie jak LD5 i LD4, odgrywają ważną rolę w komórkach nowotworowych w utrzymaniu glikolizy po ominięciu "efektu Pasteura" (Koukourakis i in., 2014; Forkasiewicz i in., 2020). Pomijając nieliczne wyjątki przyjmuje się, że izoenzymogram LDH odzwierciedla stan metaboliczny komórek i tkanek. Potwierdzają to badania, w których analizowano zmiany procentowego udziału izoform w komórkach podczas różnicowania i w czasie transformacji nowotworowej (Cahn i in., 1962).

W większości komórek nowotworowych obserwowany jest zwiększony poziom podjednostki A w porównaniu z komórkami prawidłowymi. Wyciszenie ekspresji genu *LDHA* lub zastosowanie specyficznych inhibitorów dla LDHA skutkuje ograniczeniem produkcji mleczanu i jednocześnie zmniejszeniem żywotności komórek oraz ich zdolności do inwazji (Forkasiewicz i in., 2022; Le i in., 2010; Li i in., 2016). W wielu typach nowotworów zmiany związane z LDH znaleziono również w izoenzymogramach, z tendencją do zwiększania ekspresji form bogatych w podjednostkę A. Dotyczy to głównie nowotworów tarczycy, okrężnicy, macicy i jajników, żołądka, nerek, ośrodkowego układu nerwowego i płuc (Langvad, 1968; Lewis i in., 1971; von Eyben i in., 2001; Woollams i in., 1976; Yu i in., 2014).

Efektorem zwiększonej aktywności LDH w nowotworach jest nadmierna produkcja i wydzielanie mleczanu co w konsekwencji prowadzi do spadku pH w mikrośrodowisku guza do

wartości, które waha się od 6,0 do 6,5. Wzrost zakwaszenia zewnątrzkomórkowego koreluje ze zwiększoną agresywnością komórek nowotworowych, co sprzyja takim procesom jak inwazja, angiogeneza, przerzutowanie, ale też immunosupresja i oporność na leczenie, w efekcie wiąże się z gorszym rokowaniem dla pacjenta (de la Cruz-López i in., 2019). Obecnie uważa się, że mleczan może nie tylko działać jako onkometabolit o właściwościach sygnalizacyjnych, ale może być również transportowany do mitochondriów, utleniany do pirogronianu i włączony do cyklu kwasu trikarboksylowego (TCA), stanowiąc źródło energii (San-Millán i in., 2017). Sugestie, że ograniczenie produkcji mleczanu w komórkach nowotworowych powinno być priorytetem w opracowywaniu nowych terapii przeciwnowotworowych, wydają się więc w pełni uzasadnione.

2. Cel pracy

W normalnych warunkach skutkiem działania TNF- α jest eliminacja uszkodzonych komórek gospodarza poprzez włączanie procesów apoptozy. Z nieznanymi dotąd powodów komórki nowotworowe są odwrażliwione na cytotoksyczne działanie TNF- α . Co więcej, efektem działania TNF- α w przypadku większości komórek nowotworowych jest podtrzymywanie funkcji promujących przeżycie, a także zwiększanie potencjału migracyjnego i inwazyjnego, poprzez indukcję produkcji i aktywacji MMP9 (Aggarwal, 2003; Croft i in., 2017; Larrick and Wright, 1990; Wolczyk i in., 2016).

Mechanizmy, które determinują ten antyapoptotyczny efekt nie są jasne. Wiadomo, że ważną rolę w regulacji odpowiedzi komórkowej odgrywa mikrośrodowisko nowotworowe, odpowiedzialne nie tylko za poziom uwalnianego do przestrzeni pozakomórkowej TNF- α , ale też za obecność wielu innych czynników stymulujących komórki nowotworowe do ucieczki przed apoptozą (Dandoti, 2020). Wiadomo, że mikrośrodowisko odpowiada za regulację ekspresji podjednostki A dehydrogenazy mleczanowej (LDHA), zależną od HIF-1 α (Kierans i Taylor, 2021; Muz i in., 2015; Wicks i in., 2022). Podjednostka LDHA, która jest głównym elementem składowym przeprogramowania metabolicznego, uznawanego za jedną z cech charakterystycznych transformacji nowotworowej, umożliwia wzrost poboru glukozy oraz zwiększenie produkcji i wydzielania mleczanu, a także pośrednio syntezy metaloproteinaz, przez co odgrywa istotną rolę w dostosowaniu komórek nowotworowych do specyficznych wymagań metabolicznych. Dane literaturowe wskazują, że zarówno wyciszenie ekspresji genu *LDHA*, jak i zahamowanie aktywności enzymatycznej LD5 (A4) może prowadzić do zaburzeń

metabolicznych, a nawet śmierci komórki przez apoptozę. Pytanie, czy zmiany metaboliczne związane z adaptacją metabolizmu zależnego od LDH (efekt Warburga) przez komórki nowotworowe mają wpływ na uruchamianie systemów blokujących zewnątrzkomórkowy sygnał(y) do apoptozy, w tym na zdolność przełączania ścieżki transmisji sygnału stymulowanego przez TNF- α z proapoptotycznego na promujący przeżycie, pozostaje otwarte. Dlatego celem tej pracy ma być ocena udziału LDHA w ucieczce komórek nowotworowych przed apoptozą, indukowaną cytokiną prozapalną TNF- α , na przykładzie komórek raka przełyku.

3. Prace związane z niniejszą rozprawą

- Forkasiewicz A, Dorociak M, Stach K, Szelachowski P, Tabola R, Augoff K. The usefulness of lactate dehydrogenase measurements in current oncological practice. **Cell Mol Biol Lett.** 2020 Jun 9;25:35. doi: 10.1186/s11658-020-00228-7.
- Forkasiewicz A, Stach W, Wierzbicki J, Stach K, Tabola R, Hryniewicz-Jankowska A, Augoff K. Effect of LDHA Inhibition on TNF- α -Induced Cell Migration in Esophageal Cancers. **Int J Mol Sci.** 2022 Dec 16;23(24):16062. doi: 10.3390/ijms232416062.

4. Wyniki

4.1. Ekspresja *LDHA*, *LDHB*, *TNFA*, *TNFRSF1A*, *TNFRSF1B* oraz *MMP9* jest zaburzona w raku przełyku

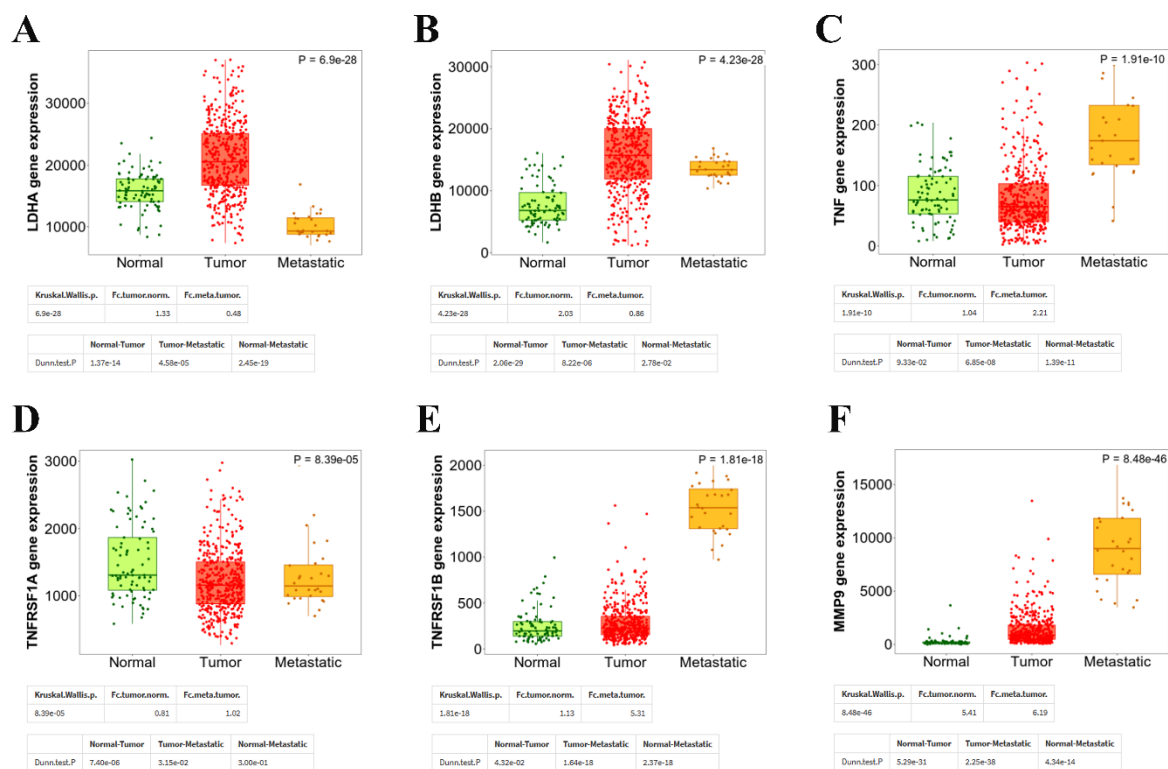
Aby wykazać znaczenie podjednostki LDHA we wroście guza przełyku, wykorzystano dane dostępne w internetowej bazie TNMplot do analizy poziomu ekspresji genów LDHA w próbkach tkanki guza przełyku (n=440) i porównano go z poziomem wyznaczonym dla normalnych tkanek kontrolnych (n=88) oraz tkanek guzów przerzutowych (n=28). Wyniki wykazały znaczny wzrost ekspresji *LDHA* w guzach pierwotnych (mediana = 20598,5, zakres: 7361-39687) w porównaniu z tkankami prawidłowymi (mediana = 15836,5, zakres: 8358-24391; p<0,0001) oraz w porównaniu z tkankami guzów przerzutowych (mediana = 9307, zakres: 6977-16863; p<0,0005). Interesujące, że ekspresja *LDHA* w guzach przerzutowych obniża się drastycznie, a jej poziom jest istotnie mniejszy niż w tkankach kontrolnych (p<0,0001) (Ryc. 3A). Tkanki guzów pierwotnych charakteryzuje też istotnie zwiększony poziom ekspresji genu *LDHB* (mediana = 15735, zakres: 1201-3108) w porównaniu z

prawidłowymi tkankami (mediana = 6834,5, zakres: 1684-16074; $p < 0,0001$). W tkankach przerzutowych ekspresja genu *LDHB* zmniejsza się w porównaniu do guzów pierwotnych (mediana = 13405, zakres: 10377-16831; $p < 0,0001$), ale inaczej niż w przypadku *LDHA*, jest na wyższym poziomie niż w tkankach kontrolnych ($p < 0,05$) (Ryc. 3B).

Analizując ekspresję genu *TNFA* (*TNFSF2*), zaobserwowano brak istotnych różnic pomiędzy prawidłowymi tkankami przełyku (mediana = 76, zakres: 8-204) i tkankami guzów pierwotnych (mediana = 65, zakres: 2-644; $p > 0,05$), niemniej dane uzyskane z guzów charakteryzują się znacznie większym rozrzutem. Co ciekawe, poziom ekspresji genu *TNFA* zwiększa się znacząco w tkankach guzów przerzutowych (mediana = 178, zakres: 41-421) i to zarówno w porównaniu z tkankami kontrolnymi ($p < 0,0001$), jak i z guzami pierwotnymi ($p < 0,0001$) (Ryc. 3C).

W przypadku genu kodującego receptor 2 TNF- α (*TNFRSF1B*) obserwowano istotne zwiększenie ekspresji w tkankach przerzutowych (mediana = 1538, zakres: 973-2064) zarówno w porównaniu z tkankami kontrolnymi (mediana = 195, zakres: 56-995; $p > 0,0001$), jak i tkankami guzów pierwotnych (mediana = 225, zakres: 41-1562; $p > 0,0001$), ale inaczej niż w przypadku genu *TNFA*, różnice pomiędzy ekspresją *TNFRSF1B* w próbach kontrolnych i tkankach guzów pierwotnych są statystycznie istotne ($p < 0,05$) (Ryc. 3D). Różnice pomiędzy tkankami prawidłowymi i guzami pierwotnymi obserwowano również analizując ekspresję genu kodującego receptor 1 TNF- α (*TNFRSF1A*), jednak w tym przypadku poziom *TNFRSF1A* w guzach pierwotnych (mediana = 1166, zakres: 264-6962) jest istotnie mniejszy w porównaniu z tkankami kontrolnymi (mediana = 1336, zakres: 581-4046; $p < 0,05$). Choć poziom ekspresji *TNFRSF1A* w guzach metastatycznych (mediana = 1143,5, zakres: 698-2943) był nieznacznie obniżony w stosunku do tkanek kontrolnych, to różnice te nie są statystycznie istotne ($p > 0,05$) (Ryc. 3E).

Dodatkowo przeprowadzono analizę ekspresji genu *MMP9*. Tkanki guzów pierwotnych przełyku charakteryzuje wysoki poziom ekspresji *MMP9* (mediana = 883, zakres: 59-21982) i jest on istotnie większy od tego, oznaczonego w tkankach prawidłowych (mediana = 156, zakres: 12-3674; $p < 0,0001$). Jednak najwyższy poziom ekspresji *MMP9*, statystycznie różny niż w tkankach prawidłowych ($p < 0,0001$) i w guzach pierwotnych ($p < 0,0001$), obserwuje się w tkankach guzów przerzutowych (mediana = 9007,5, zakres: 3484-17426) (Ryc. 3F).



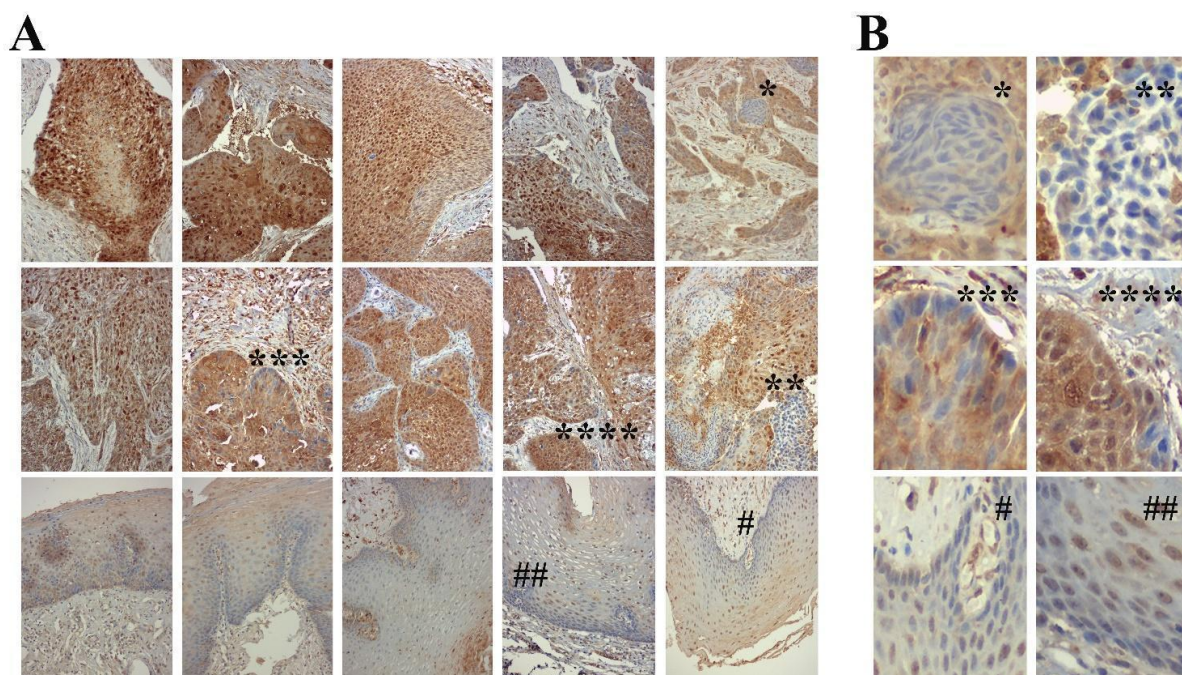
Rycina 3. Ekspresja różnicowa wybranych genów w guzach pierwotnych i przerzutowych pacjentów z rakiem przełyku oraz w prawidłowym nabłonku przełyku na podstawie danych zgromadzonych w bazie TNMplot. A) Ekspresja *LDHA* była znacząco zwiększona w tkankach guzów pierwotnych ($p < 0,00001$) i znacząco zmniejszona ($p < 0,00001$) w tkankach przerzutowych w porównaniu z tkankami prawidłowymi. B) Ekspresja *LDHB* zwiększała się istotnie w tkankach guzów pierwotnych ($p < 0,00001$) oraz w tkankach przerzutowych ($p < 0,05$) w porównaniu z tkankami prawidłowymi. C) Ekspresja *TNFA* w tkankach guzów pierwotnych nie różniła się od tej w tkankach prawidłowych ($p > 0,05$) ale zwiększała się znacząco w tkankach przerzutowych ($p < 0,00001$). D) Ekspresja *TNFRSF1A* (*TNFR1*) w tkankach guzów pierwotnych nieznacznie się zmniejszała, a w tkankach przerzutowych nie zmieniła się w porównaniu z tkankami prawidłowymi ($p > 0,05$). E) Ekspresja *TNFRSF1B* (*TNFR2*) w tkankach guzów pierwotnych nie różniła się od tej w tkankach prawidłowych, ale zwiększyła się istotnie w tkankach przerzutowych ($p < 0,00001$). F) Ekspresja *MMP9* zwiększała się istotnie zarówno w tkankach guzów pierwotnych ($p < 0,00001$) jak i w tkankach przerzutowych ($p < 0,00001$) w porównaniu z tkankami prawidłowymi, przy czym poziom ekspresji *MMP9* w tkankach przerzutowych był istotnie większy niż w tkankach pierwotnych ($p < 0,00001$).

Do analizy zmian w ekspresji LDHA na poziomie białka w tkankach raka przełyku wykorzystano skrawki parafinowe barwione metodą immunohistochemii (IHC). Wyniki analizy przedstawiono w Tabeli 5.

LDHA					
	0	1	2	3	P (χ^2)
Prawidłowy nabłonek przełyku	n=28	n=55	n=19	n=2	
N=10	(28%)	(55%)	(19%)	(2%)	
Rak przełyku	n=0	n=5	n=40	n=55	<0,00001
N=10	(0%)	(5%)	(40%)	(55%)	(122,4)

Tabela 5. Ocena zmian ekspresji LDHA na poziomie białka, oznaczonego metodą IHC, w tkankach nowotworowych przełyku (N=10) w porównaniu z histologicznie prawidłowym nabłonkiem przełyku (N=10), pochodzącym z marginesu resekcji. Materiał do badań pochodził od 10 pacjentów leczonych operacyjnie z powodu raka przełyku w Katedrze i Klinice Chirurgii Przewodu Pokarmowego i Chirurgii Ogólnej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu w latach 2009-2012. Wyniki jako intensywność zabarwienia (0-3), oceniona przez 2 niezależnych obserwatorów w 5 losowo wybranych z każdego preparatu obszarach ($n = 2 \times 5 \times 10 = 100$), analizowano statystycznie przy użyciu nieparametrycznego testu chi-kwadrat (χ^2). Tkanki nowotworowe charakteryzowały się istotnie większym poziomem LDHA w porównaniu z tkankami kontrolnymi ($p < 0,00001$).

Komórki normalnego nabłonka w ponad 80% barwiły się słabo (+) lub wcale (-), w przeciwieństwie do komórek nowotworowych, pochodzących zarówno z nabłonka płaskonabłonkowego, jak i gruczołowego, które w większości (55%) charakteryzowało zabarwienie o wysokiej intensywności (+++) (Ryc. 4A). Analiza statystyczna wykazała, że różnice w poziomie LDHA pomiędzy tkankami kontrolnymi i nowotworowymi są istotne ($p = 2.347e-26$). Niemniej, w przypadku guzów, w obrębie tego samego skupiska komórek nowotworowych można było zaobserwować, obok intensywnie wybarwionych komórek, wyróżniające się „wysepki” o niskiej intensywności zabarwienia, wskazujące na mozaikowość metaboliczną komórek nowotworowych, związaną prawdopodobnie z różnym stopniem ich odróżnicowania (Ryc. 4B).

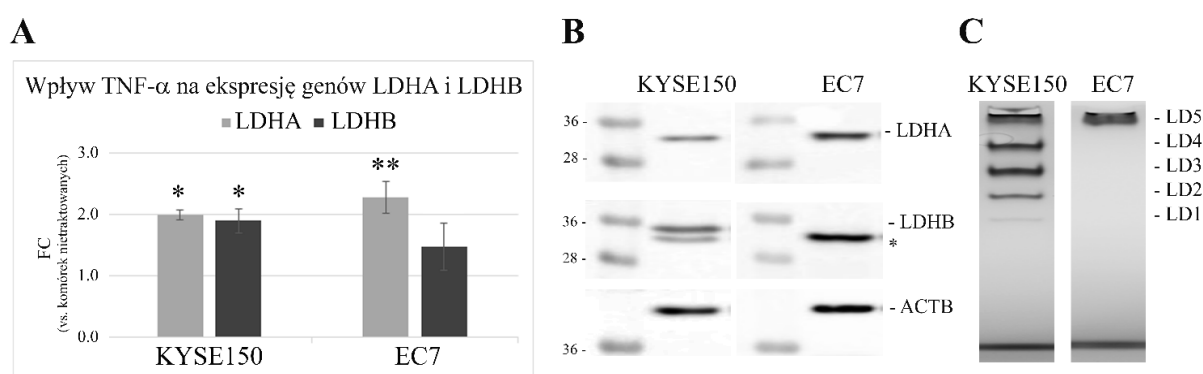


Rycina 4. Barwienie immunohistochemiczne LDHA w rakach przełyku oraz w prawidłowym nabłonku przełyku. A) Silna immunoreaktywność LDHA w komórkach nowotworowych w tkankach nowotworowych, pochodzących od 10 pacjentów, operowanych z powodu raka przełyku (dwa górne panele) oraz reprezentatywne, słabo barwiące się fragmenty histologicznie prawidłowego nabłonka, pochodzące z marginesu resekcji (panel dolny). B) Wybrane fragmenty tkanek w powiększeniu, przedstawiające charakterystyczne „wysepki” komórek nowotworowych, wyróżniające się od pozostałych niską intensywnością zabarwienia (dwa górne panele), porównywalne z tą, charakteryzującą komórki podstawne nabłonka prawidłowego (panel dolny). Oryginalne powiększenie, 200-krotne.

4.2. TNF- α indukuje wzrost ekspresji genów *LDHA* i *LDHB*

Żeby odpowiedzieć na pytanie, czy TNF- α może mieć wpływ na poziom LDH w komórkach raka przełyku, analizowano zmiany ekspresji genów kodujących podjednostkę A i B LDH (*LDHA* i *LDHB*) w komórkach KYSE150 i EC7, traktowanych TNF- α , za pomocą metody RT-qPCR. W przypadku komórek KYSE150, w obecności TNF- α , ekspresja genów *LDHA* i *LDHB* była prawie dwukrotnie większa (FC=1,98 \pm 0,08 i 1,88 \pm 0,2, odpowiednio dla *LDHA* i *LDHB*) w stosunku do komórek nietraktowanych i różnice te były statystycznie istotne (p<0,005). Komórki EC7, podobnie jak KYSE150, istotnie zwiększały ekspresję *LDHA* w efekcie ekspozycji na TNF- α (FC= 2,28 \pm 0,26; p<0,001). Jednak TNF- α nie miał istotnego wpływu na zmiany w ekspresji genu *LDHB* (FC=1,47 \pm 0,39; p>0,05) w komórkach EC7 (Ryc. 5A).

Wykorzystując metodę Western blotting (WB) zweryfikowano bazowe poziomy ekspresji białkowych form LDHA i LDHB w komórkach KYSE150 i EC7 (Ryc. 5B). O ile w przypadku KYSE150 obserwowano na blotach obie podjednostki LDH (LDHA i LDHB), to w ekstraktach białkowych, uzyskanych z komórek EC7 można było zidentyfikować jedynie podjednostkę A (Ryc. 3B). Brak podjednostki B w EC7 potwierdził się w zymogramach, obrazujących rozdział izoenzymów LDH (LD1-LD5). W żelach, na które naniesiono ekstrakty białkowe uzyskane z KYSE150, obserwowano wszystkie pięć izoform, natomiast w komórkach EC7 jedynie izoformę LD5, w skład której wchodzi wyłącznie podjednostka A (Ryc. 5C).



Rycina 5. Ekspresja LDHA i LDHB w liniach komórkowych raka przełyku. A) Analiza zmian ekspresji *LDHA* i *LDHB* z użyciem RT-qPCR w komórkach KYSE150 i EC7 w odpowiedzi na TNF- α . W KYSE150 traktowanie TNF- α powodowało istotne zwiększenie ekspresji obu podjednostek (FC=1,98 \pm 0,08 i 1,88 \pm 0,2, odpowiednio dla *LDHA* i *LDHB*, * p <0,005). W przypadku EC7 traktowanie TNF- α znacząco zwiększyło ekspresję *LDHA* (FC=2,28 \pm 0,26; ** p <0,001) ale nie *LDHB* (FC=1,47 \pm 0,39; p >0,05). **Dane te zostały wykorzystane w publikacji związanej z niniejszą rozprawą (Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 16062).** B) Analiza poziomu LDHA i LDHB w KYSE150 (panel lewy) i EC7 (panel prawy) za pomocą metody Western blotting. ACTB - β -aktyna, białko referencyjne. W EC7 brak pozytywnej reakcji dla LDHB. * - niespecyficzna reakcja wiązania przeciwciał anti-LDHB z LDHA. C) Izoenzymatyczna analiza obrazu izoform LDH w KYSE150 (lewy panel) i EC7 (prawy panel) za pomocą elektroforezy w warunkach natywnych. W komórkach KYSE150 obecne są wszystkie izoenzymy LDH (LD1-LD5). W komórkach EC7 aktywna jest tylko izoforma LD5, zbudowana z podjednostek A.

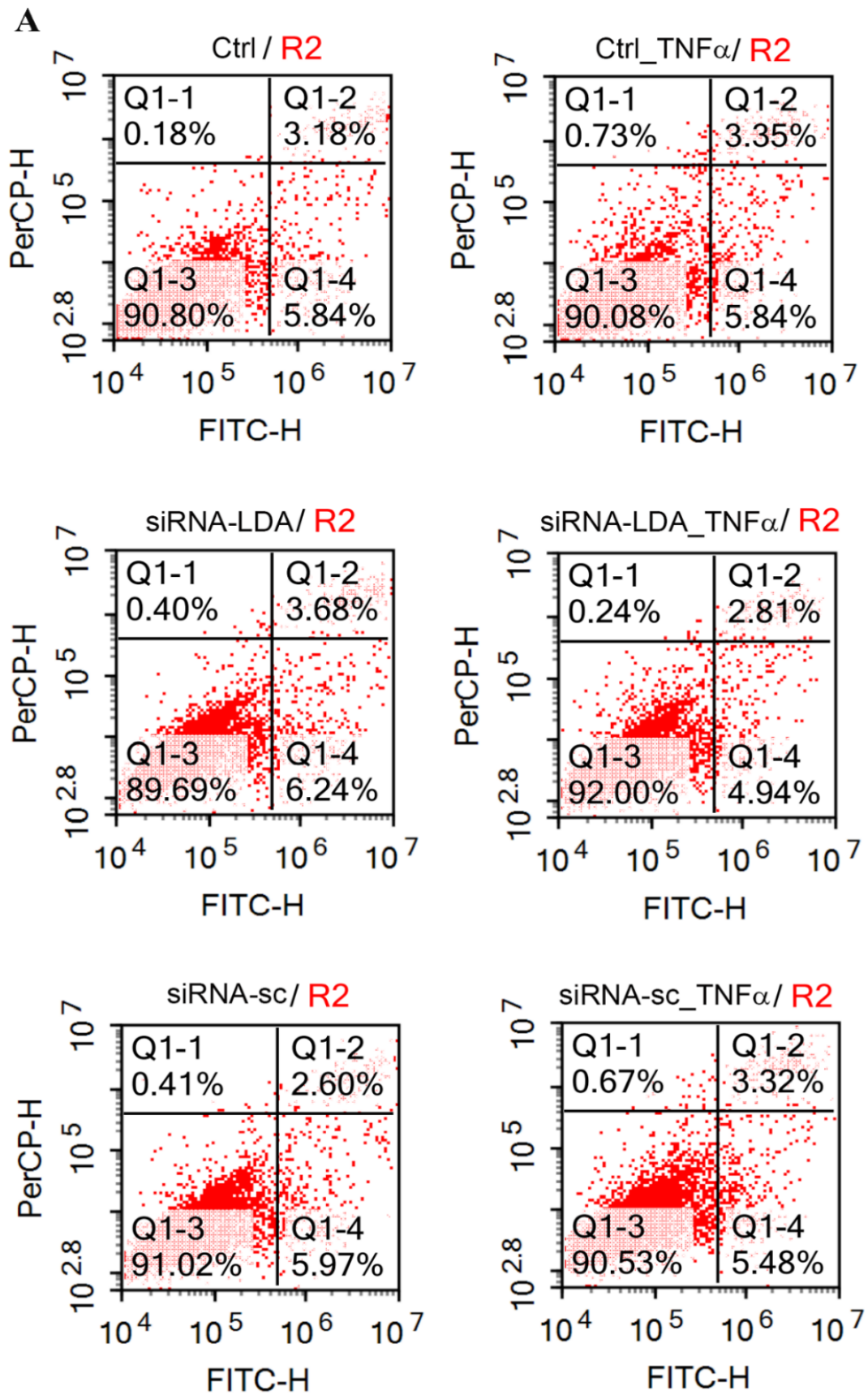
4.3. Wyciszenie ekspresji genu *LDHA* nie powoduje uwrażliwienia komórek raka przełyku na proapoptotyczne działanie TNF- α

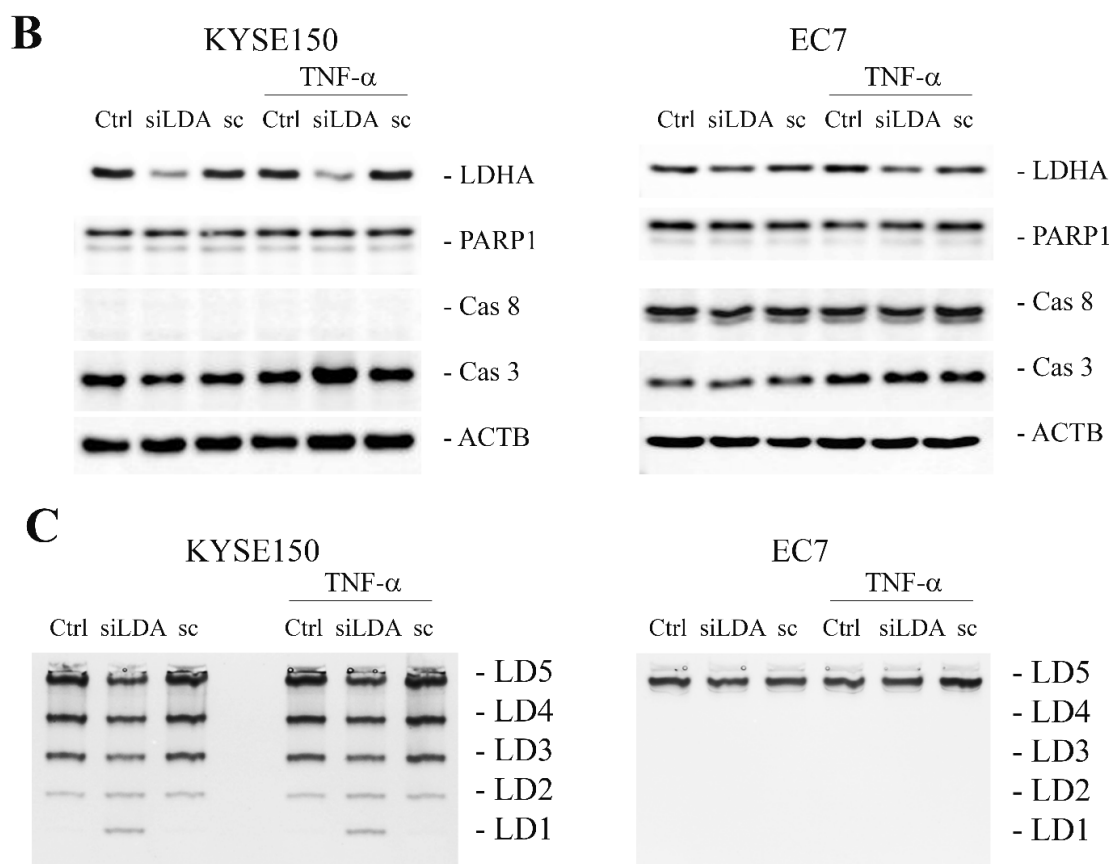
Żeby odpowiedzieć na pytanie, czy efekt Warburga ma związek z odwrażliwieniem komórek nowotworowych na proapoptotyczne działanie TNF- α , wyciszono ekspresję genu

LDHA za pomocą siRNA w dwóch liniach komórek raka przełyku. Komórki transfekowane siRNA *LDHA* traktowano lub nie $\text{TNF-}\alpha$ i analizowano w porównaniu z komórkami nietransfekowanymi (typu dzikiego) lub transfekowanymi kontrolnym siRNA (siRNA scramble). Komórki barwione jodkiem propidyny (IP) oraz aneksynną V sprzężoną z FITC analizowano z użyciem cytometrii przepływowej. Uzyskane wyniki wskazują na brak wpływu obniżenia ekspresji genu *LDHA* na zmianę odpowiedzi komórek nowotworowych na $\text{TNF-}\alpha$ z antyapoptotycznej na proapoptotyczną. Nie obserwowano żadnych istotnych różnic w całkowitym udziale komórek apoptotycznych w badanej populacji pomiędzy komórkami z wyciszoną ekspresją *LDHA* i komórkami kontrolnymi, zarówno typu dzikiego, jak i tych, które były transfekowane kontrolnym siRNA (Ryc. 6A). Niewrażliwość komórek raka przełyku z wyciszoną ekspresją *LDHA* na proapoptotyczne działanie $\text{TNF-}\alpha$ została następnie potwierdzona analizą markerów białkowych, specyficznych dla apoptozy indukowanej $\text{TNF-}\alpha$, mianowicie kaspazy 8, kaspazy 3 i PARP1, z użyciem techniki Western blotting (Ryc. 6B). Traktowanie komórek nowotworowych $\text{TNF-}\alpha$ nie skutkowało aktywacją żadnej z kaspaz ani w przypadku KYSE150 ani EC7 transfekowanych siRNA *LDHA*. Efekt wyciszenia genu *LDHA* w komórkach KYSE150 i EC7 potwierdzono metodą Western blotting (Ryc. 6B) oraz metodą zymografii (Ryc. 6C). Skuteczność wyciszenia oznaczono densytometrycznie i przedstawiono jako procent uśrednionych wartości kontrolnych. W przypadku komórek KYSE150 wartość ta wyniosła $38 \pm 1,5\%$, natomiast w przypadku komórek EC7, $55,7 \pm 13\%$.

4.4. Oksamat sodu (SO) nie odblokowuje mechanizmów apoptozy zależnej od $\text{TNF-}\alpha$ w komórkach raka przełyku

Żeby odpowiedzieć na pytanie, czy zahamowanie aktywności izoformy LD5 w komórkach raka przełyku za pomocą specyficznego dla LDHA inhibitora będzie skutkowało indukcją apoptozy w odpowiedzi na $\text{TNF-}\alpha$, komórki KYSE150 i EC7 hodowano w obecności oksamatu sodu (SO) i traktowano lub nie $\text{TNF-}\alpha$. Porównanie procentowego udziału komórek apoptotycznych, oznaczonych techniką cytometrii przepływowej, w populacji komórek traktowanych wyłącznie SO (19,28%) z tą, którą traktowano dodatkowo $\text{TNF-}\alpha$ (16,41%) pokazało, że zastosowanie oksamatu sodu nie powoduje odblokowania mechanizmów apoptozy w odpowiedzi na $\text{TNF-}\alpha$ (Ryc. 7A). Wyniki te potwierdzono analizując, za pomocą Western blotting, poziom markerów apoptozy związanej z $\text{TNF-}\alpha$, takich jak kaspaza 8, kaspaza 3 i białko PARP1 (Ryc. 7B).

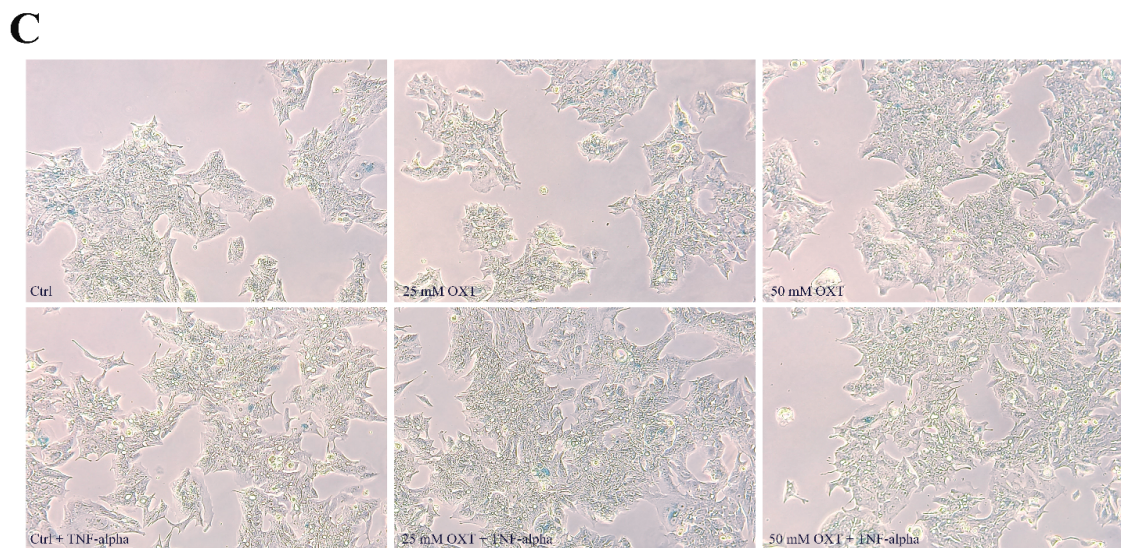
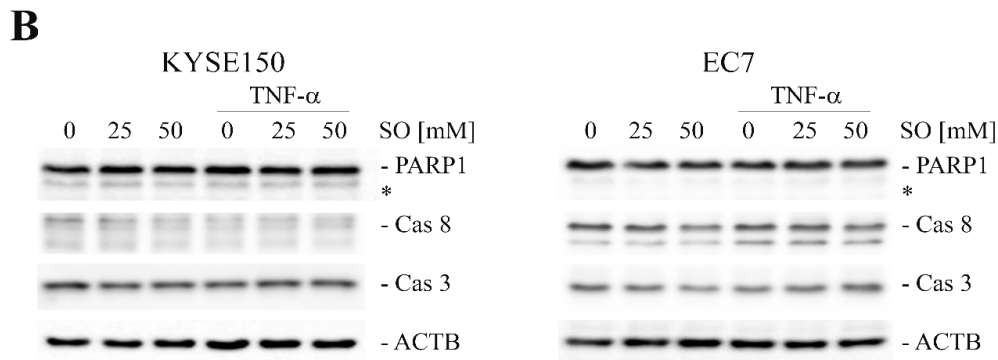
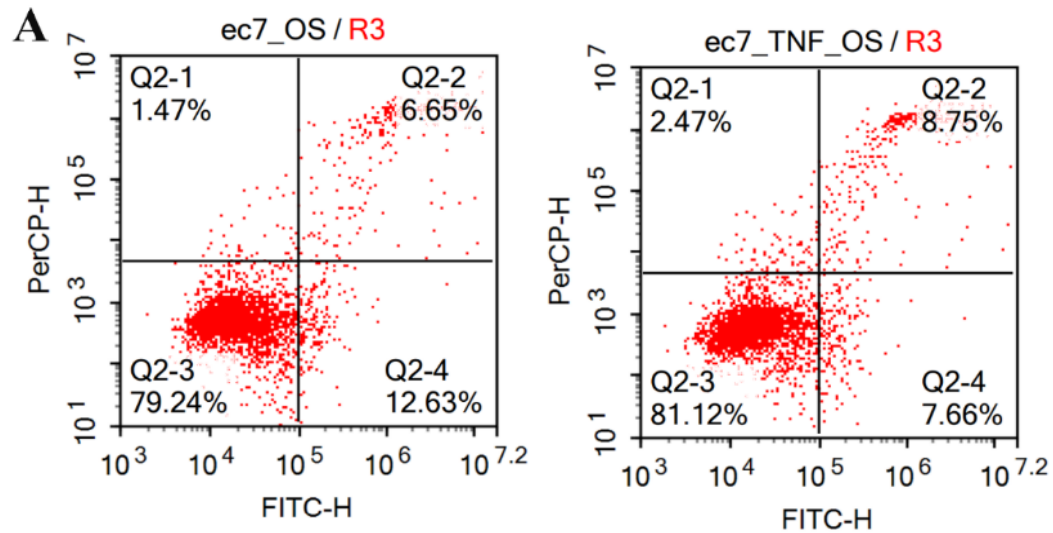




Rycina 6. Efekt wyciszenia ekspresji genu *LDHA* na indukcję apoptozy przez TNF- α . A) Analiza ilościowa apoptozy w populacji komórek EC7 transfekowanych siRNA LDHA i traktowanych TNF- α (30 ng/ml/24h) metodą cytometrii przepływowej. Wyciszenie ekspresji LDHA nie uwrażliwiło komórek EC7 na proapoptotyczne działanie TNF- α . Całkowita liczba komórek apoptotycznych w populacji komórek z wyciszoną ekspresją *LDHA* i traktowanych TNF- α (7,75%) nie zmieniła się znacząco w porównaniu z komórkami kontrolnymi (8,8% i 9,19%, odpowiednio transfekowanych siRNA kontrolnym i nietransfekowanych). B) Analiza zmian w aktywacji markerów apoptozy metodą Western blotting. Wyciszenie ekspresji *LDHA* w KYSE150 i EC7 nie powodowało aktywacji kaspazy 8 i kaspazy 3 oraz PARP1 w odpowiedzi na TNF- α . C) Analiza obrazu izoenzymatycznego komórek KYSE150 i EC7 z wyciszoną ekspresją *LDHA* traktowanych lub nie TNF- α . Efektem wyciszenia ekspresji *LDHA* w KYSE150 było przesunięcie procentowego udziału izoform w kierunku bogatych w podjednostkę B, inaczej niż w EC7, w których obserwowano jedynie zmniejszenie aktywności izoformy LD5. Ctrl - kontrola, si_LDA - siRNA LDHA, sc – siRNA kontrolne.

Żeby sprawdzić, czy potraktowanie komórek inhibitorem LDHA może skutkować przyspieszonym starzeniem się komórek nowotworowych w obecności TNF- α , wykonano test senescencji. Wyniki wskazują, że TNF- α nie tylko nie indukuje apoptozy ale nie aktywuje też procesu starzenia się komórek EC7, w których zahamowano aktywność LD5 oksamatem sodu

(Ryc. 7C). Procentowy udział komórek pozytywnie barwiących się w kierunku lizosomalnej β -galaktozydazy w danej populacji komórek traktowanych i nietraktowanych był podobny i wynosił odpowiednio $12,5 \pm 1,9\%$ i $11,3 \pm 1,5\%$.



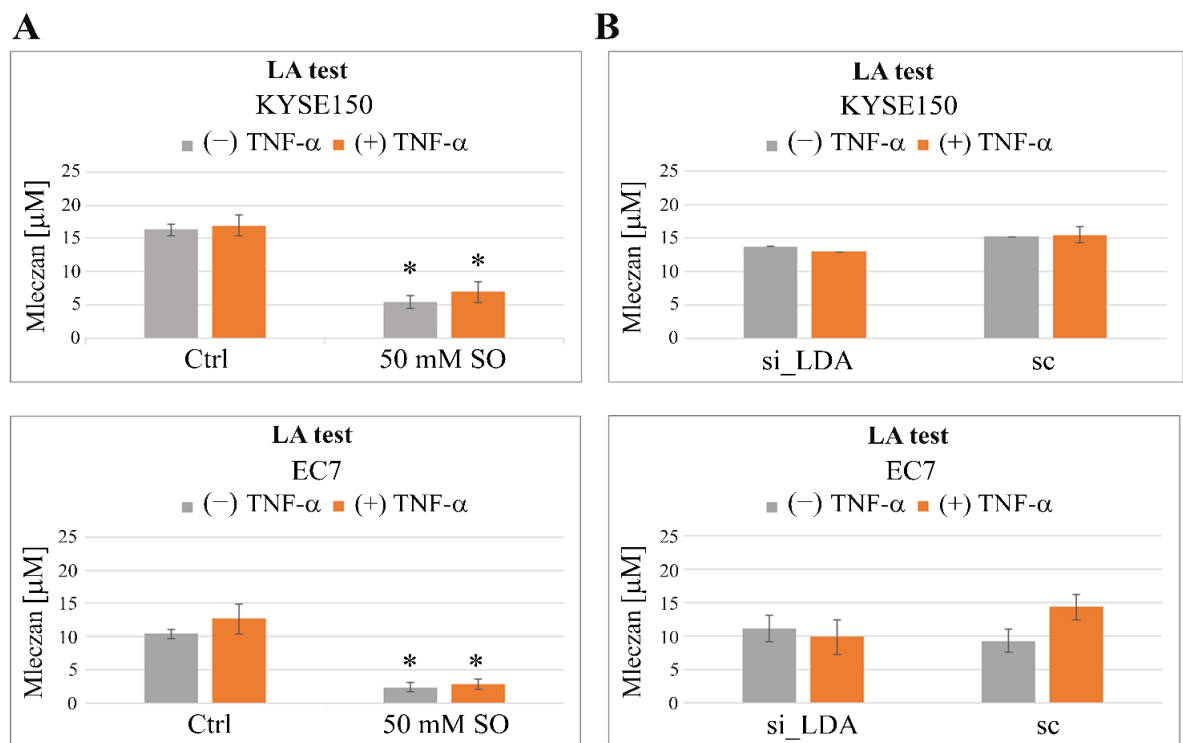
Rycina 7. Efekt hamowania aktywności LDHA za pomocą SO na indukcję apoptozy i senescencji przez TNF- α . A) Analiza ilościowa apoptozy w populacji komórek EC7

traktowanych SO (50 mM/48h) i TNF- α (30 ng/ml/24h) metodą cytometrii przepływowej. Hamowanie aktywności LDHA nie uwrażliwiło komórek EC7 na proapoptotyczne działanie TNF- α . Całkowita liczba komórek apoptotycznych w populacji komórek traktowanych SO i TNF- α (16,41%) nie zmieniała się znacząco w porównaniu z komórkami kontrolnymi (19,28%, traktowanymi wyłącznie SO). B) Analiza zmian w aktywacji markerów apoptozy metodą Western blotting. Hamowanie aktywności LDHA w KYSE150 i EC7 nie powodowało aktywacji kaspazy 8 i kaspazy 3 oraz PARP1 w odpowiedzi na TNF- α . C) Analiza senescencji w populacji komórek EC7 pretraktowanych SO (50 mM) i TNF- α (30 ng/ml). Procentowy udział komórek pozytywnie barwiących się w kierunku lizosomalnej β -galaktozydazy w populacji komórek traktowanych SO i TNF- α wynosił $12,5 \pm 1,9\%$, a w populacji komórek traktowanych wyłącznie SO wynosił $11,3 \pm 1,5\%$. Różnice nie były istotne ($p > 0,05$). Ctrl - kontrola, SO – oksamat sodu.

4.5. Oksamat sodu (SO) zmniejsza wydzielanie kwasu mlekowego i hamuje proliferację komórek raka przełyku

Bardzo wyraźnym efektem działania SO na komórki raka przełyku było znaczne zmniejszenie produkcji mleczanu (LA), niezależnie od tego, czy komórki były dodatkowo stymulowane TNF- α , czy nie. W przypadku KYSE150 SO obniżył istotnie poziom uwalnianego LA z $16,3 \pm 0,9 \mu\text{M}$ do $5,5 \pm 0,9 \mu\text{M}$ ($p < 0,005$). W obecności TNF- α produkcja LA obniżała się na skutek działania SO z $16,96 \pm 1,5 \mu\text{M}$ do $6,96 \pm 1,5 \mu\text{M}$ ($p < 0,005$). Podobny efekt obserwowano w komórkach EC7, w których SO zmniejszał wydzielanie LA z $10,5 \pm 0,7 \mu\text{M}$ do $2,4 \pm 0,7 \mu\text{M}$ pod nieobecność TNF- α i odpowiednio z $12,7 \pm 2,2 \mu\text{M}$ do $2,9 \pm 0,85 \mu\text{M}$ w obecności TNF- α (Ryc. 8A). Jednak w przeciwieństwie do SO, wyciszenie genu *LDHA* za pośrednictwem siRNA w tych samych komórkach skutkowało jedynie nieznacznym zmniejszeniem uwalniania kwasu mlekowego, a obserwowane różnice nie były statystycznie istotne (Ryc. 8B).

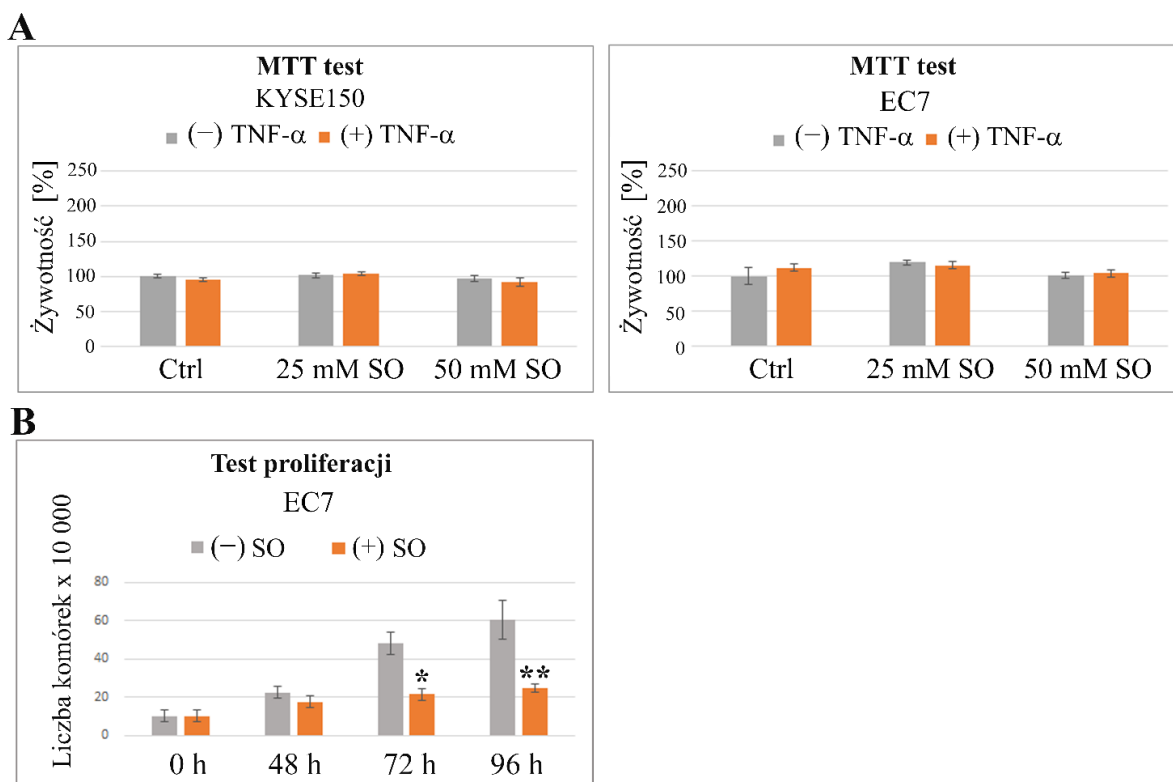
Przeprowadzone testy MTT wykazały, że 48-godzinna ekspozycja komórek raka przełyku na SO nie miała wpływu na ich przeżywalność (Ryc. 9A). Analiza proliferacji wykazała natomiast, że SO w istotny sposób hamuje podział komórkowy (Ryc. 9B). Choć istotne różnice w ilości komórek pomiędzy grupą kontrolną i grupą komórek traktowanych SO obserwowano dopiero po 72 h ($48,1 \pm 6,1 \times 10^4$ vs. $21,45 \pm 2,95 \times 10^4$; $p < 0,001$) i 96 h ($60,6 \pm 10,14 \times 10^4$ vs. $24,6 \pm 1,99 \times 10^4$; $p < 0,005$).



Rycina 8. Wpływ hamowania aktywności LDHA na produkcję kwasu mlekowego (LA). Dane te zostały wykorzystane w publikacji związanej z niniejszą rozprawą (Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 16062). A) SO skutecznie hamował wydzielanie LA w KYSE150 i EC7, a obserwowane różnice w stosunku do kontroli były istotne statystycznie (* $p < 0.005$). B) W efekcie wyciszenia ekspresji genu *LDHA* za pomocą siRNA produkcja LA w KYSE150 i EC7 zmniejszała się nieznacznie i różnice w stosunku do kontroli nie były statystycznie istotne ($P > 0,05$). Ctrl - kontrola, si_LDA - siRNA LDHA, sc – siRNA kontrolne, SO – oksamat sodu, LA - mleczan.

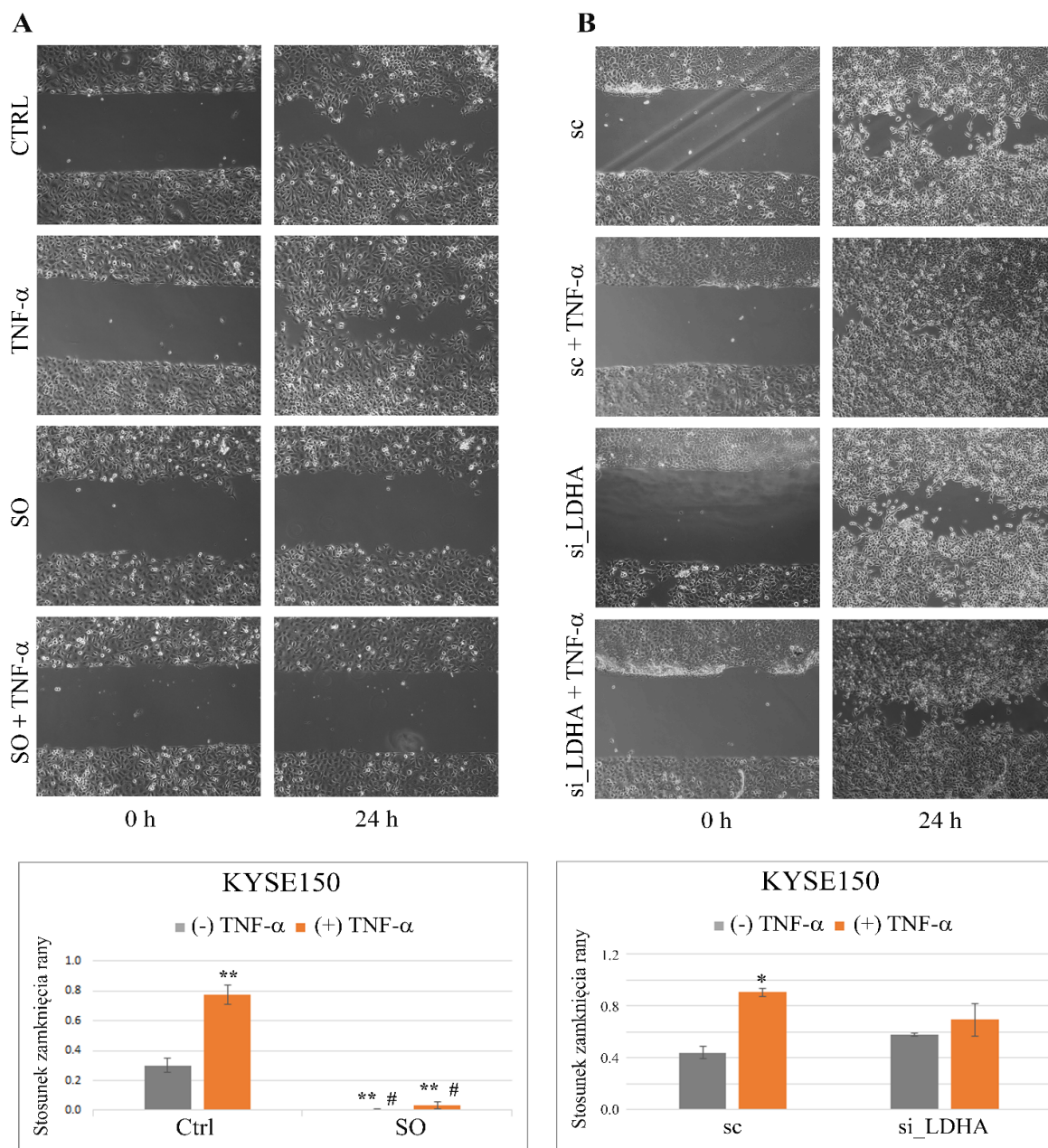
4.6. Hamowanie aktywności LDHA zaburza indukowaną przez TNF- α migrację komórek raka przełyku i sekrecję MMP9

Analizując wpływ SO na migrację komórek indukowaną przez TNF- α , odkryto, że SO skutecznie znosi promigracyjną aktywność TNF- α na komórki KYSE150 (Ryc. 10A). W przypadku komórek kontrolnych stopień zamykania się sztucznej rany wynosił $0,3 \pm 0,05$ po 24 godzinach obserwacji oraz odpowiednio $0,77 \pm 0,06$ po stymulacji TNF- α . W obecności SO stopień pokrycia przestrzeni wolnych od komórek wynosił tylko $0,006 \pm 0,005$. Dla komórek stymulowanych TNF- α w obecności SO stopień zamykania się sztucznej rany wynosił $0,03 \pm 0,02$. To pokazało, że SO istotnie ogranicza promigracyjny efekt TNF- α na komórki raka przełyku.



Rycina 9. Wpływ inhibicji LDHA na żywotność i proliferację komórek raka przelyku. A) Żywotność komórek KYSE150 i EC7 mierzono po 48-godzinnej ekspozycji na SO w stężeniach 25 mM i 50 mM przy użyciu testu MTT. Komórki były dodatkowo traktowane lub nie TNF- α (30 ng/ml/24h). Użycie SO samego, jak i w kombinacji z TNF- α nie spowodowało znaczących zmian w żywotności komórek ($p > 0,05$). B) Analiza ilościowa potencjału proliferacyjnego komórek EC7 traktowanych SO (50 mM) przez 48h, 72h i 96h. Hamujący wpływ na proliferację obserwowano po 72 h (* $p < 0,001$) i 96 h (** $p < 0,005$) ale nie po 24 h ekspozycji na SO ($p > 0,05$). Ctrl - kontrola, SO – oksamat sodu.

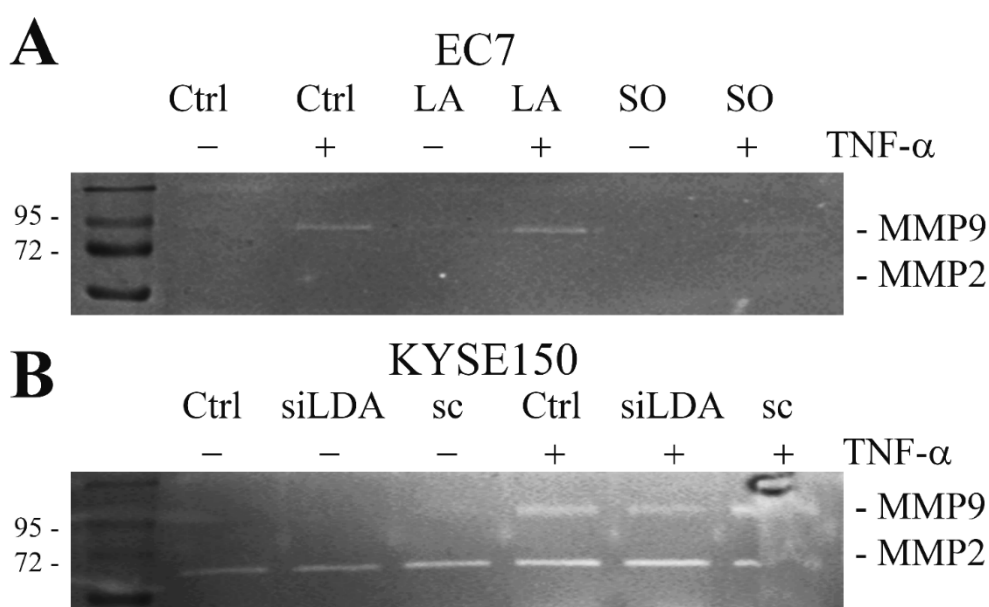
Aby zademonstrować bezpośrednią rolę LDH5 w regulacji zależnego od TNF- α potencjału migracyjnego komórek, przeprowadzono test migracji na komórkach, w których wyciszono ekspresję genu *LDHA* za pośrednictwem siRNA. Chociaż wyciszanie ekspresji *LDHA* w komórkach KYSE150 upośledzało migrację komórek indukowaną przez TNF- α , obserwowane różnice w porównaniu z komórkami kontrolnymi były statystycznie nieistotne. Po 24 godzinach stopień zamykania się sztucznej rany wynosił po traktowaniu TNF- α $0,9 \pm 0,03$ dla komórek kontrolnych i $0,7 \pm 0,12$ dla komórek z wyciszonym genem *LDHA* (Ryc. 10B). Transfekcja nie miała wpływu na potencjał migracyjny komórek. Stopień zarastania przestrzeni wolnych od komórek dla KYSE150 transfekowanych kontrolnym siRNA i siRNA *LDHA* był porównywalny i wynosił odpowiednio $0,44 \pm 0,05$ i $0,58 \pm 0,01$.



Rycina 10. Wpływ hamowania aktywności LDHA na indukowaną TNF- α migrację komórek raka przelyku. **Dane te zostały wykorzystane w publikacji związanej z niniejszą rozprawą (Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 16062).** A) Reprezentatywne obrazy uzyskane w teście gojenia ran (ang. wound healing), pokazujące efekt traktowania komórek KYSE150 SO (50 mM) i TNF- α (30 ng/ml). Analiza ilościowa w postaci wykresu słupkowego, ilustrującego stosunek zamknięcia rany w komórkach traktowanych TNF- α w obecności SO i bez SO (dolny panel). TNF- α znacząco zwiększał migrację komórek KYSE150, natomiast SO istotnie hamował efekt TNF- α (** $p < 0,005$, różnice statystyczne vs. kontroli; # $p < 0,005$, różnice statystyczne vs. komórki poddane działaniu TNF- α). B) Reprezentatywne obrazy uzyskane w teście gojenia ran, pokazujące efekt traktowania TNF- α (30 ng/ml) komórek KYSE150 z wyciszoną ekspresją *LDHA*. Analiza ilościowa w postaci wykresu słupkowego ilustrującego stosunek zamknięcia rany w komórkach kontrolnych (nietransfekowanych lub transfekowanych siRNA kontrolnym) i komórkach z transfekowanych siRNA LDHA i

stymulowanych lub nie TNF- α (dolny panel). TNF- α istotnie zwiększał potencjał migracyjny komórek kontrolnych, transfekowanych siRNA kontrolnym (* $p < 0,05$), ale nie komórek z wyciszoną ekspresją *LDHA* ($p > 0,05$). Ctrl - kontrola, si_LDA - siRNA LDHA, sc – siRNA kontrolne, SO – oksamat sodu.

Komórki nowotworowe traktowane TNF- α zwiększają sekrecję metaloproteinazy 9 (MMP9), białka niezbędnego do indukcji zależnej od TNF- α migracji komórkowej (Zaremba-Czogalla i in., 2018). Przeprowadzona analiza z wykorzystaniem zymografii substratowej wykazała, że komórki raka przełyku, stymulowane TNF- α , wydzielają w obecności SO stosunkowo mniej MMP9 w porównaniu z komórkami, które nie były eksponowane na działania SO (FC=0,47) (Ryc. 11A). Co ciekawe, wzbogacenie medium hodowlanego w mleczan (25 μ M) synergizuje efekt TNF- α na sekrecję MMP9 w tych komórkach (FC=1,38 vs. do nietraktowanej kontroli). Udział LDHA w regulacji indukowanej przez TNF- α sekrecji MMP9 w komórkach nowotworowych został potwierdzony w eksperymentach z użyciem komórek z wyciszoną ekspresją *LDHA*. W tym przypadku również obserwowano znaczne obniżenie sekrecji MMP9 w komórkach transfekowanych siRNA LDHA w porównaniu z komórkami kontrolnymi, zarówno nietransfekowanymi (typu dzikiego) (FC=0,79), jak i transfekowanymi kontrolnym si RNA (siRNA scramble) (FC=0,5) (Ryc. 11B).



Rycina 11. Wpływ hamowania aktywności LDHA oraz wpływ LA na indukowaną przez TNF- α sekrecję i aktywację MMP9 w komórkach raka przełyku. A) LA potęguje efekt TNF- α na sekrecję i aktywację MMP9 w komórkach KYSE150 (FC=1,38) w porównaniu z kontrolą,

natomiast SO znacząco ten efekt hamuje ($FC=0,47$), co wykazano za pomocą zymografii żelatynowej. B) Wyciszenie ekspresji *LDHA* w KYSE150 za pomocą siRNA znacząco obniżyło sekrecję MMP9 indukowaną przez TNF- α w porównaniu z komórkami kontrolnymi, zarówno nietransfekowanymi, jak i transfekowanymi kontrolnym siRNA (odpowiednio $FC=0,79$ i $FC=0,5$). FC - krotność zmiany, obliczona na podstawie densytometrii różnicowej sygnałów z zymogramów, Ctrl – kontrola, si_LDA - siRNA LDHA, sc - siRNA kontrolne, SO - oksamat sodu, LA - mleczan.

5. Dyskusja

Rak przełyku, plasujący się na ósmym miejscu co do częstości występowania na świecie, jest jednym z najbardziej agresywnych nowotworów złośliwych o niskiej przeżywalności, nawet przy zastosowaniu nowoczesnych metod terapii (Domper i in., 2015). W patogenezie tego nowotworu bierze udział wiele czynników, a jednym z nich jest stan zapalny. Wyniki badań wskazują jednoznacznie, że osoby z przewlekłym stanem zapalnym mają zwiększone ryzyko zachorowania na raka (Francuz i in., 2016). Większość guzów nowotworowych cechuje obecność mikrośrodowiska zapalnego, bogatego w komórki odpowiedzi immunologicznej, takie jak monocyty i makrofagi, odpowiedzialne za produkcję cytokin prozapalnych, w tym TNF- α , które poprzez stymulację onkogenów i/lub supresję nowotworowych genów supresorowych sprzyjają wzrostowi guza i, co równie ważne, odpowiadają za oporność na terapię (Chela i in., 2022). Istnieją doniesienia, wskazujące na istotny wzrost ekspresji TNF- α w niektórych typach nowotworów (Mikami i in., 2015; Ma i in., 2017; Al Obeed i in., 2014; Grimm i in., 2011). W rakach jelita grubego (CRC) wysoka ekspresja TNF- α silnie korelowała z nawrotami nowotworu i przerzutami do węzłów chłonnych (Al Obeed i in., 2014; Grimm i in., 2011). W tej pracy, wykorzystano internetową bazę TNMplot, która jest bogatym zbiorem danych, pochodzących z analiz sekwencjonowania RNA (RNA-Seq), prezentujących poziom ekspresji genów w różnego typu tkankach nowotworowych i przerzutowych oraz odpowiadających im tkankach prawidłowych (Bartha i Györffy, 2021). Wynika z nich, że w pierwotnych rakach przełyku ekspresja TNF- α nie zmienia się istotnie w porównaniu z tkankami prawidłowymi, inaczej niż w tkankach przerzutowych, w których obserwowano znaczny wzrost poziomu TNF- α . Niemniej, w tej analizie uwagę zwraca bardzo duży rozrzut, charakteryzujący wyniki uzyskane dla pierwotnych tkanek nowotworowych, co może świadczyć o znacznym zróżnicowaniu osobniczym, sugerującym potrzebę indywidualnego podejścia do każdego pacjenta z rakiem przełyku.

Uważa się, że procesy zapalne towarzyszące nowotworom mają nie tylko bezpośredni wpływ na zjawisko hiperprolifracji, ale też mogą synergizować z uszkodzeniami DNA, doprowadzając do utrwalenia mutacji (Kiraly i in., 2015). Wiadomo, że wzmożona proliferacja komórkowa związana jest ze zwiększonymi wymaganiami energetycznymi oraz dostępnością substratów do syntezy białek, lipidów i kwasów nukleinowych. To skutkuje potrzebą dostosowania metabolizmu komórek nowotworowych do tempa wzrostu guza (Phan i in., 2014; Schiliro i in., 2022). Przeprogramowanie metaboliczne od ponad dekady uznaje się za jedną z głównych cech charakterystycznych raka (Hay, 2016). W procesie tym, LDHA jest kluczowym graczem, odpowiedzialnym za produkcję ATP i regenerację utlenionego NAD^+ w przemianach bazujących na glikolizie, ukierunkowanej na produkcję mleczanu, nawet w warunkach prawidłowego stężenia tlenu (Liberti i in., 2015). Istnieje wiele badań, które potwierdzają, że ekspresja LDHA znacznie zwiększa się w nowotworach takich jak rak jelita grubego, rak piersi, rak trzustki i płaskonabłonkowy rak jamy ustnej, oraz że jej poziom jest ściśle skorelowany z progresją choroby nowotworowej (Rong i in., 2013; Dong i in., 2017; Cai i in., 2019; Wang i in., 2021).

W tej pracy, analizując dane z bazy TNMplot pokazano, że w rakach przełyku ekspresja genu *LDHA* jest istotnie większa w porównaniu z normalnymi tkankami kontrolnymi. Wyniki te są zgodne z tymi, uzyskanymi z analizy LDHA na poziomie białka metodą IHC, w materiale własnym. Zastosowanie metody IHC nie tylko pokazało istotne różnice w poziomie LDHA pomiędzy tkanką guza i prawidłowym nabłonkiem przełyku, ale dodatkowo pozwoliło zidentyfikować obecność ‘wysepek’, w postaci niewielkich skupisk komórek nowotworowych, w obrębie intensywnie wybarwionej tkanki nowotworowej, które znacznie odbiegają intensywnością zabarwienia od pozostałych. Ta mozaikowatość może sugerować, że poziom ekspresji LDHA w tkance nowotworowej zależy od stopnia zróżnicowania komórek nowotworowych i związaną z tym dominacją typu metabolizmu, opartym na glikolizie lub OXPHOS. Potwierdzeniem tej hipotezy mogą być badania Hernández-Quintero M. i in., w których obserwowano, że w czasie kiedy królicze komórki rogówki różnicowały do formowania cztero- lub pięciowarstwowego nabłonka, aktywność LDH wzrastała 60-krotnie (Hernández-Quintero i in., 2002). Inni autorzy pokazali, że w efekcie chemicznej indukcji zróżnicowania komórek białaczkowych HL60 i K562 w kierunku morfologicznie bardziej prawidłowych, następowało przesunięcie w procentowym udziale poszczególnych izoenzymów i zmiany te korelowały ze stopniem zróżnicowania (Pantazis i in., 1981).

Jak pokazano w tej pracy, w rakach przełyku zwiększa się nie tylko poziom ekspresji podjednostki A ale również podjednostki B. Analizując efekt $\text{TNF-}\alpha$ na zmiany w aktywności

LDH stwierdzono, że komórki KYSE150, które były stymulowane TNF- α odpowiadały zwiększoną ekspresją obu genów *LDHA* i *LDHB* (Forkasiewicz i in., 2022). Wydaje się więc, że w progresji raka przełyku rola podjednostki B może być równie ważna co podjednostki A, szczególnie w kontekście przerzutowania. Zgodnie z uzyskanymi danymi, w tkankach przerzutowych pacjentów z rakiem przełyku, poziom ekspresji genu *LDHB* jest istotnie większy niż w tkankach prawidłowych. Inaczej jest w przypadku genu *LDHA*, którego ekspresja w tkankach przerzutowych zmniejsza się istotnie w porównaniu z tkankami prawidłowymi, co sugeruje, że komórki nowotworowe w tkankach przerzutowych bazują raczej na metabolizmie OXPHOS niż na glikolizie. Warto przy tej okazji wspomnieć, że w komórkach EC7, które prezentują cechy macierzystych komórek nowotworowych, obserwowano bardzo niski poziom ekspresji genu *LDHB* w porównaniu z poziomem ekspresji genu *LDHA* i jedyną aktywną izoformą LDH obserwowaną w tych komórkach była izoforma LD5, zbudowana z samych podjednostek A. Natomiast komórki KYSE150, które nie mają cech komórek macierzystych, ekspresjonują geny *LDHA* i *LDHB* na zbliżonym poziomie. W tych komórkach obecne są też wszystkie izoformy LDH, LD1-LD5, co pokazano zarówno w tej pracy, jak i w materiałach wcześniej opublikowanych (Forkasiewicz i in., 2022). Może więc to być kolejny dowód na plastyczność metabolizmu w dostosowywaniu komórek nowotworowych do zmieniających się warunków, związanych z progresją choroby.

Wiadomo, że w komórkach nowotworowych LDHB pełni ważną rolę w regulacji aktywności lizosomalnej i autofagii (Brisson i in., 2016). Dzięki LDHB, komórki nowotworowe o fenotypie oksydacyjnym mają możliwość wykorzystywania mleczanu do przemian metabolicznych (Mishra i in., 2019). Interesujące, że w wielu nowotworach, w tym rakach prostaty, żołądka, trzustki, czy pęcherza moczowego, obserwuje się hipermetylację promotora genu *LDHB*, co wiąże się z zahamowaniem ekspresji genu *LDHB* i konsekwentnie brakiem białkowej formy podjednostki B (Leiblich i in., 2006; Maekawa i in., 2003; Cui i in., 2015; Liao i in., 2011). Z drugiej strony, podwyższona ekspresja genu *LDHB* u chorych ze zdiagnozowanym gruczolakorakiem płuc i potrójnie negatywnym rakiem piersi (TNBC), okazała się istotnym czynnikiem predykcyjnym krótszego przeżycia takich pacjentów (McClelland i in., 2013; McClelland i in., 2012). Ponieważ do tej pory nie przeprowadzono żadnych badań, kwestią otwartą pozostaje rola LDHB w raku przełyku co może być przedmiotem kolejnych prac.

Raki przełyku, niezależnie od tego, czy są to raki płaskonabłonkowe, czy gruczolowe, charakteryzują się dużą agresywnością i szybkim przerzutowaniem. Zarówno procesy inwazji, jak i przerzutowania do tkanek odległych ściśle wiążą się ze wzrostem potencjału migracyjnego

komórek nowotworowych (Yamaguchi i in., 2005). TNF- α jest dobrze znaną cytokiną plejotropową, która może wywoływać przeciwstawne efekty w komórkach docelowych (Kokolakis i in., 2021). Uwalniana jest głównie przez komórki związane z towarzyszącymi nowotworzeniu procesami zapalnymi, takimi jak makrofagi, limfocyty T i komórki NK, ale także przez same komórki nowotworowe. TNF- α jest jednym z powszechnych i ważnych składników mikrośrodowiska guza, o którym wiadomo, że sprzyja inwazji komórek nowotworowych (Zaremba-Czogalla i in., 2018; Balkwill, 2006; Candidio i in., 2012). Myszy z niedoborem TNF- α okazały się być mniej podatne na formowanie chemicznie indukowanych nowotworów skóry oraz przerzutowanie ksenograftów (Karin i Greten, 2005). Vaughan i in. wykazali, że w przypadku komórek raka piersi TNF- α może działać jako bezpośredni induktor efektu Warburga stymulując ekspresję transportera glukozy 1 (GLUT1) i tym samym powodując zwiększenie wychwyty glukozy przez komórki nowotworowe (Vaughan i in., 2013). Jednak, jak pokazano w materiałach wcześniej opublikowanych, komórki raka przełyku i to zarówno EC7, jak i KYSE150, chociaż zwiększały ekspresję LDHA w efekcie traktowania TNF- α , to wzrost ten nie przekładał się na istotne zmiany w aktywności enzymu i obraz izoenzymatyczny LDH, analizowanych za pomocą zymografii. Niemniej, uzyskane wyniki stanowiły potwierdzenie pronowotworowego działania TNF- α na komórki raka przełyku (Forkasiewicz i in., 2022).

Działanie TNF- α odbywa się za pośrednictwem dwóch różnych receptorów błonowych: TNF- α receptor I (TNFR1; p55 lub p60) i TNF- α receptor II (TNFR2; p75 lub p80) (Aggarwal, 2003). TNFR1 jest białkiem ekspresjonowanym konstytutywnie w większości typów komórek, natomiast ekspresja TNFR2 jest silnie regulowana (Varfolomeev i in., 2004). Chociaż ścieżka transdukcji sygnału TNF- α jest skomplikowana i nie do końca jeszcze poznana wiadomo, że pronowotworowe działanie TNF- α zależy przede wszystkim od jego zdolności do aktywacji NF- κ B, podczas gdy działanie antynowotworowe związane jest z aktywacją szlaku kaspaz. Apoptoza zależna od TNF- α jest indukowana w efekcie formowania się cytoplazmatycznego kompleksu TRADD, zawierającego FADD (FAS-associated death domain) i prokaspazę 8, co prowadzi do aktywacji zrekrutowanej kaspazy 8 i zapoczątkowania apoptotycznej kaskady sygnałowej (Warzocha i in., 1998; Varfolomeev i in., 2004). Jeżeli w odpowiedzi na aktywację receptora rekrutowane jest białko TRAF2, wówczas dochodzi do aktywacji ścieżki sygnałowej zależnej od NF- κ B, poprzez białko oddziałujące z receptorem 1 (RIP1). Białko adaptorowe RIP1 jest ubikwitynowane w sposób zależny od TRAF2 podczas aktywacji receptora i jest niezbędne do indukowanej przez TNF- α aktywacji IKK i NF- κ B (Varfolomeev i in., 2004). Przy tych wszystkich powiązaniach nadal nie jest jednak jasne co decyduje o tym, jak

ostatecznie dana komórka odpowiada na układ ligand-receptor TNF- α . Jeden z proponowanych modeli zakłada, że decyzyjną rolę może pełnić stosunek obu receptorów TNF- α na powierzchni komórki (Warzocha i in., 1998). Jest on interesujący w kontekście wyników uzyskanych z przeprowadzonej w tej pracy analizy poziomu ekspresji TNFR1 i TNFR2 w rakach przełyku. Pokazują one istotny wzrost w poziomie ekspresji TNFR2 w tkankach przerzutowych raka przełyku w porównaniu z tkankami prawidłowymi ale też i z tkankami guzów pierwotnych, przy jednoczesnym braku zmian w ekspresji TNFR1. Jest to z pewnością temat, który w przyszłości warto zgłębić.

Z drugiej strony wiadomo, że traktowanie komórek TNF- α , w których z jakichś powodów synteza nowych białek została zahamowana lub nastąpiła blokada aktywacji NF- κ B, prowadzi do ich śmierci (Larrick and Wright, 1990; Muppidi i in., 2004; Varfolomeev in., 2004). Fakt ten zrodził hipotezę, że ograniczenie efektu przeprogramowania metabolicznego, które zapewnia komórkom nowotworowym odpowiedni poziom energii i dostęp metabolitów niezbędnych do szybkiego wzrostu, może skutkować przekierowaniem odpowiedzi komórkowej na TNF- α ze ścieżki promującej przeżycie na ścieżkę proapoptotyczną (Muppidi i in., 2004).

Wykorzystanie oksamatu sodu (SO), który jest analogiem pirogronianu, specyficznie hamującym aktywność LDHA, okazało się być skutecznym środkiem w zakłócaniu szlaku glikolizy, powodującym istotny spadek produkcji mleczanu w traktowanych komórkach raka przełyku. Jednak wbrew oczekiwaniom, zaburzenie aktywności LDHA nie skutkowało uwrażliwieniem komórek na proapoptotyczne działanie TNF- α , co obserwowano zarówno w badaniach z użyciem cytometrii przepływowej, jak i immunochemicznych analizach zmian w aktywacji białkowych markerów apoptozy. Wyniki te potwierdziły badania, w których za pomocą siRNA wyciszano ekspresję genu *LDHA*. Traktowanie TNF- α komórek raka przełyku z indukowanym zaburzeniem metabolizmu glukozy nie prowadziło do aktywacji kaspazy 8 i tym samym nie indukowało apoptozy. Nie indukowało również w tych komórkach senescencji, co wykazał test bazujący na analizie aktywności β -galaktozydazy. Jednak, pomimo że SO nie miał wpływu na odblokowanie ścieżki apoptotycznej zależnej od TNF- α , to istotnie ograniczał migrację oraz proliferację komórek. SO całkowicie hamował efekt promigracyjny TNF- α , który jak wiadomo jest ściśle zależny od MMP9 (Zaremba-Czogalla i in., 2018; Wolczyk i in., 2016). W tej pracy pokazano, że SO hamował też indukowaną TNF- α sekrecję MMP9. Wiadomo, że główną rolę w ekspresji MMP9 indukowanej przez TNF- α odgrywa aktywacja ścieżek sygnałowych związanych z NF- κ B oraz Erk1/2 (p42/p44 MAPK) (Lin i in., 2008; Augoff i in., 2022). Okazało się, że traktowanie komórek SO znacząco zaburzało poziom fosforylacji Erk1/2

ale nie miało wpływu na indukowaną przez TNF- α aktywację NF- κ B, co pokazano w materiałach wcześniej opublikowanych (Forkasiewicz i in., 2022).

Podobny efekt jak w przypadku użycia SO obserwowano w komórkach z wyciszoną ekspresją genu *LDHA*, chociaż w tym przypadku był on znacznie słabszy i to zarówno biorąc pod uwagę migrację, jak i sekrecję MMP9. Jednym z powodów takich różnic może być ograniczona skuteczność zastosowanej metody wyciszania ekspresji z użyciem siRNA. Szczególnie dotyczy to komórek EC7, które, mając cechy nowotworowych komórek macierzystych, okazały się wyjątkowo trudne do transfekcji. Z drugiej strony wiadomo, że SO hamuje nie tylko aktywność LDHA, ale również karboksylację pirogronianu, czy aktywność aminotransferazy asparaginianowej (AAT). Tak więc zakres jego wpływu na metabolizm glukozy jest szerszy i nie ogranicza się wyłącznie do blokowania konwersji pirogronianu do mleczanu, co nie jest bez znaczenia dla obserwowanego efektu (Thornburg i in., 2008; Zeczycki i in., 2010).

SO przede wszystkim istotnie ograniczał wydzielanie kwasu mlekowego (LA) i to zarówno przez komórki KYSE150, jak i EC7. Dane literaturowe pokazują, że komórki nowotworowe mogą wytwarzać do dziesięciu razy więcej kwasu mlekowego niż komórki normalne, a zwiększone stężenie mleczanu w tkankach nowotworowych pozytywnie koreluje z ryzykiem rozwoju guzów przerzutowych w odległych tkankach (Schwickert i in., 1995; Walenta i in., 2000). Wiadomo też, że LA wpływa na regulację szeregu aktywności komórkowych, działając jako alternatywne źródło energii lub cząsteczka sygnałowa, czy też czynnik immunosupresyjny (Stagg i in., 1968; Cai i in., 2008; Fu i in., 2017; Harmon i in., 2020; Hayes i in., 2021). Obniżając pH pozakomórkowe, LA stymuluje produkcję i sekrecję kwasu hialuronowego przez fibroblasty związane z rakiem i tym samym uczestniczy w reorganizacji macierzy pozakomórkowej (Stern i in., 2002). Mleczan okazał się również czynnikiem stymulującym produkcję proangiogennej cząsteczki VEGF (Qiao i in., 2021). W tej pracy pokazano, że mleczan może również potęgować efekt TNF- α wpływając na sekrecję i aktywację metaloproteinazy MMP9. Ta jedna z najlepiej zbadanych endopeptydaz wydzielniczych, posiadająca zdolność proteolizy szerokiej gamy białek strukturalnych, ale też sygnałowych, receptorowych, czy proteolitycznych, została zakwalifikowana jako kluczowy mediator procesów charakterystycznych dla nowotworów, takich jak reorganizacja macierzy zewnątrzkomórkowej, przejście EMT, migracja/inwazja komórkowa, neoangiogeneza i odpowiedź immunologiczna (Augoff i in., 2022). Zwiększona sekrecja MMP9 w większości nowotworów pozwoliła na wykorzystanie oznaczania jej poziomów do prognozowania lub jako marker formowania przerzutów (Jinga i in., 2006; Wu i in., 2008). W przypadku raków

przełyku, jak pokazano w tej pracy, obserwuje się drastyczny wzrost w ekspresji MMP9 i to zarówno w guzach pierwotnych, jak i w tkankach przerzutowych. Wyniki te są zgodne z doniesieniami innych autorów i sugerują, że MMP9 pełni ważną rolę w patogenezie i progresji raka przełyku (Samantaray i in., 2004). W tym kontekście interesujący wydaje się więc efekt użycia inhibitora LDHA na hamowanie sekrecji MMP9.

Oksamat sodu (SO) nie jest lekiem zatwierdzonym przez Food and Drug Administration (FDA). Jak do tej pory był stosowany jedynie w badaniach przedklinicznych. Choć sam SO nie jest brany pod uwagę jako skuteczny lek przeciwnowotworowy, to jednak w połączeniu z klinicznie stosowanymi chemioterapeutykami może mieć działanie synergizujące (Draguet i in., 2021; Miskimins i in., 2014; Qiao i in., 2021). Jest on o tyle interesujący, że jako jeden z niewielu potencjalnych chemioterapeutyków, jest związkiem o niskiej toksyczności, a zatem względnie bezpiecznym. W ten obszar wiedzy świetnie wpisują się wyniki tej pracy, które wspierają zasadność użycia inhibitorów LDHA w walce z progresją złośliwych nowotworów przełyku.

6. Wnioski

W tej pracy pokazano, że hamowanie aktywności LDHA w komórkach raka przełyku nie odblokowuje ścieżki apoptotycznej związanej z TNF- α , a więc nie generuje zmiany odpowiedzi komórkowej na TNF- α z pronowotworowej na antynowotworową.

Udowodniono jednak, że użycie specyficznego inhibitora LDHA znosi promigracyjny efekt TNF- α na komórki raka przełyku oraz hamuje indukowaną przez TNF- α sekrecję MMP9, co wiąże się z osłabieniem aktywacji ścieżki sygnałowej związanej z Erk1/2. Potwierdzono tym samym bezpośrednią zależność pomiędzy statusem metabolicznym glukozy i skutecznością odpowiedzi komórek nowotworowych na pronowotworowe działanie TNF- α , jednej z głównych cytokin prozapalnych, związanych z kancerogenezą i progresją nowotworową.

Udowodniono ponadto skuteczność SO w hamowaniu sekrecji mleczanu oraz jego antyproliferacyjne działanie na komórki raka przełyku. Uzyskane w tej pracy wyniki dają podstawę do rozważenia zastosowania inhibitora LDHA w projektowaniu terapii uzupełniającej u pacjentów z rakiem przełyku.

7. Materiały i metody

Badania z użyciem materiału ludzkiego zostały przeprowadzone zgodnie z wytycznymi Deklaracji Helsińskiej i były objęte zgodą Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu (KB nr: 156/2018). Materiał w postaci zatopionych w parafinie wycinków tkankowych, pobranych podczas resekcji przełyku w celach diagnostycznych, pochodził ze zbiorów archiwalnych Kliniki Chirurgii Przewodu Pokarmowego i Chirurgii Ogólnej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Wszyscy pacjenci wyrazili świadomą zgodę na pobranie tkanek do badań.

7.1. Analiza ekspresji wybranych genów w raku przełyku

Dane dotyczące ekspresji genów *LDHA*, *LDHB*, *TNFA/TNFS2*, *TNFRSF1A*, *TNFRSF1B* i *MMP9* w prawidłowym nabłonku przełyku (n = 88), w tkankach raka przełyku (n=440) oraz w tkankach przerzutowych (n=28), wyrażone przez log₂FC, pozyskano z internetowej bazy (dane pobrane 23.02.2023) TNMplot: differential gene expression analysis in Tumor, Normal and Metastatic tissues (www.tnmplot.com), stanowiącej ogólnodostępne źródło danych, które zostały wygenerowane przez Gene Expression Omnibus of the National Center for Biotechnology Information (NCBI-GEO), Cancer Genome Atlas (TCGA), Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatments (TARGET) i Genotype-Tissue Expression (GTEx) repozytoria (Bartha i Gyórfy, 2021). Analiza porównawcza została przeprowadzona za pomocą nieparametrycznego testu Manna-Whitneya oraz testu Dunna. Istotność zdefiniowano jako $p < 0,05$.

7.2. Linie komórkowe i warunki prowadzenia hodowli komórek *in vitro*

W pracy wykorzystano dwie linie komórkowe, KYSE150 i EC7, reprezentujące odpowiednio płaskonabłonkowego raka przełyku oraz gruczolakoraka przełyku. Ludzka linia komórkowa płaskonabłonkowego raka przełyku, KYSE150, została zakupiona w Merck Leibniz-Institute DSMZ (ACC - nr 375). Linia komórkowa EC7 została wyprowadzona w naszym laboratorium z tkanki nowotworowej przełyku, pobranej w trakcie protezowania przełyku w Zakładzie Endoskopii Zabiegowej Katedry i Kliniki Chirurgii Ogólnej, Małoinwazyjnej i Endokrynologicznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, od 68-letniego mężczyzny rasy kaukaskiej z wznową raka gruczolowego przełyku. Pacjent był

wcześniej leczony terapią systemową i radioterapią i zmarł dwadzieścia osiem miesięcy po pierwszej diagnozie, z powodu zaawansowanej choroby nowotworowej.

Fragment tkanki dostarczono do laboratorium w medium hodowlanym MEM (Minimum Essential Medium) w ciągu 2 godzin od pobrania, przeniesiono na 3 cm szalkę i rozdrobniono skalpelem na mniejsze kawałki (o wielkości maksymalnie 1 mm³). Całą zawartość przeniesiono do 15 ml probówki i wirowano przy 900 x g przez 5 minut. Osad przemyto dwukrotnie 2,5 ml pożywki RPMI-1640/F12 (Ham's F12 Nutrient Mixture) (1:1), zawierającej 2 mM L-glutaminę, 20% FBS (Fetal Bovine Serum), antybiotyki (200 U/ml penicyliny, 10 µg/ml gentamycyny) i amfoterycynę B w wysokim stężeniu (10 µg/ml). Następnie umieszczono go na 3 cm szalce do hodowli komórkowej i zawieszono w medium hodowlanym RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640)/F-12 (1:1), zawierającym 2 mM L-glutaminę i 20% FBS, 200 U/ml penicyliny, 10 µg/ml gentamycyny i 2,5 µg/ml amfoterycyny B. Hodowlę utrzymywano w temperaturze 37°C przy stałej wilgotności (95%) oraz 5% stężeniu CO₂ w atmosferze do czasu, aż adherentne komórki przyczepiły się do powierzchni płytki i zaczęły tworzyć kolonie. Wtedy usunięto pozostałości struktur tkankowych i gdy komórki osiągnęły 80-90% konfluencji, rozpoczęto pasażowanie. W celu eliminacji z hodowli komórek stromalnych stosowano trypsynizację różnicową. Po adaptacji do warunków hodowli, komórki utrzymywano w RPMI-1640/F-12 (1:1) z 2 mM L-glutaminą i 10% FBS, bez antybiotyków. Po czterech tygodniach dziewięć kolonii komórek nabłonkowych oddzielono od hodowli za pomocą szklanych cylindrów (CLS31666-125EA, MERCK) i utrzymywano w ciągłej hodowli aż do 45. pasażu, kiedy upewniono się, że są wolne od komórek morfologicznie podobnych do fibroblastów. Jeden z klonów (C7), po określeniu profilu genetycznego za pomocą analizy STR (ang. Short Tandem Repeat) przez ATCC Cell Line Authentication Service, wykorzystano do dalszych eksperymentów. Procedura wyprowadzania linii komórkowej EC7 została szczegółowo opisana w materiałach wcześniej opublikowanych (Forkasiewicz i in., 2022).

Do celów eksperymentalnych komórki były traktowane ludzkim rekombinowanym TNF-α (CYT-223, Prospect), w stężeniu 30 ng/ml, przez 24h (chyba, że wskazano inaczej). Przed każdym eksperymentem z użyciem TNF-α komórki były głodzone przez noc, w medium pozbawionym FBS. W eksperymentach, w których używano oksamatu sodu (SO) (Santa Cruz, sc-215880) lub mleczanu sodu (LA) (Fluka, 71723), medium, które było używane do głodzenia komórek oraz do stymulacji cytokiną TNF-α, dodatkowo wzbogacano odpowiednio oksamatem w stężeniu 25 i 50 mM, lub mleczanem w stężeniu 2,5 i 5 mM.

7.3. Test żywotności komórek (MTT) i proliferacji

Wpływ TNF- α i oksamatu sodu (OS) na żywotność komórek analizowano metodą MTT, używając testu ilościowego Trevigen's TACS MTT Cell Proliferation Assay (R&D Systems, 4890-050-K), opartego na spektrofotometrycznym oznaczeniu ($\lambda=562$ nm) ilość formazanu, wygenerowanego przez metabolicznie aktywne komórki, w reakcji redukcji bromku 3-[4,5-dimetylotiazol-2yl]-2,5-difenylo-tetrazolowego (MTT).

Do pomiaru proliferacji komórki zostały wysiane na 6-cio dołkową płytkę w ilości 100 000 komórek/dołek i pozostawione na 12h do całkowitego rozpląszczenia. Po tym czasie medium zostało zmienione na świeże z dodatkiem lub bez SO. Komórki zbierano po 48h, 72h i 96h przez trypsynizację i liczone. Wynik podano jako ilość komórek zebranych z każdego dołka w trzech powtórzeniach.

7.4. Przygotowanie lizatów komórkowych

Do analizy poziomu białek metodą Western blotting oraz do analizy składu izoenzymatycznego LDH metodą zymografii żelowej komórki były lizowane w buforze do lizy (25 mM bufor NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 7,4 z 0,3 M NaCl i 1% triton X-100), uzupełnionym koktajlem inhibitorów proteaz i fosfataz (Cell Signaling, 5872). Lizaty komórkowe wirowano przy 16 000 x g przez 15 minut w temperaturze 4°C. Stężenie białka w wyklarowanych lizatach (ekstraktach białkowych) mierzono za pomocą Precision Red Advanced Protein Assay Reagent (Cytoskeleton, ADV02-A). Próby do zymografii LDH przygotowywano poprzez zmieszanie ekstraktów białkowych 1:1 z buforem obciążającym (60% sacharozy w buforze HEPES pH 8,0). Próby do elektroforezy w warunkach denaturujących i Western blottingu przygotowywano poprzez zmieszanie ekstraktów białkowych z buforem Laemmli (Bio-Rad, 1610747) i redukcję w 95°C przez 10 minut. Próby do zymografii LDH i Western blottingu przechowywano w 20°C do momentu użycia.

7.5. Zymografia

Do analizy aktywności metaloproteinazy MMP9, uwalnianej przez komórki, kondycjonowane media (CM) zbierano z nad komórek i wirowano przy 2 500 x g. Wyklarowane media zawieszano w dwukrotnie stężonym buforze do próbek (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, z 10% glicerolem, 2% SDS, 0,05% błękitem bromofenolowym) i bezpośrednio nanoszono na żel.

Rozdział elektroforetyczny białek w próbkach CM prowadzono w 10% żelu poliakrylamidowym z wpolimeryzowaną żelatyną (2 mg/ml). Żele po elektroforezie przemywano dwukrotnie 50 mM buforem Tris-HCl (pH 7,5) z 2,5% Tritonem X-100 i inkubowano przez noc w 37°C w 50 mM buforze Tris-HCl (pH 7,5) zawierającym 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 1 μM ZnCl₂ i 0,05% Brij-35. Żele, po nocnej inkubacji, barwiono roztworem 0,125% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 w 62,5% (v/v) metanolu i 25% (v/v) kwasie octowym i odbarwiono w roztworze 10% kwasu octowego i 50% metanolu. Aktywność żelatynolityczną wizualizowano jako bezbarwne prążki na ciemnoniebieskim tle. Żele były fotografowane przy użyciu detektora Azure 280. Obrazy cyfrowe żeli analizowano densytometrycznie za pomocą oprogramowania ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

Do analizy składu izoenzymów LDH, białka rozdzielano elektroforetycznie w 7,5% natywnym żelu poliakrylamidowym. Aby uwidocznic prążki izoenzymów LDH, żele umieszczono w roztworze barwiącym, zawierającym 0,5 mg/ml NAD⁺, 2,5 mg/ml nitrobluetrazolium (NBT), 2 mg/ml fenazyometosiarczanu (PMS), 0,01 M mleczanu sodu i 0,03 mg/ml MgSO₄ x 6H₂O w 0,05 M buforze Tris-HCl (pH 7,5) i pozostawiano do wybarwienia na 3-5 minut w ciemności, w temperaturze pokojowej. Zdjęcia żeli były wykonywane przy użyciu detektora Azure 280. Obrazy cyfrowe żeli analizowano densytometrycznie za pomocą oprogramowania ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Udział podjednostki A w całkowitej aktywności LDH obliczono zgodnie ze sposobem opisanym przez Stagg i in. stosując wzór: $A = [(LDH5) + 0,75 (LDH4) + 0,50 (LDH3) + 0,25 (LDH2) / \Sigma(LDH1-5)] \times 100$ (Stagg i in., 1968).

7.6. SDS-PAGE i Western blotting

Do analizy przy użyciu metody Western blotting, białka rozdzielano elektroforetycznie w 10% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) i przenoszono na 0,2 μm membranę nitrocelulozową (Bio-Rad, 1620112) za pomocą systemu do transferu półsuchego (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, Bio-Rad). Membrany blokowano w 5% odtłuszczonym mleku w PBS, a następnie inkubowano przez noc w 4°C z odpowiednimi pierwszorzędownymi przeciwciałami, rozcieńczonymi w PBS. Królicze anty-β-aktyna (4970), królicze anty-PARP1 (9542), mysie anty-Caspase 3 i anty-Caspase 8 zostały zakupione w Cell Signaling. Mysie przeciwciała anty-LDHA (sc-137243) zakupiono w Santa Cruz. Przeciwciała królicze anty-LDHB (14824-1-AP) zostały zakupione w Proteintech group. Po nocnej inkubacji membrany trzykrotnie płukano w 0,1% Tween-20 w PBS (PBS-T), a następnie inkubowano

przez godzinę w temperaturze pokojowej z odpowiednimi przeciwciałami drugorzędowymi, skoniugowanymi z peroksydazą chrzanową (HRP). Przeciwciała drugorzędowe królicze antymysie IgG (115-035-003) zakupiono w firmie Jackson, a kozie anty-królicze IgG (7074) w Cell Signaling. Bloty wizualizowano za pomocą chemiluminescencji w 100 mM buforze Tris pH 8,5 z kwasem p-kumarowym (Sigma, 9008), luminolem (Sigma, A891) i H₂O₂, przy użyciu detektora Azure 280. Po przemyciu łagodnym buforem do strippingu (0,2 M glicyna pH 2,2, 10% Tween 20, 1% SDS) membrany były ponownie użyte do analizy z innymi przeciwciałami. Obrazy cyfrowe żeli analizowano densytometrycznie za pomocą oprogramowania ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

7.7. Pomiar stężenia mleczanu

Stężenie uwalnianego przez komórki mleczanu było zmierzone spektrofotometrycznie przy $\lambda=580$ nm w 100 μ l mieszaniny reakcyjnej, zawierającej 5 μ l kondycjonowanego medium (CM) w 0,2 M buforze Tris-HCl (pH 8,2) z 1,3 mM β -NAD⁺, 0,66 mM chlorkiem błękitu nitrotetrazolowego (NBT), 0,28 mM metosiarczanem fenazy (PMS) i 2 μ l dehydrogenazy mleczanowej (LDH) (Sigma-Aldrich, SAE0049-10KU), w 96-dołkowej płytce przy pomocy czytnika mikropłytek BioTek FLx800. Krzywą kalibracyjną sporządzono z wykorzystaniem 50% wodnego roztworu DL-mleczanu sodu jako wzorca, w stężeniach mierzonych w zakresie 5-25 μ M.

7.8. Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (qPCR)

Całkowite RNA izolowano z komórek KYSE150 i EC7 przy użyciu zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen, 74104) zgodnie z instrukcją producenta. Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono z wykorzystaniem 1 μ g całkowitego RNA, przy użyciu SuperScript IV VILO Master Mix z ezDNase Enzyme (Invitrogen, 11766050). Reakcję PCR przeprowadzono z użyciem SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad, 172-5200). Warunki cykli były następujące: początkowa denaturacja w 94°C przez 30 s, 30 cykli po 30 s w 94°C i 30 s w 60°C oraz końcowe wydłużanie w 68°C przez 5 min. Każdą próbkę analizowano w trzech powtórzeniach. Wydajność amplifikacji oceniono dla wszystkich par starterów użytych w reakcjach i zastosowano startery o wydajności w zakresie 95%-110%. Startery dla genów *LDHA* i *LDHB* były produktami firmy OriGene (HP208683 i HP208217). Do normalizacji ekspresji genów zastosowano startery dla GAPDH lub β -aktyny (ACTB), zakupione w OriGene (odpowiednio:

HP100003 i HP204660). ΔCt obliczono odejmując wartość progową cyklu (Ct) mRNA GAPDH od wartości Ct genu będącego przedmiotem zainteresowania (ΔCt). Krotność zmiany (FC) w ekspresji genów obliczono stosując metodę $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

7.9. Transfekcja komórek siRNA (small interfering RNA)

W celu wyciszenia ekspresji genu *LDHA* komórki transfekowano roztworem siRNA LDHA (MERCK, VPDSIRNA2D) w obecności czynnika transfekcyjnego INTERFERIN (Polyplus, 409-01), zgodnie z protokołami producentów. Komórki umieszczano w 12-dołkowej płytce do hodowli komórkowych w gęstości 100 000 komórek na dołek. Po 12 h w 37 °C w pełnym medium komórki przemywano PBS i umieszczano w 500 μ L świeżego medium bez surowicy i dodawano mieszaninę transfekcyjną. Po 4 h od transfekcji medium wymieniano na nowe, zawierające 10% FBS i komórki pozostawiano w hodowli na noc. Tak przygotowane komórki były wykorzystywane do eksperymentów z użyciem TNF- α , w sposób jaki opisano w podrozdziale 4.2.

7.10. Barwienie immunohistochemiczne (IHC)

Do barwień immunohistochemicznych wykorzystano materiał archiwalny w postaci bloczków parafinowych z zatopionymi fragmentami tkanek guza nowotworowego przełyku oraz histologicznie prawidłowego nabłonka przełyku, pochodzącego z granicy resekcji, które były pobierane w celach diagnostycznych w trakcie operacyjnego leczenia raka przełyku, w Katedrze i Klinice Chirurgii Przewodu Pokarmowego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, w latach 2009-2012. Skrawki tkanek przełyku zatopione w parafinie o grubości 4-5 μ m odparafinowano w dwóch zmianach ksyleny (każda po 10 minut), a następnie ponownie uwodniono w malejących stężeniach etanolu (95%, 70% i 50%). W celu odzyskania antygeny szkiełka ogrzewano w 10 mM buforze cytrynianu sodu, pH 6,0, w łaźni wodnej w temperaturze 97°C przez 40 min. Następnie endogenną peroksydazę blokowano 3% nadtlenkiem wodoru w PBS przez 10 min w temperaturze pokojowej. Skrawki barwiono przy użyciu pierwszorzędowych przeciwciał anti-LDHA, w rozcieńczeniu 1 μ g/mL, a następnie drugorzędowych przeciwciał IgG VisUCyte HRP Polymer Antibody (R&D Systems, VC002-025). Obszary LDHA-dodatnie wizualizowano przy użyciu 3,3'-diaminobenzydyny (DAB). Do barwienia kontrastowego skrawków użyto hematoksyliny Mayera. Wybarwione preparaty oglądano pod mikroskopem świetlnym (OLYMPUS CX43). Losowo wybierano po 5 obszarów

z każdego preparatu i fotografowano (1296 × 972 pikseli) za pomocą aparatu cyfrowego (Moticam 5+, 5,0 MP) przy 20-krotnym powiększeniu obiektywu (PlanC N 20x/0,4). Każdy z tych obszarów został oceniany niezależnie przez dwóch obserwatorów metodą półilościową. Wyniki uszeregowano jako brak zabarwienia (-), zabarwienie o niskiej intensywności (+), zabarwienie o pośredniej intensywności (++) i zabarwienie o wysokiej intensywności (+++). Dla celów statystycznych, wartości 0, 1, 2 i 3 były odpowiednio przypisane do intensywności barwienia. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu nieparametrycznego testu chi-kwadrat (χ^2).

7.11. Test migracji komórek (wound healing assay)

Komórki KYSE150 wysiano na 12-dołkowe płytki z włożonymi do nich wcześniej silikonowymi formami ibidi Culture-Insert 3 Well (80369) i utrzymywano w hodowli w kompletnym medium hodowlanym do uzyskania 70-75% konfluencji, a następnie głodzono przez noc w medium pozbawionym FBS. Po usunięciu silikonowych insertów, widoczne w hodowlach, utworzone powierzchnie wolne od komórek, określane w teście migracji jako sztuczne rany, były fotografowane. Zdjęcia (2464 x 2056 pikseli) wykonano przy 20-krotnym powiększeniu, za pomocą aparatu cyfrowego Zeiss, zintegrowanego z odwróconym mikroskopem Axio Vert.A1 (Carl Zeiss) i oznaczono jako kontrolne (0 h). Następnie komórki traktowano TNF- α (30 ng/ml), samym lub w kombinacji z oksamatem (50 mM) lub mleczanem (5 mM). Komórki KYSE150 z wcześniej wyciszoną za pomocą siRNA ekspresją podjednostki LDHA traktowano wyłącznie TNF- α (30 ng/ml). Obszary sztucznej rany były ponownie fotografowane po upływie 12, 24 i 48 h. Powierzchnię sztucznej rany w obrazach cyfrowych analizowano ilościowo za pomocą programu ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Migrację komórek wyrażono jako stosunek zamknięcia rany (R): $R = [(A_{0\text{ h}} - A_{\Delta\text{ h}}) / A_{0\text{ h}}]$ gdzie $A_{0\text{ h}}$ jest obszarem wolnym od komórek, mierzonym bezpośrednio po usunięciu silikonowych form, a $A_{\Delta\text{ h}}$ to powierzchnia sztucznej rany mierzona odpowiednio po 12, 24 lub 48 godzinach.

7.12. Test komórkowej senescencji

Do oceny stopnia senescencji komórki EC7 wysiano na 6-dołkowe płytki i utrzymywano w hodowli przez noc w pełnym medium, które następnie wymieniono na świeże bez surowicy. Po nocnym głodzeniu komórki były traktowane SO o stężeniu 25 mM lub 50 mM w obecności lub

nie TNF- α (30 ng/ml) przez 24 h. Po tym czasie medium zostało ponownie wymienione na pełne i komórki utrzymywano w hodowli w niezmienionych warunkach przez 6 dni. Medium wymieniano co drugi dzień. Barwienie na SA- β -gal (senescence-associated β -galactosidase) przeprowadzono przy użyciu Senescence β -Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling, 9860) zgodnie z instrukcją producenta. Do analizy wybrano po trzy losowo sfotografowane obszary z każdego dołka. Wyniki przedstawiono jako procent SA- β -gal pozytywnych komórek.

7.13. Pomiar apoptozy za pomocą cytometrii przepływowej

Do oceny apoptozy zastosowano test Annexin V-FITC/PI Apoptosis Kit (Elabscience, E-CK-A2111), zawierający izotiocyjanin 5-fluoresceiny (FITC) znakowany aneksyna V oraz jodek propidyny (PI). Komórki po trypsynizacji były zwirowane przy 200 x g i płukane PBS, a następnie ponownie zawieszono w PBS i liczone, z wykorzystaniem komory Bürkera. Następnie komórki w ilości 5×10^5 umieszczano w czystych probówkach, ponownie odwirowywano przy 200 x g i zawieszano w 500 μ l buforu do wiązania aneksyny V. Do probówek dodawano następnie po 5 μ L aneksyny V, związanej z FITC, która wiąże się z fosfatydyloseryną (PS) w zewnętrznej warstwie błony komórek apoptotycznych, oraz PI, który barwi jądrowe DNA, umożliwiając dyskryminację martwych komórek. Po 20 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej wyznakowane komórki analizowano za pomocą cytometrii przepływowej.

7.14. Analiza statystyczna

O ile nie zaznaczono inaczej, wszystkie doświadczenia powtórzono co najmniej trzy razy i przeanalizowano przy użyciu niezależnego testu t (Statistica 13). Wartość $p \leq 0,05$ wskazuje na statystycznie istotną różnicę.

8. Literatura

1. Abdel-Latif MM, Duggan S, Reynolds JV, Kelleher D. Inflammation and esophageal carcinogenesis. *Curr Opin Pharmacol.* 2009 Aug;9(4):396-404. doi: 10.1016/j.coph.2009.06.010.

2. Abdulkhaleq LA, Assi MA, Abdullah R, Zamri-Saad M, Taufiq-Yap YH, Hezmee MNM. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Vet World*. 2018 May;11(5):627-635. doi: 10.14202/vetworld.2018.627-635.
3. Absi A, Adelstein DJ, Rice T. *Esophageal Cancer*. Cleveland Clinic, 2013.
4. Adegbola SO, Sahnan K, Warusavitarne J, Hart A, Tozer P. Anti-TNF Therapy in Crohn's Disease. *Int J Mol Sci*. 2018 Jul 31;19(8):2244. doi: 10.3390/ijms19082244.
5. Aderka D, Engelmann H, Maor Y, Brakebusch C, Wallach D. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J Exp Med*. 1992 Feb 1;175(2):323-9. doi: 10.1084/jem.175.2.323.
6. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2003 Sep;3(9):745-56. doi: 10.1038/nri1184. PMID: 12949498.
7. Al Obeed OA, Alkhayal KA, Al Sheikh A, Zubaidi AM, Vaali-Mohammed MA, Boushey R, Mckerrow JH, Abdulla MH. Increased expression of tumor necrosis factor- α is associated with advanced colorectal cancer stages. *World J Gastroenterol*. 2014 Dec 28;20(48):18390-6. doi: 10.3748/wjg.v20.i48.18390. PMID: 25561807; PMCID: PMC4277977.
8. Anderson LA, Watson RG, Murphy SJ, Johnston BT, Comber H, Mc Guigan J, Reynolds JV, Murray LJ. Risk factors for Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma: results from the FINBAR study. *World J Gastroenterol*. 2007 Mar 14;13(10):1585-94. doi: 10.3748/wjg.v13.i10.1585.
9. Anderson NM, Simon MC. The tumor microenvironment. *Curr Biol*. 2020 Aug 17;30(16):R921-R925. doi: 10.1016/j.cub.2020.06.081.
10. Augoff K, Hryniewicz-Jankowska A, Tabola R, Stach K. MMP9: A Tough Target for Targeted Therapy for Cancer. *Cancers (Basel)*. 2022 Apr 6;14(7):1847. doi: 10.3390/cancers14071847.
11. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001 Feb 17;357(9255):539-45. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04046-0.
12. Balkwill F. TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2006 Sep;25(3):409-16. doi: 10.1007/s10555-006-9005-3. PMID: 16951987.
13. Balkwill F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002 Apr;13(2):135-41. doi: 10.1016/s1359-6101(01)00020-x.
14. Bartha Á, Gyórfy B. TNMplot.com: A Web Tool for the Comparison of Gene Expression in Normal, Tumor and Metastatic Tissues. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 5;22(5):2622. doi: 10.3390/ijms22052622. PMID: 33807717; PMCID: PMC7961455.

15. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med*. 1996 Jun 27;334(26):1717-25. doi: 10.1056/NEJM199606273342607.
16. Beales IL, Hensley A, Loke Y. Reduced esophageal cancer incidence in statin users, particularly with cyclo-oxygenase inhibition. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 2013 Aug 6;4(3):69-79. doi: 10.4292/wjgpt.v4.i3.69.
17. Binder S, Luciano M, Horejs-Hoeck J. The cytokine network in acute myeloid leukemia (AML): A focus on pro- and anti-inflammatory mediators. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2018 Oct;43:8-15. doi: 10.1016/j.cytogfr.2018.08.004.
18. Booka E, Tsubosa Y, Yokota T, Mayanagi S, Ishii K, Urakami K, Ohshima K, Ohnami S, Nagashima T, Yamaguchi K. Whole exome sequencing and deep sequencing of esophageal squamous cell carcinoma and adenocarcinoma in Japanese patients using the Japanese version of the Genome Atlas, JCGA. *Esophagus*. 2021 Oct;18(4):743-752. doi: 10.1007/s10388-021-00835-z.
19. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol*. 2008 Jan;214(2):149-60. doi: 10.1002/path.2287.
20. Brisson L, Bański P, Sboarina M, Dethier C, Danhier P, Fontenille MJ, Van Hée VF, Vazeille T, Tardy M, Falces J, Bouzin C, Porporato PE, Frédérick R, Michiels C, Copetti T, Sonveaux P. Lactate Dehydrogenase B Controls Lysosome Activity and Autophagy in Cancer. *Cancer Cell*. 2016 Sep 12;30(3):418-431. doi: 10.1016/j.ccell.2016.08.005. PMID: 27622334.
21. Cahn RD, Zwilling E, Kaplan NO, Levine L. Nature and Development of Lactic Dehydrogenases: The two major types of this enzyme form molecular hybrids which change in makeup during development. *Science*. 1962 Jun 15;136(3520):962-9. doi: 10.1126/science.136.3520.962
22. Cai H, Li J, Zhang Y, Liao Y, Zhu Y, Wang C, Hou J. LDHA Promotes Oral Squamous Cell Carcinoma Progression Through Facilitating Glycolysis and Epithelial-Mesenchymal Transition. *Front Oncol*. 2019 Dec 19;9:1446. doi: 10.3389/fonc.2019.01446. PMID: 31921691; PMCID: PMC6930919.
23. Cai TQ, Ren N, Jin L, Cheng K, Kash S, Chen R, Wright SD, Taggart AK, Waters MG. Role of GPR81 in lactate-mediated reduction of adipose lipolysis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Dec 19;377(3):987-91. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.10.088. Epub 2008 Oct 24. PMID: 18952058.

24. Calorini L, Bianchini F. Environmental control of invasiveness and metastatic dissemination of tumor cells: the role of tumor cell-host cell interactions. *Cell Commun Signal*. 2010 Sep 7;8:24. doi: 10.1186/1478-811X-8-24.
25. Candido J, Hagemann T. Cancer-related inflammation. *J Clin Immunol*. 2013 Jan;33 Suppl 1:S79-84. doi: 10.1007/s10875-012-9847-0.
26. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975 Sep;72(9):3666-70. doi: 10.1073/pnas.72.9.3666.
27. Celis R, Cuervo A, Ramírez J, Cañete JD. Psoriatic Synovitis: Singularity and Potential Clinical Implications. *Front Med (Lausanne)*. 2019 Feb 11;6:14. doi: 10.3389/fmed.2019.00014.
28. Chaffer CL, San Juan BP, Lim E, Weinberg RA. EMT, cell plasticity and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2016 Dec;35(4):645-654. doi: 10.1007/s10555-016-9648-7.
29. Charles KA, Kulbe H, Soper R, Escorcio-Correia M, Lawrence T, Schultheis A, Chakravarty P, Thompson RG, Kollias G, Smyth JF, Balkwill FR, Hagemann T. The tumor-promoting actions of TNF-alpha involve TNFR1 and IL-17 in ovarian cancer in mice and humans. *J Clin Invest*. 2009 Oct;119(10):3011-23. doi: 10.1172/JCI39065.
30. Chela HK, Gangu K, Ertugrul H, Juboori AA, Daglilar E, Tahan V. The 8th Wonder of the Cancer World: Esophageal Cancer and Inflammation. *Diseases*. 2022 Jul 7;10(3):44. doi: 10.3390/diseases10030044.
31. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 2017 Dec 14;9(6):7204-7218. doi: 10.18632/oncotarget.23208.
32. Chen X, Xun K, Chen L, Wang Y. TNF-alpha, a potent lipid metabolism regulator. *Cell Biochem Funct*. 2009 Oct;27(7):407-16. doi: 10.1002/cbf.1596.
33. Chey WD, Leontiadis GI, Howden CW, Moss SF. ACG Clinical Guideline: Treatment of Helicobacter pylori Infection. *Am J Gastroenterol*. 2017 Feb;112(2):212-239. doi: 10.1038/ajg.2016.563. Epub 2017 Jan 10. Erratum in: *Am J Gastroenterol*. 2018 Jul;113(7):1102.
34. Choi SY, Collins CC, Gout PW, Wang Y. Cancer-generated lactic acid: a regulatory, immunosuppressive metabolite? *J Pathol*. 2013 Aug;230(4):350-5. doi: 10.1002/path.4218

35. Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2001 Mar 22;344(12):907-16. doi: 10.1056/NEJM200103223441207.
36. Codipilly DC, Sawas T, Dhaliwal L, Johnson ML, Lansing R, Wang KK, Leggett CL, Katzka DA, Iyer PG. Epidemiology and Outcomes of Young-Onset Esophageal Adenocarcinoma: An Analysis from a Population-Based Database. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2021 Jan;30(1):142-149. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-20-0944.
37. Corley DA, Kubo A. Body mass index and gastroesophageal reflux disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 2006 Nov;101(11):2619-28. doi: 10.1111/j.1572-0241.2006.00849.x.
38. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002 Dec 19-26;420(6917):860-7. doi: 10.1038/nature01322.
39. Cowden Dahl KD, Symowicz J, Ning Y, Gutierrez E, Fishman DA, Adley BP, Stack MS, Hudson LG. Matrix metalloproteinase 9 is a mediator of epidermal growth factor-dependent e-cadherin loss in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 2008 Jun 15;68(12):4606-13. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5046
40. Croft M, Siegel RM. Beyond TNF: TNF superfamily cytokines as targets for the treatment of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2017 Apr;13(4):217-233. doi: 10.1038/nrrheum.2017.22.
41. Cruceiru D, Baldasici O, Balacescu O, Berindan-Neagoe I. The dual role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in breast cancer: molecular insights and therapeutic approaches. *Cell Oncol (Dordr).* 2020 Feb;43(1):1-18. doi: 10.1007/s13402-019-00489-1
42. Cui J, Quan M, Jiang W, Hu H, Jiao F, Li N, Jin Z, Wang L, Wang Y, Wang L. Suppressed expression of LDHB promotes pancreatic cancer progression via inducing glycolytic phenotype. *Med Oncol.* 2015 May;32(5):143. doi: 10.1007/s12032-015-0589-8. Epub 2015 Mar 26. PMID: 25807933.
43. Czajka-Francuz P, Francuz T, Cisoń-Jurek S, Czajka A, Fajkis M, Szymczak B, Kozaczka M, Malinowski KP, Zasada W, Wojnar J, Chudek J. Serum cytokine profile as a potential prognostic tool in colorectal cancer patients - one center study. *Rep Pract Oncol Radiother.* 2020 Nov-Dec;25(6):867-875. doi:10.1016/j.rpor.2020.08.004.
44. Dandoti S, Mechanisms adopted by cancer cells to escape apoptosis—A review. *BIOCELL* 2021 45(4): 863-884. doi: 10.32604/biocell.2021.013993.

45. de la Cruz-López KG, Castro-Muñoz LJ, Reyes-Hernández DO, García-Carrancá A, Manzo-Merino J. Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches. *Front Oncol.* 2019 Nov 1;9:1143. doi: 10.3389/fonc.2019.01143.
46. Dembic Z, Loetscher H, Gubler U, Pan YC, Lahm HW, Gentz R, Brockhaus M, Lesslauer W. Two human TNF receptors have similar extracellular, but distinct intracellular, domain sequences. *Cytokine.* 1990 Jul;2(4):231-7. doi: 10.1016/1043-4666(90)90022-1.
47. Deng HY, Lan X, Zheng X, Zha P, Zhou J, Wang RL, Jiang R, Qiu XM. The association between statin use and survival of esophageal cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2019 Jul;98(29):e16480. doi: 10.1097/MD.00000000000016480.
48. Domper Arnal MJ, Ferrández Arenas Á, Lanas Arbeloa Á. Esophageal cancer: Risk factors, screening and endoscopic treatment in Western and Eastern countries. *World J Gastroenterol.* 2015 Jul 14;21(26):7933-43. doi: 10.3748/wjg.v21.i26.7933.
49. Dong T, Liu Z, Xuan Q, Wang Z, Ma W, Zhang Q. Tumor LDH-A expression and serum LDH status are two metabolic predictors for triple negative breast cancer brain metastasis. *Sci Rep.* 2017 Jul 20;7(1):6069. doi: 10.1038/s41598-017-06378-7. PMID: 28729678; PMCID: PMC5519725.
50. Draguet A, Tagliatti V, Colet JM. Targeting Metabolic Reprogramming to Improve Breast Cancer Treatment: An In Vitro Evaluation of Selected Metabolic Inhibitors Using a Metabolomic Approach. *Metabolites.* 2021 Aug 22;11(8):556. doi: 10.3390/metabo11080556. PMID: 34436498; PMCID: PMC8399175.
51. Dulak AM, Stojanov P, Peng S, Lawrence MS, et al. Exome and whole-genome sequencing of esophageal adenocarcinoma identifies recurrent driver events and mutational complexity. *Nat Genet.* 2013 May;45(5):478-86. doi: 10.1038/ng.2591.
52. Egberts JH, Cloosters V, Noack A, Schniewind B, Thon L, Klose S, Kettler B, von Forstner C, Kneitz C, Tepel J, Adam D, Wajant H, Kalthoff H, Trauzold A. Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. *Cancer Res.* 2008 Mar 1;68(5):1443-50. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5704.
53. Ellis A, Risk JM, Maruthappu T, et al. Tylosis with oesophageal cancer: Diagnosis, management and molecular mechanisms. *Orphanet J Rare Dis* 10, 126 (2015). <https://doi.org/10.1186/s13023-015-0346-2>

54. Eslick GD. Epidemiology of esophageal cancer. *Gastroenterol Clin North Am.* 2009 Mar;38(1):17-25, vii. doi: 10.1016/j.gtc.2009.01.008. PMID: 19327565.
55. Hammad H, Wani S, Esophageal Tumors. (2020) *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease (2 Volume Set)*, 48, 700-719.e9.
56. Ferrari R. The role of TNF in cardiovascular disease. *Pharmacol Res.* 1999 Aug;40(2):97-105. doi: 10.1006/phrs.1998.0463.
57. Fisher OM, Lord SJ, Falkenback D, Clemons NJ, Eslick GD, Lord RV. The prognostic value of TP53 mutations in oesophageal adenocarcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Gut.* 2017 Mar;66(3):399-410. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310888.
58. Flossmann E, Rothwell PM; British Doctors Aspirin Trial and the UK-TIA Aspirin Trial. Effect of aspirin on long-term risk of colorectal cancer: consistent evidence from randomised and observational studies. *Lancet.* 2007 May 12;369(9573):1603-13. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60747-8
59. Fondy TP, Kaplan NO. Structural and functional properties of the H and M subunits of lactic dehydrogenases. *Ann N Y Acad Sci.* 1965 Jul 31;119(3):888-904. doi: 10.1111/j.1749-6632.1965.tb47450.x
60. Forkasiewicz A, Dorociak M, Stach K, Szelachowski P, Tabola R, Augoff K. The usefulness of lactate dehydrogenase measurements in current oncological practice. *Cell Mol Biol Lett.* 2020 Jun 9;25:35. doi: 10.1186/s11658-020-00228-7.
61. Forkasiewicz A, Stach W, Wierzbicki J, Stach K, Tabola R, Hryniewicz-Jankowska A, Augoff K. Effect of LDHA Inhibition on TNF- α -Induced Cell Migration in Esophageal Cancers. *Int J Mol Sci.* 2022 Dec 16;23(24):16062. doi: 10.3390/ijms232416062.
62. Fortuny J, Johnson CC, Bohlke K, Chow WH, Hart G, Kucera G, Mujumdar U, Ownby D, Wells K, Yood MU, Engel LS. Use of anti-inflammatory drugs and lower esophageal sphincter-relaxing drugs and risk of esophageal and gastric cancers. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2007 Oct;5(10):1154-1159.e3. doi: 10.1016/j.cgh.2007.05.022.
63. Francuz T, Czajka-Francuz P, Cisoń-Jurek S, Wojnar J. Rola zapalenia w patogenezie raka jelita grubego [The role of inflammation in colon cancer pathogenesis]. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2016 Apr 27;70:360-6. Polish. doi: 10.5604/17322693.1200551. PMID: 27117112.
64. Frankell AM, Jammula S, Li X, Contino G, Killcoyne S, Abbas S, Perner J, Bower L, Devonshire G, Ococks E, Grehan N, Mok J, O'Donovan M, MacRae S, Eldridge MD, Tavaré S; Oesophageal Cancer Clinical and Molecular Stratification (OCCAMS) Consortium; Fitzgerald RC. The landscape of selection in 551 esophageal

- adenocarcinomas defines genomic biomarkers for the clinic. *Nat Genet.* 2019 Mar;51(3):506-516. doi: 10.1038/s41588-018-0331-5.
65. Friedmann E, Hauben E, Maylandt K, Schleegeer S, Vreugde S, Lichtenthaler SF, Kuhn PH, Stauffer D, Rovelli G, Martoglio B. SPPL2a and SPPL2b promote intramembrane proteolysis of TNFalpha in activated dendritic cells to trigger IL-12 production. *Nat Cell Biol.* 2006 Aug;8(8):843-8. doi: 10.1038/ncb1440.
66. Fu Y, Liu S, Yin S, Niu W, Xiong W, Tan M, Li G, Zhou M. The reverse Warburg effect is likely to be an Achilles' heel of cancer that can be exploited for cancer therapy. *Oncotarget.* 2017 May 25;8(34):57813-57825. doi: 10.18632/oncotarget.18175. PMID: 28915713; PMCID: PMC5593685.
67. Fujimura T, Oyama K, Sasaki S, Nishijima K, Miyashita T, Ohta T, Miwa K, Hattori T. Inflammation-related carcinogenesis and prevention in esophageal adenocarcinoma using rat duodeno-esophageal reflux models. *Cancers (Basel).* 2011 Aug 10;3(3):3206-24. doi: 10.3390/cancers3033206.
68. Funkhouser EM, Sharp GB. Aspirin and reduced risk of esophageal carcinoma. *Cancer.* 1995 Oct 1;76(7):1116-9. doi: 10.1002/1097-0142(19951001)76:7<1116::aid-cncr2820760703>3.0.co;2-i.
69. Furman D, Campisi J, Verdin E, Carrera-Bastos P, Targ S, Franceschi C, Ferrucci L, Gilroy DW, Fasano A, Miller GW, Miller AH, Mantovani A, Weyand CM, Barzilai N, Goronzy JJ, Rando TA, Effros RB, Lucia A, Kleinstreuer N, Slavich GM. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat Med.* 2019 Dec;25(12):1822-1832. doi: 10.1038/s41591-019-0675-0.
70. Sawada G, Niida A, Uchi R, Hirata H, et al. Genomic Landscape of Esophageal Squamous Cell Carcinoma in a Japanese Population. *Gastroenterology.* 2016 May;150(5):1171-1182. doi: 10.1053/j.gastro.2016.01.035.
71. Gordan JD, Thompson CB, Simon MC. HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell.* 2007 Aug;12(2):108-13. doi: 10.1016/j.ccr.2007.07.006.
72. Griffin GK, Newton G, Tarrío ML, Bu DX, Maganto-García E, Azcutia V, Alcaide P, Gräbe N, Luscinskas FW, Croce KJ, Lichtman AH. IL-17 and TNF- α sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation. *J Immunol.* 2012 Jun 15;188(12):6287-99. doi: 10.4049/jimmunol.1200385.
73. Grimm M, Lazariotou M, Kircher S, Höfelmayr A, Germer CT, von Rahden BH, Waaga-Gasser AM, Gasser M. Tumor necrosis factor- α is associated with positive

- lymph node status in patients with recurrence of colorectal cancer-indications for anti-TNF- α agents in cancer treatment. *Cell Oncol (Dordr)*. 2011 Aug;34(4):315-26. doi: 10.1007/s13402-011-0027-7. PMID: 21573932.
74. Gupta GS. LDH-C4: a target with therapeutic potential for cancer and contraception. *Mol Cell Biochem*. 2012 Dec;371(1-2):115-27. doi: 10.1007/s11010-012-1428-2.
 75. Gupta M, Babic A, Beck AH, Terry K. TNF- α expression, risk factors, and inflammatory exposures in ovarian cancer: evidence for an inflammatory pathway of ovarian carcinogenesis? *Hum Pathol*. 2016 Aug;54:82-91. doi: 10.1016/j.humpath.2016.03.006.
 76. Han D, Zhang C. The Oxidative Damage and Inflammation Mechanisms in GERD-Induced Barrett's Esophagus. *Front Cell Dev Biol*. 2022 May 26;10:885537. doi: 10.3389/fcell.2022.885537.
 77. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9
 78. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022 Jan;12(1):31-46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
 79. Harmon C, O'Farrelly C, Robinson MW. The Immune Consequences of Lactate in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1259:113-124. doi: 10.1007/978-3-030-43093-1_7. PMID: 32578174.
 80. Hauner H, Petruschke T, Russ M, Röhrig K, Eckel J. Effects of tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) on glucose transport and lipid metabolism of newly-differentiated human fat cells in cell culture. *Diabetologia*. 1995 Jul;38(7):764-71. doi: 10.1007/s001250050350
 81. Hay N. Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nat Rev Cancer*. 2016 Oct;16(10):635-49. doi: 10.1038/nrc.2016.77. Epub 2016 Sep 16. PMID: 27634447; PMCID: PMC5516800.
 82. Hayden MS, Ghosh S. Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines. *Semin Immunol*. 2014 Jun;26(3):253-66. doi: 10.1016/j.smim.2014.05.004. Epub 2014 Jun 21.
 83. Hayes C, Donohoe CL, Davern M, Donlon NE. The oncogenic and clinical implications of lactate induced immunosuppression in the tumour microenvironment. *Cancer Lett*. 2021 Mar 1;500:75-86. doi: 10.1016/j.canlet.2020.12.021. Epub 2020 Dec 23. PMID: 33347908.
 84. Hernández-Quintero M, García-Villegas R, Castro-Muñozledo F. Differentiation-dependent increases in lactate dehydrogenase activity and isoenzyme expression in

- rabbit corneal epithelial cells. *Exp Eye Res.* 2002 Jan;74(1):71-82. doi: 10.1006/exer.2001.1110. PMID: 11878820.
85. Herszényi L, Tulassay Z. Epidemiology of gastrointestinal and liver tumors. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2010 Apr;14(4):249-58. PMID: 20496531.
86. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science.* 1991 Jul 5;253(5015):49-53. doi: 10.1126/science.1905840
87. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford).* 2010 Jul;49(7):1215-28. doi: 10.1093/rheumatology/keq031
88. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993 Jan 1;259(5091):87-91. doi: 10.1126/science.7678183.
89. Hourani T, Holden JA, Li W, Lenzo JC, Hadjigol S, O'Brien-Simpson NM. Tumor Associated Macrophages: Origin, Recruitment, Phenotypic Diversity, and Targeting. *Front Oncol.* 2021 Dec 20;11:788365. doi: 10.3389/fonc.2021.788365.
90. Hryniewicz-Jankowska A, Wierzbicki J, Tabola R, Stach K, Sossey-Alaoui K, Augoff K. The Effect of Neddylation Inhibition on Inflammation-Induced MMP9 Gene Expression in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2021 Feb 9;22(4):1716. doi: 10.3390/ijms22041716.
91. Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell.* 2008 Sep 5;134(5):703-7. doi: 10.1016/j.cell.2008.08.021.
92. Huang J, Koulaouzidis A, Marlicz W, Lok V, Chu C, Ngai CH, Zhang L, Chen P, Wang S, Yuan J, Lao XQ, Tse SLA, Xu W, Zheng ZJ, Xie SH, Wong MCS. Global Burden, Risk Factors, and Trends of Esophageal Cancer: An Analysis of Cancer Registries from 48 Countries. *Cancers (Basel).* 2021 Jan 5;13(1):141. doi: 10.3390/cancers13010141.
93. Hvid-Jensen F, Pedersen L, Funch-Jensen P, Drewes AM. Proton pump inhibitor use may not prevent high-grade dysplasia and oesophageal adenocarcinoma in Barrett's oesophagus: a nationwide study of 9883 patients. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014 May;39(9):984-91. doi: 10.1111/apt.12693.
94. Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech.* 2000 Aug 1;50(3):184-95.
95. Islami F, Boffetta P, Ren JS, Pedoeim L, Khatib D, Kamangar F. High-temperature beverages and foods and esophageal cancer risk--a systematic review. *Int J Cancer.* 2009 Aug 1;125(3):491-524. doi: 10.1002/ijc.24445.

96. Jain S, Dhingra S. Pathology of esophageal cancer and Barrett's esophagus. *Ann Cardiothorac Surg*. 2017 Mar;6(2):99-109. doi: 10.21037/acs.2017.03.06.
97. Jang D-i, Lee A-H, Shin H-Y, Song H-R, Park J-H, Kang T-B, Lee S-R, Yang S-H. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(5):2719. <https://doi.org/10.3390/ijms22052719>
98. Jayaprakash V, Menezes RJ, Javle MM, McCann SE, Baker JA, Reid ME, Natarajan N, Moysich KB. Regular aspirin use and esophageal cancer risk. *Int J Cancer*. 2006 Jul 1;119(1):202-7. doi: 10.1002/ijc.21814.
99. Ji H, Cao R, Yang Y, Zhang Y, Iwamoto H, Lim S, Nakamura M, Andersson P, Wang J, Sun Y, Dissing S, He X, Yang X, Cao Y. TNFR1 mediates TNF- α -induced tumour lymphangiogenesis and metastasis by modulating VEGF-C-VEGFR3 signalling. *Nat Commun*. 2014 Sep 17;5:4944. doi: 10.1038/ncomms5944.
100. Jinga DC, Blidaru A, Condrea I, Ardeleanu C, Dragomir C, Szegli G, Stefanescu M, Matache C. MMP-9 and MMP-2 gelatinases and TIMP-1 and TIMP-2 inhibitors in breast cancer: correlations with prognostic factors. *J Cell Mol Med*. 2006 Apr-Jun;10(2):499-510. doi: 10.1111/j.1582-4934.2006.tb00415.x. PMID: 16796815; PMCID: PMC3933137.
101. Jurisic V, Bumbasirevic V, Konjevic G, Djuricic B, Spuzic I. TNF-alpha induces changes in LDH isotype profile following triggering of apoptosis in PBL of non-Hodgkin's lymphomas. *Ann Hematol*. 2004 Feb;83(2):84-91. doi: 10.1007/s00277-003-0731-0.
102. Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*. 2005 Oct;5(10):749-59. doi: 10.1038/nri1703. PMID: 16175180.
103. Kartikasari AER, Huertas CS, Mitchell A, Plebanski M. Tumor-Induced Inflammatory Cytokines and the Emerging Diagnostic Devices for Cancer Detection and Prognosis. *Front Oncol*. 2021 Jul 7;11:692142. doi: 10.3389/fonc.2021.692142.
104. Khandia R, Munjal A. Interplay between inflammation and cancer. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2020;119:199-245. doi: 10.1016/bs.apcsb.2019.09.004. Epub 2019 Nov 26.
105. Kierans SJ, Taylor CT. Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology. *J Physiol*. 2021 Jan;599(1):23-37. doi: 10.1113/JP280572. Epub 2020 Oct 15. PMID: 33006160

106. Kiraly O, Gong G, Olipitz W, Muthupalani S, Engelward BP. Inflammation-induced cell proliferation potentiates DNA damage-induced mutations in vivo. *PLoS Genet.* 2015 Feb 3;11(2):e1004901. doi: 10.1371/journal.pgen.1004901. PMID: 25647331; PMCID: PMC4372043.
107. Kokolakis G, Sabat R, Krüger-Krasagakis S, Eberle J. Ambivalent Effects of Tumor Necrosis Factor Alpha on Apoptosis of Malignant and Normal Human Keratinocytes. *Skin Pharmacol Physiol.* 2021;34(2):94-102. doi: 10.1159/000513725. Epub 2021 Mar 17. PMID: 33730739.
108. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Panteliadou M, Pouliliou SE, Chondrou PS, Mavropoulou S, Sivridis E. Lactate dehydrogenase 5 isoenzyme overexpression defines resistance of prostate cancer to radiotherapy. *Br J Cancer.* 2014 Apr 29;110(9):2217-23. doi: 10.1038/bjc.2014.158.
109. Krieg AF, Rosenblum LJ, Henry JB. Lactate dehydrogenase isoenzymes a comparison of pyruvate-to-lactate and lactate-to-pyruvate assays. *Clin Chem.* 1967 Mar;13(3):196-203.
110. Kubo A, Corley DA. Body mass index and adenocarcinomas of the esophagus or gastric cardia: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 May;15(5):872-8. doi: 10.1158/1055-9965.
111. Kuper H, Adami HO, Trichopoulos D. Infections as a major preventable cause of human cancer. *J Intern Med.* 2000 Sep;248(3):171-83. doi: 10.1046/j.1365-2796.2000.00742.x.
112. Laha D, Grant R, Mishra P, Nilubol N. The Role of Tumor Necrosis Factor in Manipulating the Immunological Response of Tumor Microenvironment. *Front Immunol.* 2021 Apr 27;12:656908. doi: 10.3389/fimmu.2021.656908.
113. Lambert R, Hainaut P. The multidisciplinary management of gastrointestinal cancer. *Epidemiology of oesophagogastric cancer. Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2007;21(6):921-45. doi: 10.1016/j.bpg.2007.10.001.
114. Langvad E. Lactate dehydrogenase isoenzyme patterns in bronchogenic carcinoma. *Eur J Cancer (1965).* 1968 Mar;4(1):107-15. doi: 10.1016/0014-2964(68)90074-1
115. Larrick JW, Wright SC. Cytotoxic mechanism of tumor necrosis factor-alpha. *FASEB J.* 1990 Nov;4(14):3215-23. doi: 10.1096/fasebj.4.14.2172061.

116. Lassen A, Hallas J, de Muckadell OB. Esophagitis: incidence and risk of esophageal adenocarcinoma--a population-based cohort study. *Am J Gastroenterol*. 2006 Jun;101(6):1193-9. doi: 10.1111/j.1572-0241.2006.00550.x.
117. Le A, Cooper CR, Gouw AM, Dinavahi R, Maitra A, Deck LM, Royer RE, Vander Jagt DL, Semenza GL, Dang CV. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Feb 2;107(5):2037-42. doi: 10.1073/pnas.0914433107
118. Lee HW, Choi HJ, Ha SJ, Lee KT, Kwon YG. Recruitment of monocytes/macrophages in different tumor microenvironments. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Apr;1835(2):170-9. doi: 10.1016/j.bbcan.2012.12.007
119. Leiblich A, Cross SS, Catto JW, Phillips JT, Leung HY, Hamdy FC, Rehman I. Lactate dehydrogenase-B is silenced by promoter hypermethylation in human prostate cancer. *Oncogene*. 2006 May 11;25(20):2953-60. doi: 10.1038/sj.onc.1209262. PMID: 16547507.
120. Lewis B, Morson BC, February AW, Jones JH, Misiewicz JJ. Abnormal lactic dehydrogenase isoenzyme patterns in ulcerative colitis with precancerous change. *Gut*. 1971 Jan;12(1):16-9. doi: 10.1136/gut.12.1.16.
121. Li J, Zhu S, Tong J, Hao H, Yang J, Liu Z, Wang Y. Suppression of lactate dehydrogenase A compromises tumor progression by downregulation of the Warburg effect in glioblastoma. *Neuroreport*. 2016 Jan 20;27(2):110-5. doi: 10.1097/WNR.0000000000000506.
122. Li X, Wang S, Ren H, Ma J, Sun X, Li N, Liu C, Huang K, Xu M, Ming L. Molecular correlates and prognostic value of tmTNF- α expression in colorectal cancer of 5-Fluorouracil-Based Adjuvant Therapy. *Cancer Biol Ther*. 2016(a) Jun 2;17(6):684-92. doi: 10.1080/15384047.2016.1187551.
123. Liao AC, Li CF, Shen KH, Chien LH, Huang HY, Wu TF. Loss of lactate dehydrogenase B subunit expression is correlated with tumour progression and independently predicts inferior disease-specific survival in urinary bladder urothelial carcinoma. *Pathology*. 2011 Dec;43(7):707-12. doi: 10.1097/PAT.0b013e32834bf67a. PMID: 22027740.
124. Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci*. 2016 Mar;41(3):211-218. doi: 10.1016/j.tibs.2015.12.001. Epub 2016 Jan 5. Erratum in: *Trends Biochem Sci*. 2016 Mar;41(3):287. Erratum in: *Trends Biochem Sci*. 2016 Mar;41(3):287. PMID: 26778478; PMCID: PMC4783224.

125. Lin CC, Tseng HW, Hsieh HL, Lee CW, Wu CY, Cheng CY, Yang CM. Tumor necrosis factor-alpha induces MMP-9 expression via p42/p44 MAPK, JNK, and nuclear factor-kappaB in A549 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008 Jun 15;229(3):386-98. doi: 10.1016/j.taap.2008.01.032. Epub 2008 Feb 9. PMID: 18336852.
126. Liu KS, Raza SA, El-Serag HB, Thrift AP. Trends in Esophageal Adenocarcinoma and Esophageal Squamous Cell Carcinoma Incidence in the United States from 1992 to 2019. *Cancers (Basel)*. 2022 Dec 8;14(24):6049. doi: 10.3390/cancers14246049
127. Liu P, Zhou J, Zhu H, Xie L, Wang F, Liu B, Shen W, Ye W, Xiang B, Zhu X, Shi R, Zhang S. VEGF-C promotes the development of esophageal cancer via regulating CNTN-1 expression. *Cytokine*. 2011 Jul;55(1):8-17. doi: 10.1016/j.cyto.2011.03.008.
128. Loomans-Kropp HA, Chaloux M, Richmond E, Umar A. Association of Common Use Pharmaceuticals in Reducing Risk of Esophageal Adenocarcinoma: A SEER-Medicare Analysis. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2021 Feb;14(2):195-204. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-20-0274.
129. Lousa I, Reis F, Santos-Silva A, Belo L. The Signaling Pathway of TNF Receptors: Linking Animal Models of Renal Disease to Human CKD. *Int J Mol Sci*. 2022 Mar 18;23(6):3284. doi: 10.3390/ijms23063284.
130. Lu SH, Montesano R, Zhang MS, Feng L, Luo FJ, Chui SX, Umbenhauer D, Saffhill R, Rajewsky MF. Relevance of N-nitrosamines to esophageal cancer in China. *J Cell Physiol Suppl*. 1986;4:51-8. doi: 10.1002/jcp.1041290411.
131. Lukey MJ, Wilson KF, Cerione RA. Therapeutic strategies impacting cancer cell glutamine metabolism. *Future Med Chem*. 2013 Sep;5(14):1685-700. doi: 10.4155/fmc.13.130.
132. Ma Y, Ren Y, Dai ZJ, Wu CJ, Ji YH, Xu J. IL-6, IL-8 and TNF- α levels correlate with disease stage in breast cancer patients. *Adv Clin Exp Med*. 2017 May-Jun;26(3):421-426. doi: 10.17219/acem/62120. PMID: 28791816.
133. Maekawa M, Taniguchi T, Ishikawa J, Sugimura H, Sugano K, Kanno T. Promoter hypermethylation in cancer silences LDHB, eliminating lactate dehydrogenase isoenzymes 1-4. *Clin Chem*. 2003 Sep;49(9):1518-20. doi: 10.1373/49.9.1518. PMID: 12928234.
134. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008 Jul 24;454(7203):436-44. doi: 10.1038/nature07205.

135. Masclee GM, Coloma PM, Spaander MC, Kuipers EJ, Sturkenboom MC. NSAIDs, statins, low-dose aspirin and PPIs, and the risk of oesophageal adenocarcinoma among patients with Barrett's oesophagus: a population-based case-control study. *BMJ Open*. 2015 Jan 29;5(1):e006640. doi: 10.1136/bmjopen-2014-006640.
136. McClelland ML, Adler AS, Deming L, Cosino E, Lee L, Blackwood EM, Solon M, Tao J, Li L, Shames D, Jackson E, Forrest WF, Firestein R. Lactate dehydrogenase B is required for the growth of KRAS-dependent lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*. 2013 Feb 15;19(4):773-84. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2638. Epub 2012 Dec 6. PMID: 23224736.
137. McClelland ML, Adler AS, Shang Y, Hunsaker T, Truong T, Peterson D, Torres E, Li L, Haley B, Stephan JP, Belvin M, Hatzivassiliou G, Blackwood EM, Corson L, Evangelista M, Zha J, Firestein R. An integrated genomic screen identifies LDHB as an essential gene for triple-negative breast cancer. *Cancer Res*. 2012 Nov 15;72(22):5812-23. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1098. Epub 2012 Nov 8. PMID: 23139210.
138. Michalaki V, Syrigos K, Charles P, Waxman J. Serum levels of IL-6 and TNF- α correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer. *Br J Cancer*. 2004 Jun 14;90(12):2312-6. doi: 10.1038/sj.bjc.6601814. Erratum in: *Br J Cancer*. 2004 Sep 13;91(6):1227.
139. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*. 2003 Jul 25;114(2):181-90. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00521-x.
140. Mifflin L, Ofengeim D, Yuan J. Receptor-interacting protein kinase 1 (RIPK1) as a therapeutic target. *Nat Rev Drug Discov*. 2020 Aug;19(8):553-571. doi: 10.1038/s41573-020-0071-y.
141. Mikami S, Mizuno R, Kosaka T, Saya H, Oya M, Okada Y. Expression of TNF- α and CD44 is implicated in poor prognosis, cancer cell invasion, metastasis and resistance to the sunitinib treatment in clear cell renal cell carcinomas. *Int J Cancer*. 2015 Apr 1;136(7):1504-14. doi: 10.1002/ijc.29137. Epub 2014 Sep 17. PMID: 25123505.
142. Mishra D, Banerjee D. Lactate Dehydrogenases as Metabolic Links between Tumor and Stroma in the Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel)*. 2019 May 29;11(6):750. doi: 10.3390/cancers11060750. Erratum in: *Cancers (Basel)*. 2020 Apr 09;12(4): PMID: 31146503; PMCID: PMC6627402.

143. Miskimins WK, Ahn HJ, Kim JY, Ryu S, Jung YS, Choi JY. Synergistic anti-cancer effect of phenformin and oxamate. *PLoS One*. 2014 Jan 21;9(1):e85576. doi: 10.1371/journal.pone.0085576. PMID: 24465604; PMCID: PMC3897486.
144. Moore RJ, Owens DM, Stamp G, Arnott C, Burke F, East N, Holdsworth H, Turner L, Rollins B, Pasparakis M, Kollias G, Balkwill F. Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis. *Nat Med*. 1999 Jul;5(7):828-31. doi: 10.1038/10552. Erratum in: *Nat Med* 1999 Sep;5(9):1087.
145. Morris RM, Mortimer TO, O'Neill KL. Cytokines: Can Cancer Get the Message? *Cancers (Basel)*. 2022 Apr 27;14(9):2178. doi: 10.3390/cancers14092178.
146. Muppidi JR, Tschopp J, Siegel RM. Life and death decisions: secondary complexes and lipid rafts in TNF receptor family signal transduction. *Immunity*. 2004 Oct;21(4):461-5. doi: 10.1016/j.immuni.2004.10.001. PMID: 15485624.
147. Murata M. Inflammation and cancer. *Environ Health Prev Med*. 2018 Oct 20;23(1):50. doi: 10.1186/s12199-018-0740-1.
148. Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl)*. 2015 Dec 11;3:83-92. doi: 10.2147/HP.S93413
149. Napier KJ, Scheerer M, Misra S. Esophageal cancer: A Review of epidemiology, pathogenesis, staging workup and treatment modalities. *World J Gastrointest Oncol*. 2014 May 15;6(5):112-20. doi: 10.4251/wjgo.v6.i5.112.
150. Narasimhan H, Ferraro F, Bleilevens A, Weiskirchen R, Stickeler E, Maurer J. Tumor Necrosis Factor- α (TNF α) Stimulate Triple-Negative Breast Cancer Stem Cells to Promote Intratumoral Invasion and Neovasculogenesis in the Liver of a Xenograft Model. *Biology (Basel)*. 2022 Oct 9;11(10):1481. doi: 10.3390/biology11101481.
151. Nehar D, Mauduit C, Boussouar F, Benahmed M. Tumor necrosis factor-alpha-stimulated lactate production is linked to lactate dehydrogenase A expression and activity increase in porcine cultured Sertoli cells. *Endocrinology*. 1997 May;138(5):1964-71. doi: 10.1210/endo.138.5.5098.
152. Nguyen T, Duan Z, Naik AD, Kramer JR, El-Serag HB. Statin use reduces risk of esophageal adenocarcinoma in US veterans with Barrett's esophagus: a nested case-control study. *Gastroenterology*. 2015 Nov;149(6):1392-8. doi: 10.1053/j.gastro.2015.07.009.
153. Nguyen TL, Durán RV. Glutamine metabolism in cancer therapy. *Cancer Drug Resist*. 2018 Sep 19;1(3):126-38. doi.org/10.20517/cdr.2018.08

154. Novacek G. Plummer-Vinson syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2006 Sep 15;1:36. doi: 10.1186/1750-1172-1-36.
155. Owyong M, Chou J, van den Bijgaart RJ, Kong N, Efe G, Maynard C, Talmi-Frank D, Solomonov I, Koopman C, Hadler-Olsen E, Headley M, Lin C, Wang CY, Sagi I, Werb Z, Plaks V. MMP9 modulates the metastatic cascade and immune landscape for breast cancer anti-metastatic therapy. *Life Sci Alliance.* 2019 Nov 14;2(6):e201800226. doi: 10.26508/lsa.201800226
156. Ozaki K, Leonard WJ. Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. *J Biol Chem.* 2002 Aug 16;277(33):29355-8. doi: 10.1074/jbc.R200003200.
157. Pantazis P, Lazarou SA, Papadopoulos NM. Isoenzymes of lactate dehydrogenase in human leukemic cells in culture treated with inducers of differentiation. *J Cell Biol.* 1981 Aug;90(2):396-401. doi: 10.1083/jcb.90.2.396. PMID: 6945307; PMCID: PMC2111856.
158. Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2010;20(2):87-103. doi: 10.1615/critreveukargeneexpr.v20.i2.10.
159. Perez C, Albert I, DeFay K, Zachariades N, Gooding L, Kriegler M. A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell.* 1990 Oct 19;63(2):251-8. doi: 10.1016/0092-8674(90)90158-b.
160. Peschon JJ, Slack JL, Reddy P, Stocking KL, Sunnarborg SW, Lee DC, Russell WE, Castner BJ, Johnson RS, Fitzner JN, Boyce RW, Nelson N, Kozlosky CJ, Wolfson MF, Rauch CT, Cerretti DP, Paxton RJ, March CJ, Black RA. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science.* 1998 Nov 13;282(5392):1281-4. doi: 10.1126/science.282.5392.1281.
161. Phan LM, Yeung SC, Lee MH. Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies. *Cancer Biol Med.* 2014 Mar;11(1):1-19. doi: 10.7497/j.issn.2095-3941.2014.01.001. PMID: 24738035; PMCID: PMC3969803.
162. Qiao T, Xiong Y, Feng Y, Guo W, Zhou Y, Zhao J, Jiang T, Shi C, Han Y. Inhibition of LDH-A by Oxamate Enhances the Efficacy of Anti-PD-1 Treatment in an NSCLC Humanized Mouse Model. *Front Oncol.* 2021 Mar 30;11:632364. doi: 10.3389/fonc.2021.632364. PMID: 33859941; PMCID: PMC8042335.

163. Qiao Y, He H, Jonsson P, Sinha I, Zhao C, Dahlman-Wright K. AP-1 Is a Key Regulator of Proinflammatory Cytokine TNF α -mediated Triple-negative Breast Cancer Progression. *J Biol Chem.* 2016 Mar 4;291(10):5068-79. doi: 10.1074/jbc.M115.702571.
164. Qu Y, Zhao G, Li H. Forward and Reverse Signaling Mediated by Transmembrane Tumor Necrosis Factor-Alpha and TNF Receptor 2: Potential Roles in an Immunosuppressive Tumor Microenvironment. *Front Immunol.* 2017 Nov 28;8:1675. doi: 10.3389/fimmu.2017.01675.
165. Reinhard C, Shamon B, Shyamala V, Williams LT. Tumor necrosis factor alpha-induced activation of c-jun N-terminal kinase is mediated by TRAF2. *EMBO J.* 1997 Mar 3;16(5):1080-92. doi: 10.1093/emboj/16.5.1080.
166. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet.* 2008 Feb 16;371(9612):569-78. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60269-X.
167. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med.* 2010 Dec 1;49(11):1603-16. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.
168. Robaye B, Mosselmans R, Fiers W, Dumont JE, Galand P. Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in vitro. *Am J Pathol.* 1991 Feb;138(2):447-53.
169. Rong Y, Wu W, Ni X, Kuang T, Jin D, Wang D, Lou W. Lactate dehydrogenase A is overexpressed in pancreatic cancer and promotes the growth of pancreatic cancer cells. *Tumour Biol.* 2013 Jun;34(3):1523-30. doi: 10.1007/s13277-013-0679-1. Epub 2013 Feb 13. PMID: 23404405.
170. Sade-Feldman M, Kanterman J, Ish-Shalom E, Elnekave M, Horwitz E, Baniyash M. Tumor necrosis factor- α blocks differentiation and enhances suppressive activity of immature myeloid cells during chronic inflammation. *Immunity.* 2013 Mar 21;38(3):541-54. doi: 10.1016/j.immuni.2013.02.007.
171. Samantaray S, Sharma R, Chattopadhyaya TK, Gupta SD, Ralhan R. Increased expression of MMP-2 and MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2004 Jan;130(1):37-44. doi: 10.1007/s00432-003-0500-4. Epub 2003 Oct 16. PMID: 14569466.

172. San-Millán I, Brooks GA. Reexamining cancer metabolism: lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect. *Carcinogenesis*. 2017 Feb 1;38(2):119-133. doi: 10.1093/carcin/bgw127.
173. Sasaki Y, Tamura M, Koyama R, Nakagaki T, Adachi Y, Tokino T. Genomic characterization of esophageal squamous cell carcinoma: Insights from next-generation sequencing. *World J Gastroenterol*. 2016 Feb 21;22(7):2284-93. doi: 10.3748/wjg.v22.i7.2284.
174. Schiliro C, Firestein BL. Mechanisms of Metabolic Reprogramming in Cancer Cells Supporting Enhanced Growth and Proliferation. *Cells*. 2021 Apr 29;10(5):1056. doi: 10.3390/cells10051056. Erratum in: *Cells*. 2022 Nov 14;11(22): PMID: 33946927; PMCID: PMC8146072.
175. Schwickert G, Walenta S, Sundfør K, Rofstad EK, Mueller-Klieser W. Correlation of high lactate levels in human cervical cancer with incidence of metastasis. *Cancer Res*. 1995 Nov 1;55(21):4757-9. PMID: 7585499.
176. Sharma P. Barrett Esophagus: A Review. *JAMA*. 2022 Aug 16;328(7):663-671. doi: 10.1001/jama.2022.13298.
177. Simabuco FM, Morale MG, Pavan ICB, Morelli AP, Silva FR, Tamura RE. p53 and metabolism: from mechanism to therapeutics. *Oncotarget*. 2018 May 4;9(34):23780-23823. doi: 10.18632/oncotarget.25267.
178. Singh S, Garg SK, Singh PP, Iyer PG, El-Serag HB. Acid-suppressive medications and risk of oesophageal adenocarcinoma in patients with Barrett's oesophagus: a systematic review and meta-analysis. *Gut*. 2014 Aug;63(8):1229-37. doi: 10.1136/gutjnl-2013-305997.
179. Singh S, Singh AG, Singh PP, Murad MH, Iyer PG. Statins are associated with reduced risk of esophageal cancer, particularly in patients with Barrett's esophagus: a systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013 Jun;11(6):620-9. doi: 10.1016/j.cgh.2012.12.036.
180. Stagg BH, Whyley GA. Some characteristics of lactate dehydrogenase isoenzymes in tumours of the female genital tract. *Clin Chim Acta*. 1968 Dec;22(4):521-33. doi: 10.1016/0009-8981(68)90100-9. PMID: 5722337.
181. Stern R, Shuster S, Neudecker BA, Formby B. Lactate stimulates fibroblast expression of hyaluronan and CD44: the Warburg effect revisited. *Exp Cell Res*. 2002 May 15;276(1):24-31. doi: 10.1006/excr.2002.5508. PMID: 11978005.

182. Suarez-Carmona M, Lesage J, Cataldo D, Gilles C. EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. *Mol Oncol.* 2017 Jul;11(7):805-823. doi: 10.1002/1878-0261.12095.
183. Suarez-Cuervo C, Harris KW, Kallman L, Väänänen HK, Selander KS. Tumor necrosis factor-alpha induces interleukin-6 production via extracellular-regulated kinase 1 activation in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2003 Jul;80(1):71-8. doi: 10.1023/a:1024443303436.
184. Szlosarek PW, Grimshaw MJ, Kulbe H, Wilson JL, Wilbanks GD, Burke F, Balkwill FR. Expression and regulation of tumor necrosis factor alpha in normal and malignant ovarian epithelium. *Mol Cancer Ther.* 2006 Feb;5(2):382-90. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0303.
185. Tang D, Tao D, Fang Y, Deng C, Xu Q, Zhou J. TNF-Alpha Promotes Invasion and Metastasis via NF-Kappa B Pathway in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Med Sci Monit Basic Res.* 2017 Apr 7;23:141-149. doi: 10.12659/msmbr.903910.
186. Teperino R, Schoonjans K, Auwerx J. Histone methyl transferases and demethylases; can they link metabolism and transcription? *Cell Metab.* 2010 Oct 6;12(4):321-327. doi: 10.1016/j.cmet.2010.09.004.
187. Thornburg JM, Nelson KK, Clem BF, Lane AN, Arumugam S, Simmons A, Eaton JW, Telang S, Chesney J. Targeting aspartate aminotransferase in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2008;10(5):R84. doi: 10.1186/bcr2154. Epub 2008 Oct 15. PMID: 18922152; PMCID: PMC2614520.
188. Thun MJ, Namboodiri MM, Calle EE, Flanders WD, Heath CW Jr. Aspirin use and risk of fatal cancer. *Cancer Res.* 1993 Mar 15;53(6):1322-7.
189. Tuazon Kels MJ, Ng E, Al Rumaih Z, Pandey P, Ruuls SR, Korner H, Newsome TP, Chaudhri G, Karupiah G. TNF deficiency dysregulates inflammatory cytokine production, leading to lung pathology and death during respiratory poxvirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020 Jul 7;117(27):15935-15946. doi: 10.1073/pnas.2004615117.
190. Turnquist C, Ryan BM, Horikawa I, Harris BT, Harris CC. Cytokine Storms in Cancer and COVID-19. *Cancer Cell.* 2020 Nov 9;38(5):598-601. doi: 10.1016/j.ccell.2020.09.019.
191. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009 May 22;324(5930):1029-33. doi: 10.1126/science.1160809.

192. Varfolomeev EE, Ashkenazi A. Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie? *Cell*. 2004 Feb 20;116(4):491-7. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00166-7. PMID: 14980217.
193. Vaughan RA, Garcia-Smith R, Trujillo KA, Bisoffi M. Tumor necrosis factor alpha increases aerobic glycolysis and reduces oxidative metabolism in prostate epithelial cells. *Prostate*. 2013 Oct;73(14):1538-46. doi: 10.1002/pros.22703. Epub 2013 Jul 1. PMID: 23818177.
194. Vendramini-Costa DB, Carvalho JE. Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. *Curr Pharm Des*. 2012;18(26):3831-52. doi: 10.2174/138161212802083707
195. Verma S, Singh A, Yadav G, Kushwaha R, Ali W, Verma SP, Singh US. Serum Tumor Necrosis Factor-Alpha Levels in Acute Leukemia and Its Prognostic Significance. *Cureus*. 2022 May 8;14(5):e24835. doi: 10.7759/cureus.24835.
196. von Eyben FE. A systematic review of lactate dehydrogenase isoenzyme 1 and germ cell tumors. *Clin Biochem*. 2001 Sep;34(6):441-54. doi: 10.1016/s0009-9120(01)00236-3.
197. Wajant H, Siegmund D. TNFR1 and TNFR2 in the Control of the Life and Death Balance of Macrophages. *Front Cell Dev Biol*. 2019 May 29;7:91. doi: 10.3389/fcell.2019.00091.
198. Walenta S, Wetterling M, Lehrke M, Schwickert G, SundfØr K, Rofstad EK, Mueller-Klieser W. High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res*. 2000 Feb 15;60(4):916-21. PMID: 10706105.
199. Wang F, Lv ZS, Fu YK. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and esophageal inflammation - Barrett's esophagus - adenocarcinoma sequence: a meta-analysis. *Dis Esophagus*. 2011 Jul;24(5):318-24. doi: 10.1111/j.1442-2050.2010.01153.x.
200. Wang Y, Nie H, Liao Z, He X, Xu Z, Zhou J, Ou C. Expression and Clinical Significance of Lactate Dehydrogenase A in Colon Adenocarcinoma. *Front Oncol*. 2021 Jul 9;11:700795. doi: 10.3389/fonc.2021.700795. PMID: 34307169; PMCID: PMC8300199.
201. Warburg, Otto. "The metabolism of tumours." Constable (1930)
202. Warzocha K, Salles G. The tumor necrosis factor signaling complex: choosing a path toward cell death or cell proliferation. *Leuk Lymphoma*. 1998 Mar;29(1-2):81-92. doi: 10.3109/10428199809058384. PMID: 9638978.

203. Webster JD, Vucic D. The Balance of TNF Mediated Pathways Regulates Inflammatory Cell Death Signaling in Healthy and Diseased Tissues. *Front Cell Dev Biol.* 2020 May 21;8:365. doi: 10.3389/fcell.2020.00365.
204. Wheeler JB, Reed CE. Epidemiology of esophageal cancer. *Surg Clin North Am.* 2012 Oct;92(5):1077-87. doi: 10.1016/j.suc.2012.07.008.
205. Wicks EE, Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: cancer progression and clinical translation. *J Clin Invest.* 2022 Jun 1;132(11):e159839. doi: 10.1172/JCI159839.
206. Wolczyk D, Zaremba-Czogalla M, Hryniewicz-Jankowska A, Tabola R, Grabowski K, Sikorski AF, Augoff K. TNF- α promotes breast cancer cell migration and enhances the concentration of membrane-associated proteases in lipid rafts. *Cell Oncol (Dordr).* 2016 Aug;39(4):353-63. doi: 10.1007/s13402-016-0280-x.
207. Woollams R, Barratt PJ, Orwell RL, Piper DW. LDH isoenzyme pattern of uninvolved gastric mucosa of patients with gastric carcinoma and benign gastric disease. *Digestion.* 1976;14(1):20-8. doi: 10.1159/000197796.
208. Wu SG, Zhang WW, Sun JY, Li FY, Lin Q, He ZY. Patterns of Distant Metastasis Between Histological Types in Esophageal Cancer. *Front Oncol.* 2018 Aug 8;8:302. doi: 10.3389/fonc.2018.00302.
209. Wu ZS, Wu Q, Yang JH, Wang HQ, Ding XD, Yang F, Xu XC. Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer. *Int J Cancer.* 2008 May 1;122(9):2050-6. doi: 10.1002/ijc.23337. PMID: 18172859.
210. Xie FJ, Zhang YP, Zheng QQ, Jin HC, Wang FL, Chen M, Shao L, Zou DH, Yu XM, Mao WM. Helicobacter pylori infection and esophageal cancer risk: an updated meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2013 Sep 28;19(36):6098-107. doi: 10.3748/wjg.v19.i36.6098.
211. Xue KS, Tang L, Sun G, Wang S, Hu X, Wang JS. Mycotoxin exposure is associated with increased risk of esophageal squamous cell carcinoma in Huaian area, China. *BMC Cancer.* 2019 Dec 16;19(1):1218. doi: 10.1186/s12885-019-6439-x.
212. Yamaguchi H, Wyckoff J, Condeelis J. Cell migration in tumors. *Curr Opin Cell Biol.* 2005 Oct;17(5):559-64. doi: 10.1016/j.ceb.2005.08.002. PMID: 16098726.
213. Yanagida O, Kanai Y, Chairoungdua A, Kim DK, Segawa H, Nii T, Cha SH, Matsuo H, Fukushima J, Fukasawa Y, Tani Y, Taketani Y, Uchino H, Kim JY, Inatomi J, Okayasu I, Miyamoto K, Takeda E, Goya T, Endou H. Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines.

- Biochim Biophys Acta. 2001 Oct 1;1514(2):291-302. doi: 10.1016/s0005-2736(01)00384-4.
214. Yoon JH, (2015) Benign and Malignant Tumors of the Esophagus. In: Choi, B. (eds) Radiology Illustrated: Gastrointestinal Tract. Radiology Illustrated. Springer, Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-55412-4_3.
215. Yu Y, Liao M, Liu R, Chen J, Feng H, Fu Z. Overexpression of lactate dehydrogenase-A in human intrahepatic cholangiocarcinoma: its implication for treatment. World J Surg Oncol. 2014 Mar 31;12:78. doi: 10.1186/1477-7819-12-78.
216. Zahra K, Dey T, Ashish, Mishra SP, Pandey U. Pyruvate Kinase M2 and Cancer: The Role of PKM2 in Promoting Tumorigenesis. Front Oncol. 2020 Mar 2;10:159. doi: 10.3389/fonc.2020.00159
217. Zaremba-Czogalla M, Hryniewicz-Jankowska A, Tabola R, Nienartowicz M, Stach K, Wierzbicki J, Cirocchi R, Ziolkowski P, Tabaczar S, Augoff K. A novel regulatory function of CDKN1A/p21 in TNF α -induced matrix metalloproteinase 9-dependent migration and invasion of triple-negative breast cancer cells. Cell Signal. 2018 Jul;47:27-36. doi: 10.1016/j.cellsig.2018.03.010.
218. Zeczycki TN, Maurice MS, Attwood PV. Inhibitors of Pyruvate Carboxylase. Open Enzym Inhib J. 2010;3:8-26. doi: 10.2174/1874940201003010008. PMID: 22180764; PMCID: PMC3238542.
219. Zhang Y. Epidemiology of esophageal cancer. World J Gastroenterol. 2013 Sep 14;19(34):5598-606. doi: 10.3748/wjg.v19.i34.5598.
220. Zhao C, Lu X, Bu X, Zhang N, Wang W. Involvement of tumor necrosis factor- α in the upregulation of CXCR4 expression in gastric cancer induced by Helicobacter pylori. BMC Cancer. 2010 Aug 11;10:419. doi: 10.1186/1471-2407-10-419.
221. Zhou B, Zhuang XM, Wang YY, Lin ZY, Zhang DM, Fan S, Li JS, Chen WL. Tumor necrosis factor α induces myofibroblast differentiation in human tongue cancer and promotes invasiveness and angiogenesis via secretion of stromal cell-derived factor-1. Oral Oncol. 2015 Dec;51(12):1095-102. doi: 10.1016/j.oraloncology.2015.08.017.
222. Zhou Z, Bandla S, Ye J, Xia Y, Que J, Luketich JD, Pennathur A, Peters JH, Tan D, Godfrey TE. Cyclin E involved in early stage carcinogenesis of esophageal adenocarcinoma by SNP DNA microarray and immunohistochemical studies. BMC Gastroenterol. 2014 Apr 17;14:78. doi: 10.1186/1471-230X-14-78.