

Received: 2014.07.22
Accepted: 2015.03.18
Published: 2012.07.06

Rola stresu oksydacyjnego w raku pęcherza moczowego

The role of oxidative stress in bladder cancer

Ewa Sawicka¹, Agnieszka Lisowska¹, Paweł Kowal², Anna Długosz¹

¹Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Katedra i Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny

²Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Klinika Urologii i Onkologii Urologicznej, Wydział Lekarski Kształcenia Podyplomowego

Streszczenie

W pracy omówiono wpływ stresu oksydacyjnego i nitracyjnego na szlaki sygnałowe oraz czynniki transkrypcyjne uczestniczące w powstawaniu nowotworów pęcherza. W krajach uprzemysłowionych rak pęcherza moczowego zajmuje czwarte miejsce wśród najczęściej występujących nowotworów złośliwych. Najnowsze badania wskazują na udział stresu oksydacyjnego i nitracyjnego w powstawaniu i rozwoju tej choroby. Zaburzenia oksydacyjno-redukcyjne są charakterystyczne zarówno dla inicjacji, jak i progresji choroby. Obserwowane są zmiany w aktywności czynników transkrypcyjnych, takich jak: czynnik jądrowy NF-κB, AP-1, Nrf2 i STAT3 oraz indukowany hipoksją – HIF-1α. Ponadto, badania wskazują na udział stresu oksydacyjnego w regulacji kaskady MAPK oraz jej zaangażowanie w karcynogenezie obejmującej pęcherz moczowy. Przykładem kinaz należących do rodziny MAPK są kinazy ERK, których ekspresja jest proporcjonalna do stopnia zaawansowania raka pęcherza i jego złośliwości. Tlenek azotu również odgrywa istotną rolę w biologii guzów. Nadmierne wytwarzanie NO może zarówno hamować, jak i sprzyjać rozwojowi guza w zależności od stężenia, czasu działania i mikrośrodowiska nowotworu. Liczne badania wskazują, że nowotwory pęcherza charakteryzują się nasilonym wytwarzaniem NO. Reaktywne formy azotu, podobnie do wolnych rodników tlenowych, mogą powodować oksydacyjne i nitracyjne uszkodzenia DNA, są też zdolne do potranslacyjnej modyfikacji białek. W przeciwieństwie do RFT, których nadmierne wytwarzanie może wynikać m.in. z narażenia na karcynogenne ksenobiotyki, tlenek azotu w dużych stężeniach jest wytwarzany podczas stanu zapalnego. Długotrwała aktywność iNOS odgrywa więc ważną rolę w karcynogenezie związanej z reakcją zapalną, charakterystyczną również dla raka pęcherza moczowego.

Słowa kluczowe:

rak pęcherza • stres oksydacyjny • NO • MAPK • czynniki transkrypcyjne

Summary

The review of the knowledge concerning the impact of oxidative and nitrosative stress on signaling pathways and transcription factors involved in the formation of bladder cancer was prepared. In the industrialized countries, bladder cancer is the fourth most frequently occurring malignant tumors. Recent studies indicate the involvement of oxidative and nitrosative stress in the formation and development of this disease. Red-ox disorders are characteristic for both, the initiation and progression of bladder cancer. There are observed changes in the activity of transcription factors, such as nuclear factor NF-κB; transcription factors: AP-1, Nrf2 and STAT3 and hypoxia-inducible factor HIF-1α. In addition, studies indicate a role for oxidative stress in the regulation of MAPK cascade and its involvement in carcinogenesis consisting bladder. Examples of kinases belonging to the MAPK family are ERK kinases, which expression is proportional to the severity and malignant of bladder cancer. Nitric oxide also plays an important role in tumor biology. Overproduction of NO can both inhibit and promote tumor

	growth, depending on its concentration, duration of action and tumor microenvironment. Numerous studies show that the bladder cancer is characterized by an intensified production of NO. Reactive forms of nitrogen, similar to oxygen free radicals, could cause oxidative and nitrosative damage to DNA and have capacity to post-translational modification of proteins. In contrast to the ROS, which overproduction result from exposure to carcinogenic xenobiotic, nitrogen oxide in high level is produced during inflammation. Sustained iNOS activity therefore plays an important role in carcinogenesis associated with the inflammatory response, characteristic also for bladder cancer.
Keywords:	bladder cancer • oxidative stress • NO • MAPK • transcription factors
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1160361
Word count:	3435
Tables:	–
Figures:	1
References:	40

Adres autorki: Ewa Sawicka, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Katedra i Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny, ul. Borowska 211; e-mail: ewa.sawicka@umed.wroc.pl

Wykaz skrótów: **4-HHE** – 4-hydroksyheksenal; **8-OHdG** – 8-hydroksydeoksyguanozyna; **AP-1** – czynnik transkrypcyjny (activator protein 1); **Bcl-2** – grupa białek regulacyjnych; **C→T** – cytozyna→tymidyna (mutacja typu tranzycji); **c-myc** – czynnik transkrypcyjny regulujący cykl komórkowy; **COX-2** – cyklooksygenaza 2; **ERK** – kinazy należące do rodziny MAPK (extracellular signal-regulated kinases); **G** – stopień zróżnicowania (złośliwości) raka (grade); **G→T** – guanozyna→tymidyna (mutacja typu transwersji); **HIF-1α** – czynnik 1α indukowany hipoksją (hypoxia inducible factor 1α); **IκBα** – białko wiążące NF-κB; **IL-1α** – interleukina 1α; **IL-6** – interleukina 6; **iNOS** – indukowalna syntaza tlenku azotu; **MAPK** – kinazy białkowe aktywowane przez miogeny (mitogen-activated protein kinases); **MDA** – malonyldialdehyd; **MMP-9** – metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 9; **MVD** – gęstość drobnych naczyń krwionośnych; **NF-κB** – czynnik jądrowy kappa B (nuclear factor kappa B); **NO** – tlenek azotu; **Nrf2** – czynnik transkrypcyjny (nuclear factor NF-E2-related factor); **O₂^{•-}** – anionorodnik ponadtlenkowy; **OH** – rodnik hydroksylowy; **RAS** – rodzina onkogenów; **RFA** – reaktywne formy azotu; **RFT** – reaktywne formy tlenu; **ROS** – reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species); **STAT3** – czynnik transkrypcyjny (signal transducer and activator of transcription 3); **TNF-α** – czynnik martwicy nowotworu (Tumor Necrosis Factor); klasyfikacja **TNM** – guz pierwotny (Tumor), przerzuty do węzłów chłonnych (Node), przerzuty odległe (Metastasis); **TP53** – gen supresorowy kodujący białko TP53; **TXA₂** – tromboksan A₂; **VEGF** – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń.

WPROWADZENIE

W krajach przemysłowych rak pęcherza moczowego zajmuje 4 miejsce wśród najczęściej występujących nowotworów złośliwych, stanowi prawie 6% wszystkich raków [10]. Charakterystyczne są częste nawroty, mimo całkowitej resekcji guza pojawia się ponownie u 75% pacjentów. Wskaźnik 5-letnich przeżyć wynosi około 57%. W 2012 r. odnotowano na świecie prawie 430 tysięcy nowych zachorowań na raka pęcherza moczowego, był przyczyną śmierci ponad 165 tysięcy osób [22,39].

Rak pęcherza moczowego jest nowotworem, w którego powstawaniu największą rolę przypisuje się wieloletniemu narażeniu na środowiskowe czynniki ryzyka, takie jak: palenie tytoniu, ekspozycja na substancje chemiczne

związane z wykonywanym zawodem czy arsen. Metabolizm tych ksenobiotyków wiąże się z wytwarzaniem wolnych rodników tlenowych. Najnowsze badania wskazują na udział stresu oksydacyjnego i nitracyjnego w powstawaniu raka pęcherza moczowego. Zaobserwowano m.in. obecność w moczu produktów reakcji reaktywnych form tlenu/reaktywnych form azotu (RFT/RFA) z makromolekułami komórkowymi, podwyższone stężenie tlenku azotu, obniżone antyoksydantów niskocząsteczkowych, czy zmienioną aktywność enzymów antyoksydacyjnych u pacjentów z rakiem pęcherza moczowego [34].

Stężenie malonyldialdehydu (MDA) w surowicy pacjentów, u których wystąpił rak o niskiej złośliwości było prawie 3-krotnie niższe niż w przypadku raków o wysokiej złośliwości [2].

Udział stresu oksydacyjnego w rozwoju raka polega m.in. na podtrzymywaniu mikrośrodowiska zapalnego sprzyjającego nasilonej proliferacji komórek nowotworowych. RFT wykazują także wpływ na onkogenne szlaki sygnałowe komórki przez modulację aktywności elementów wrażliwych na utlenianie (receptorów, kinaz białkowych i czynników transkrypcyjnych). U pacjentów z przejściowokomórkowym rakiem pęcherza obserwowano nadmierne wytwarzanie czynnika jądrowego kappa B (NF- κ B) oraz wykazano związek między jego obecnością w jądrze komórkowym a stopniem zaawansowania klinicznego i złośliwością nowotworu [22]. Podobnie czynnik 1 α indukowany hipoksją (HIF-1 α) przejawia nadekspresję u chorych z rakiem pęcherza z dodatnią korelacją między immunoreaktywnością HIF-1 α a stopniem zaawansowania guza [7].

Wolne rodniki odgrywają rolę we wszystkich etapach karcynogenezy. W czasie inicjacji: RFT, RFA, a także produkty zainicjowanej przez nie peroksydacji lipidów uszkadzają DNA, prowadząc do mutacji. Podczas drugiego etapu karcynogenezy – promocii – wolne rodniki przyczyniają się do nieprawidłowej ekspresji genów, blokowania komunikacji międzykomórkowej i modyfikacji systemów przekazywania sygnałów, nasilając proliferację i hamując apoptozę w populacji komórek, które przeszły etap inicjacji. Stres oksydacyjny uczestniczy także w progresji nowotworu przez generowanie dalszych mutacji w DNA zainicjowanych komórek [34].

STRES OKSYDACYJNY W INICJACJI RAKA PĘCHERZA MOCZOWEGO

Integralność i stabilność genomu warunkuje prawidłowe funkcjonowanie komórek. Modyfikacje DNA prowadzące do trwałej mutacji stanowią pierwszy etap karcynogenezy [34,40]. Jedną z najczęstszych przyczyn uszkodzeń DNA są wolne rodniki reagujące zarówno z jądrowym, jak i mitochondrialnym materiałem genetycznym. Mitochondrialny DNA (mtDNA) jest szczególnie narażony na atak wolnych rodników ze względu na brak białek histonowych oraz sąsiedztwo łańcucha oddechowego. Uszkodzenia mtDNA potęgują stres oksydacyjny, gdyż wywołują dysfunkcję łańcucha oddechowego i zwiększają wytwarzanie rodnika hydroksylowego [34]. Ponadto mtDNA koduje białka zaangażowane w procesy fosforylacji, a jego uszkodzenie wpływa na kaskady sygnałowe zwiększające wytwarzanie wolnych rodników. Jak dotąd, zidentyfikowano ponad sto produktów reakcji wolnych rodników z genomem. Oksydacyjne uszkodzenia DNA mogą mieć charakter m.in. przerwania pojedynczej lub podwójnej nici DNA, modyfikacji zasad purynowych i pirymidynowych, a także tworzenia nieprawidłowych wiązań krzyżowych między niemi DNA lub między DNA a białkami. Zmiany te mogą być przyczyną błędów podczas replikacji i niestabilności genomu [9].

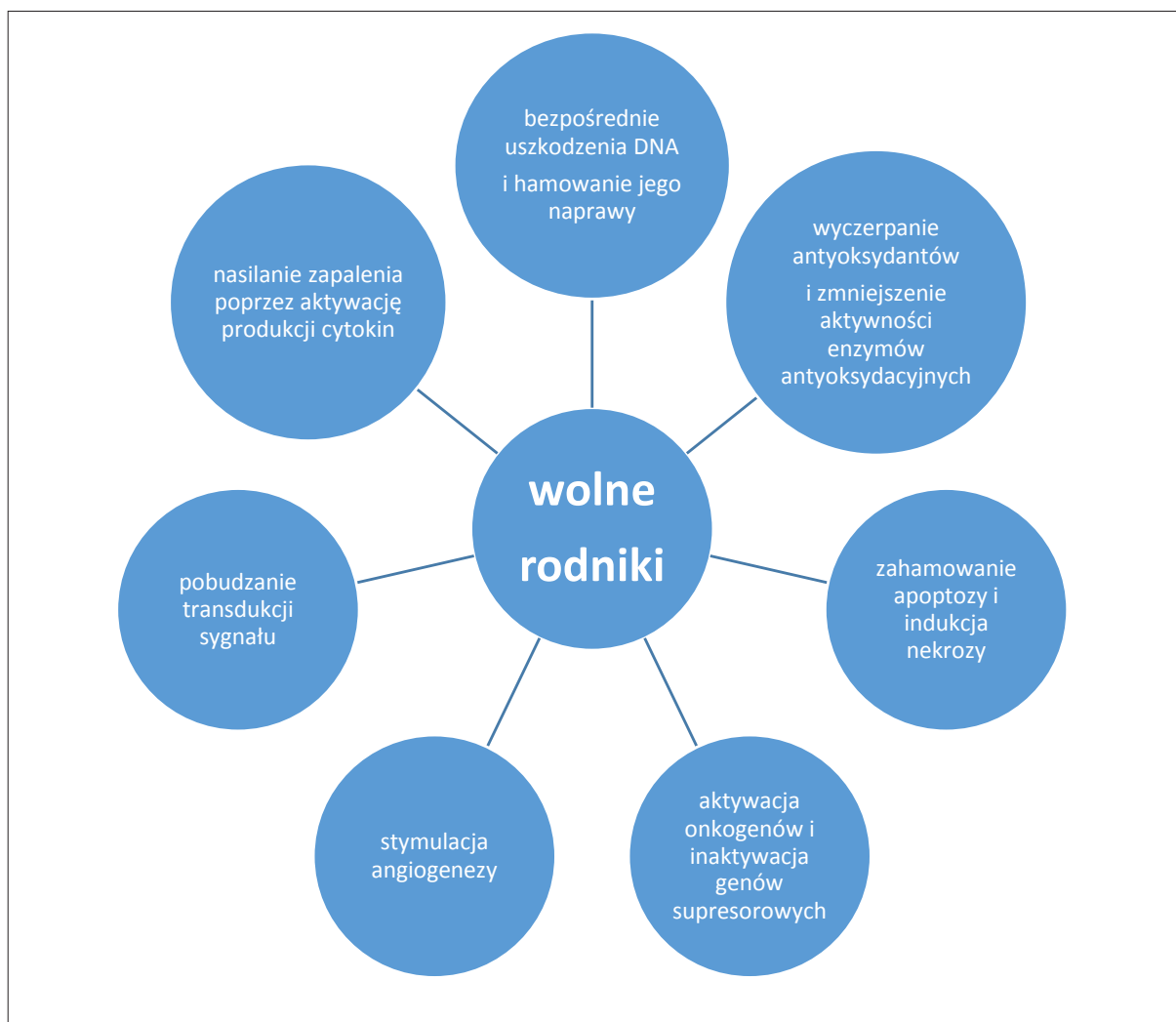
Największy udział w uszkodzeniach oksydacyjnych DNA ma rodnik hydroksylowy. Nadtlenek wodoru (H₂O₂) nie reaguje bezpośrednio z DNA, ale może przenikać przez błonę do jądra komórkowego, gdzie ulega reakcji Fen-

tona z wytworzeniem rodnika hydroksylowego [34]. Przykładem produktu oksydacyjnej modyfikacji DNA jest 8-hydroksydeoksyguanozyna (8-OHdG), uważana za biologiczny marker stresu oksydacyjnego. Zmiana jest potencjalnie mutagenna, może prowadzić do transwersji G→T (guanina-tymina). Ten typ mutacji występuje w onkogenie RAS i genie supresorowym TP53 [25]. Chiou i wsp. w badaniu obejmującym 15 chorych wykazali, że w moczu pacjentów cierpiących na raka pęcherza stężenie 8-hydroksydeoksyguanozyny (8-OHdG) jest podwyższone (średnio 70,5 ng/mg kreatyniny) w porównaniu do osób zdrowych (36,1 ng/mg kreatyniny) [5]. Natomiast w analizie większej grupy pacjentów z rakiem pęcherza (31 mężczyźni i 14 kobiet) wykazano, że stężenie 8-OHdG wydalanej z moczem było niemal dwa razy większe w grupie osób z guzem pęcherza (8,12 ng/g kreatyniny) niż w grupie kontrolnej (4,13 ng/g kreatyniny). Ponadto większe stężenia 8-OHdG obserwowano w rakach o wyższym stopniu złośliwości (słabiej zróżnicowanych histologicznie) [27].

Poza bezpośrednim atakiem RFT lub RFA, modyfikacje kwasów nukleinowych mogą być spowodowane działaniem produktów peroksydacji lipidów zdolnych do tworzenia adduktów z DNA [9]. Ostatnie badania potwierdzają występowanie nasilonej peroksydacji lipidów u pacjentów z rakiem pęcherza moczowego. Najczęściej stosowanymi markerami tego procesu są dialdehyd malonylowy (MDA) i 4-hydroksynonenal (4-HNE). Gecit i wsp. ocenili stężenie MDA w surowicy 35 pacjentów w rakiem pęcherza, uzyskując wartość 16,8 nmol/mL, istotnie statystycznie wyższą niż w grupie kontrolnej (9,1 nmol/mL) [12]. Nie zaobserwowano jednak korelacji stężenia MDA z potencjałem złośliwości guza. Wyniki analizy obejmującej większą grupę badaną (50 osób) przeprowadzonej przez Badjatę i wsp. sugerują eskalację procesu peroksydacji lipidów w bardziej zaawansowanych klinicznie przypadkach raka pęcherza [2]. Średnie stężenie MDA w surowicy pacjentów z powierzchownym rakiem pęcherza o niskiej złośliwości wyniosło ~ 6 nmol/mL, natomiast w przypadku nieinwazyjnych raków o wysokiej złośliwości wartość ta wzrosła prawie do 16 nmol/mL. W guzach pęcherza naciekających tkankę mięśniową było najwyższe stężenie badanego markera peroksydacji – ~ 24 nmol MDA/mL surowicy. Dane te wskazują, iż produkty peroksydacji lipidów mogą brać udział nie tylko w inicjacji raka pęcherza (przez uszkodzenia DNA), ale i w kolejnych etapach nowotworzenia, sprzyjając dalszym modyfikacjom prowadzącym do nabycia przez komórki raka pęcherza zdolności inwazji. Skutki działania wolnych rodników istotne w procesie karcynogenezy przedstawia ryc.1

STRES OKSYDACYJNY W PROMOCJI RAKA PĘCHERZA MOCZOWEGO

Wolne rodniki tlenowe (H₂O₂ i O₂⁻) mogą pełnić funkcję wtórnych przekazywaczy w ścieżkach sygnalizacyjnych komórek. Regulują procesy, takie jak: proliferacja, apoptoza, angiogeneza, wytwarzanie cytokin i cząsteczek adhezyjnych. Kierunek działania RFT jest zależny



Ryc. 1. Rola wolnych rodników w karcynogenezie (wg [9] zmodyfikowano)

od ich stężenia. Na przykład ilość H_2O_2 w komórce w warunkach fizjologicznych mieści się w przedziale 5-50 nM. Jeśli jego stężenie wzrośnie, lecz nie przekroczy 0,7 mM, uruchomi to nasilony wzrost i proliferację komórki. Wyższe stężenia H_2O_2 prowadzą do śmierci komórki w wyniku apoptozy (1-3 mM) lub nekrozy (>3 mM) [34]. Siedmiodniowa ekspozycja linii komórkowych urothelium na H_2O_2 spowodowała formowanie się kolonii transformowanych komórek, które po wstrzyknięciu myszom utworzyły nowotwory przejściowokomórkowe o wysokim stopniu złośliwości. Ponadto zaaplikowanie cytokin (IL-1 α , IL-6 oraz TNF- α) na utworzone kolonie objawiało się nasiloną proliferacją w porównaniu do komórek, które nie przeszły transformacji. Doświadczenie to potwierdza zdolność H_2O_2 do indukcji karcynogenezy oraz udział stanu zapalnego w nasilaniu proliferacji komórek [26].

Reaktywne formy tlenu są silnymi czynnikami utleniającymi, dzięki czemu mogą wpływać na potencjał redoks komórki. Właściwość ta warunkuje zdolność RFT do nasilania proliferacji komórek, gdyż zmiany stanu

redoks wewnątrz komórki modulują aktywność wrażliwych na utlenianie elementów ścieżek sygnałowych (m.in. receptorów, kinaz białkowych i czynników transkrypcyjnych) przenoszących do jądra komórkowego sygnał do podziału [11,34].

WPLYW STRESU OKSYDACYJNEGO NA KASKADY SYGNAŁOWE W RAKU PĘCZERZA

Głównym mechanizmem przekazywania informacji wewnątrz komórki jest odwracalna fosforylacja kinaz białkowych powodująca ich aktywację. Zaktywowana kinaza fosforyluje kinazę znajdującą się poniżej w szlaku sygnalizacyjnym. Kaskada kinaz kończy się fosforylacją czynników transkrypcyjnych regulujących ekspresję genów związanych z losami komórki [38].

Wolne rodniki ingerują w kaskady kinaz przez utlenianie grup tiolowych reszt cysteinowych wchodzących w skład kinaz i fosfataz białkowych. Fosfatazy są enzymami usuwającymi resztę fosforanową z cząsteczek kinaz białkowych, powodując ich przejście w stan nieaktywny

i przerwanie kaskady sygnałowej. Wykazano, iż ekspozycja fosfatyz tyrozynowych na mikromolarnie stężenia H_2O_2 utlenia reszty cysteinowe (Cys-SH → Cys-SOH) znajdujące się w centrum aktywnym enzymu, a przez to jego inaktywację. Zablokowanie aktywności fosfatyz nadaje przewagę postaci ufosforylowanej kinaz i ich permanentnej aktywności sygnalizacyjnej. Stres oksydacyjny może także bezpośrednio wpływać na kinazy białkowe. Utlenianie reszt cysteinowych z utworzeniem mostków disulfidowych jest niezbędne do aktywacji niektórych kinaz białkowych [1,11,13]. Stres oksydacyjny wpływa więc na pobudzenie transdukcji sygnału komórkowego przez nasilenie fosforylacji białek. Khadjavi i wsp. przedstawili wyniki badań świadczące o intensywnych procesach fosforylacji w raku pęcherza [17]. Analiza tkanki nowotworowej 66 pacjentów wykazała obecność 24 fosfoprotein, a ich stężenie w moczu chorych było 5-krotnie wyższe niż w grupie kontrolnej.

Jednym z głównych szlaków sygnałowych zaangażowanych w przekazywanie sygnałów onkogennych jest kaskada MAPK (mitogen-activated protein kinases). Badania wskazują na udział stresu oksydacyjnego w regulacji tej ścieżki sygnałowej oraz na jej zaangażowanie w karcynogenezę obejmującą pęcherz moczowy. Przykładem kinaz należących do rodziny MAPK są kinazy ERK (extracellular signal-regulated kinases). Aktywna (ufosforylowana) postać ERK aktywuje czynniki transkrypcyjne regulujące ekspresję genów związanych ze wzrostem i podziałami komórek [38]. Karlou i wsp. za pomocą barwienia immunohistochemicznego 152 preparatów tkankowych wykazali nadmierne wytwarzanie kinaz ERK u pacjentów w rakiem pęcherza [16]. Ekspresja ERK była proporcjonalna do stopnia zaawansowania raka i jego złośliwości. Informacji na temat wpływu stresu oksydacyjnego indukowanego związkami arsenu na fosforylację i aktywność kinazy ERK dostarczyły badania Wang i wsp. [36]. 24-godzinna ekspozycja linii komórkowej ludzkiego nabłonka urotelialnego na metaarsenit sodu ($NaAsO_2$) spowodowała istotnie statystycznie zwiększenie wytwarzania wolnych rodników, któremu towarzyszył znaczny wzrost ufosforylowanej postaci kinazy ERK.

WPLYW STRESU OKSYDACYJNEGO NA AKTYWNOŚĆ CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH W RAKU PĘCHERZA

Stan oksydacyjno-redukcyjny komórki wpływa także na czynniki transkrypcyjne regulujące ekspresję genów odpowiedzialnych za proliferację lub śmierć komórki [34]. Do czynników transkrypcyjnych wrażliwych na stres oksydacyjny należą m.in.: NF- κ B, AP-1, STAT3, HIF-1 α czy Nrf2 [20].

Czynnik jądrowy kappa B

NF- κ B (nuclearfactor kappa B) reguluje ekspresję setek genów zaangażowanych m.in.: we wzrost komórki, proliferację, różnicowanie, a także odpowiedź na czynniki stresowe i zapalne oraz apoptozę. NF- κ B jest utrzymy-

wany w cytoplazmie dzięki wiązaniu w nieaktywny kompleks z białkiem I κ B α . Czynniki oksydacyjne i prozapalne aktywują NF- κ B przez reakcję fosforylacji i degradację I κ B α w proteasomach, ułatwiając w ten sposób akumulację NF- κ B w jądrze komórkowym. Po translokacji do jądra komórkowego NF- κ B wiąże się z regionami promotorowymi genów kodujących m.in.: białka biorące udział w odpowiedzi zapalnej: iNOS, COX-2, fosfolipaza A2, ponadto czynniki wzrostu (np. VEGF), cząsteczki adhezyjne, regulatory apoptozy (np. Bcl-2), czynniki transkrypcyjne (np. c-myc), enzymy proteolityczne (np. MMP-9) [20,29]. Kliniczne znaczenie poziomu NF- κ B w raku pęcherza moczowego oceniali Levidou i wsp., gdzie materiałem badawczym były preparaty tkankowe od 116 pacjentów z przejściowokomórkowym rakiem pęcherza. Barwienie immunohistochemiczne wykazało nadmierne wytwarzanie NF- κ B w 113 (97%) przypadkach, przy czym w większości był umiejscowiony w jądrach komórek nowotworowych. We wszystkich preparatach limfocyty naciekające guz nowotworowy prezentowały obecność czynnika jądrowego kappa B. Autorzy wykazali także związek między obecnością NF- κ B w jądrze komórkowym a stopniem zaawansowania klinicznego (wg klasyfikacji TNM) oraz stopniem złośliwości histologicznej nowotworu (tumor grade). Badania wskazują na znaczenie stężenia NF- κ B jako jednej z możliwych przyczyn oporności na chemio- i radioterapię [21,22]. Koga i wsp. wykazali, iż dotyczy to także raka pęcherza moczowego [19]. U 35 chorych wykonano biopsję, a w uzyskanych próbkach guzów pęcherza oznaczono immunoreaktywność białka NF- κ B. Następnie pacjentów poddano chemioradioterapii, a w dalszej kolejności – cystektomii. Wycięte guzy oceniono pod kątem skuteczności przeprowadzonej chemioradioterapii skorelowano z immunoreaktywnością NF- κ B. Analiza statystyczna wykazała, iż NF- κ B jest jednym z niezależnych czynników ryzyka oporności raka pęcherza na chemioradioterapię.

Czynnik transkrypcyjny AP-1

Większość genów kodujących białka prozapalne ma miejsca wiążące czynnik transkrypcyjny AP-1 (activator protein 1). AP-1 jest aktywowany pod wpływem stresu oksydacyjnego głównie przez ścieżkę sygnałową kinazy MAP. Indukcja AP-1 zwiększa wytwarzanie cytokin, COX-2, iNOS. Drobnia i wsp. wykazali nasiloną aktywność czynnika AP-1 w ludzkich komórkach epitelialnych pęcherza moczowego po krótkotrwałej ekspozycji na organiczne lub nieorganiczne związki arsenu [8]. Prawdopodobny mechanizm polega na zwiększonym wytwarzaniu wolnych rodników tlenowych.

Czynnik transkrypcyjny STAT3

Podobnie jak w przypadku poprzednich czynników transkrypcyjnych, STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) jest aktywowany w odpowiedzi na czynniki prooksydacyjne i prozapalne, takie jak cytokiny czy promieniowanie UVB. Odbywa się to poprzez fosfory-

lację reszty tyrozynowej i utworzenie dimeru. Aktywny czynnik przemieszcza się do jądra komórkowego i wiąże z regionami promotorowymi genów kodujących białka prozapalne i regulujące cykl komórkowy. Analiza tkanki nowotworowej pochodzącej od 36 pacjentów chorych na raka pęcherza wykazała nasiloną ekspresję genu *STAT3* w 75% przypadków oraz zwiększoną aktywację produktu białkowego tego genu – czynnika transkrypcyjnego *STAT3* [6]. Badania na komórkach ludzkiego raka pęcherza (linia komórkowa T24) wykazują wpływ czynnika *STAT3* na proliferację komórek nowotworowych. Wyciszenie genu *STAT3* za pomocą małych interferencyjnych RNA spowodowało osłabienie proliferacji komórek T24. Autorzy potwierdzili te obserwacje na modelu *in vivo* – na mysich rakach pęcherza [40]. Podobny wynik na linii komórkowej T24 uzyskali Bednarek i wsp., którzy oprócz zmniejszenia proliferacji wykazali indukcję apoptozy w komórkach guza [3]. Dane te świadczą o tym, iż sygnalizacja komórkowa przez *STAT3* ma znaczenie w rozwoju raka pęcherza moczowego.

Czynniki transkrypcyjne często kooperują w podtrzymywaniu stanu zapalnego w mikrośrodowisku guza. Na przykład aktywny czynnik *STAT3* w komórkach rakowych przedłuża utrzymywanie się NF- κ B w jądrze komórkowym. Uwalniana pod wpływem NF- κ B interleukina 6 aktywuje *STAT3* w komórkach rakowych [6,20].

Czynnik 1 α indukowany hipoksją (HIF-1 α)

Czynniki transkrypcyjne rodziny HIF (hypoxia inducible factor) regulują homeostazę tlenową komórki, odgrywają główną rolę w podtrzymywaniu stanu zapalnego i indukowaniu angiogenezy. Regulują ponadto procesy adaptacyjne komórki w warunkach hipoksji: erytropozę, glikolizę, a także proliferację komórki [20]. Pialoux i wsp. potwierdzili udział wolnych rodników w indukcji ekspresji genu HIF-1 α [28]. Narażono 5 zdrowych mężczyzn na 12-godzinną hipoksję. W tym czasie monitorowano w osoczu krwi markery stresu oksydacyjnego: stężenie zaawansowanych produktów oksydacji białek (AOPP) i 8-hydroksydeoksyguanozyny (8-OHdG), a także białek, wytwarzanie zależy od HIF-1 α – erytropoetyny (EPO) i czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF). Jednocześnie mierzono poziom transkryptu genu HIF-1 α w leukocytach. Wykazano korelację między markerem oksydacyjnego uszkodzenia DNA (8-OHdG) i poziomem ekspresji HIF-1 α , a także między wytwarzaniem EPO i poziomem markerów stresu oksydacyjnego. Badania potwierdzają paradoksalny wzrost wytwarzania RFT podczas hipoksji oraz ich wpływ na ekspresję HIF-1 α .

Nadekspresja HIF jest obserwowana w wielu rodzajach nowotworów [20]. Badania immunoreaktywności HIF-1 α w 144 próbkach tkanki nowotworowej uzyskanej od pacjentów chorych na raka pęcherza wykazały nadekspresję genu *HIF-1 α* w 57% przypadków. Większą immunoreaktywność HIF-1 α miały tkanki raków słabo zróżnicowanych histologicznie, naciekających mięśnie oraz raki *in situ* [29]. Podobne wyniki uzyskali Deniz

i wsp., którzy przeanalizowali wytwarzanie HIF-1 α w 70 przypadkach raka pęcherza [7]. W badaniu 29% próbek wykazano duże wytwarzanie HIF-1 α w tkance nowotworowej, natomiast 71% małe lub brak. Wykazano istotną statystycznie pozytywną korelację między immunoreaktywnością HIF-1 α a stopniem zaawansowania guza oraz negatywną w odniesieniu do stopnia zróżnicowania histologicznego nowotworu. Ponadto poziom wytwarzania HIF-1 α korelował z markerami angiogenezy: ekspresją czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF) oraz gęstością drobnych naczyń krwionośnych (MVD).

Czynnik transkrypcyjny Nrf2

Czynnikiem transkrypcyjnym wrażliwym na zmiany stanu redoks komórki jest Nrf 2 (nuclear factor NF-E2-related factor). W odpowiedzi na umiarkowany stres oksydacyjny wiąże się z regionami promotorowymi genów kodujących enzymy antyoksydacyjne, np. z dysmutazą ponadtlenkową (SOD) czy transferazą glutationową (GST) i nasila ich ekspresję. Czynnikiem Nrf 2 wykazuje więc właściwości ochronne przeciw uszkodzeniom spowodowanym stresem oksydacyjnym i zapobiega karcynogenezie. Utrata funkcji Nrf2 pogarsza oksydacyjne uszkodzenia tkanek, nasila stan zapalny i promuje karcynogenezę [20]. W celu poznania wpływu indukowanego stresem oksydacyjnym czynnika Nrf 2 w rozwoju raku pęcherza poddano myszy pozbawione genu kodującego ten czynnik działaniu karcynogenu – *N*-nitrozobutylo(4-hydroksybutylo)aminy (BBT) przez 8 tygodni. Rak pęcherza wystąpił u 63% myszy pozbawionych Nrf 2, natomiast w przypadku myszy niezmutowanych – w 38%. Wynik dowodzi, że czynnik Nrf 2 wykazuje działanie ochronne przeciw rozwojowi raka pęcherza indukowanego BBT [14]. Badania Wanga i wsp. przeprowadzono na liniach ludzkich komórek urothelium (UROtsa), w których zmniejszono ekspresję genu Nrf2 o 30-50%, przez wprowadzenie małych interferencyjnych RNA. Próbkę poddano następnie działaniu związków arsenu. Komórki urothelium o wyciszonym genie Nrf2 okazały się bardziej wrażliwe na związki As w porównaniu do komórek o niezmięnionej ekspresji genu Nrf2 [37].

Aktywacja Nrf2 może ułatwiać rozrost guza, a jednym z mechanizmów tłumaczących to zjawisko jest zwiększanie przeżycia komórek raka dzięki ochronnemu działaniu antyoksydantów. Ponadto nasilenie przez Nrf2 transkrypcji genów kodujących białka oporności wielolekowej skutkuje wyrzucaniem chemioterapeutyków poza komórkę i nieskutecznością leczenia [20].

STRES NITRACYJNY W RAKU PĘCHERZA MOCZOWEGO

Tlenek azotu (NO) – prekursor pozostałych reaktywnych form azotu – odgrywa istotną rolę w biologii guzów. Dotychczasowe badania wskazują, że stężenie NO rośnie w przebiegu nowotworów. Liczne badania wykazały, że również nowotwory pęcherza charakteryzują się nasilonym wytwarzaniem NO. Gecid i wsp. oznaczyli stężenie

NO w surowicy 35 pacjentów z guzem pęcherza moczowego [12]. Średnie stężenie w grupie badanej wyniosło 17,1 mmol/L surowicy i było wyższe niż w grupie kontrolnej (8,1 mmol/L). Autorzy nie zaobserwowali jednak korelacji między koncentracją NO a stopniem złośliwości guza. Kilic i wsp. porównali stężenie NO w surowicy 20 chorych przed i po leczeniu operacyjnym [18]. Średnie przedoperacyjne stężenie NO wyniosło 61,3 mmol/L surowicy i było wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej (26,6 mmol/L). Stężenie NO zmierzone u pacjentów miesiąc po leczeniu chirurgicznym obniżyło się istotnie (30,1 mmol/L, $p=0,0001$) w porównaniu ze stanem przedoperacyjnym, a jego średnia wartość nie różniła się statystycznie od stężenia w grupie kontrolnej.

Konstitutywne postaci NOS wytwarzają niskie, nanomolowe stężenia NO odgrywające niezbędną, fizjologiczną rolę w przekazywaniu sygnału komórkowego [20]. Czynniki prozapalne, takie jak cytokiny, endotoksyny bakteryjne, NF- κ B zwiększają biosyntezę iNOS w komórkach zapalnych, co generuje duże (rzędu mikromoli) ilości tlenu azotu – głównego mediatora odpowiedzi zapalnej. Nadmierne wytwarzanie NO może zarówno hamować, jak i promować rozwój guza w zależności od stężenia, czasu działania i mikrośrodowiska nowotworu [4,25,33,35].

W przeciwieństwie do ROS, których nadmierne wytwarzanie może wynikać m.in. z narażenia na karcynogenne związki chemiczne czy dysfunkcji łańcucha oddechowego, NO w dużych stężeniach jest wytwarzany jedynie podczas stanu zapalnego. Długotrwała aktywność iNOS odgrywa więc ważną rolę w karcynogenezie związanej z reakcją zapalną. Sandes i wsp. w badaniu obejmującym 64 guzy pochodzące od pacjentów z nowotworem pęcherza wykazali ekspresję i aktywność iNOS w prawie 50% przypadków [31]. Ponadto w ciągu 2 lat nawroty obserwowano u 80% pacjentów z dodatnim wynikiem iNOS, natomiast w grupie iNOS-ujemnej jedynie u 27%.

Reaktywne formy azotu, podobnie do wolnych rodników tlenowych, mogą bezpośrednio uszkadzać molekułę DNA, a jednocześnie hamować jego naprawę [20,24,32]. Wysoce reaktywny nadtlenoazotyn, należący do RFT, powoduje oksydacyjne i nitracyjne modyfikacje DNA, których produktami są m.in. 8-nitroguanina i 8-okso-7,8-dihydro-2'-deoksyguanina (8-oxodG). 8-nitroguanina ulega spontanicznej depurynacji, pozostawiając miejsce w DNA pozbawione zasady azotowej (miejsce apurynowe). Podczas replikacji może zostać wprowadzona mutacja, np. jeśli „parę” z miejscem apurynowym utworzy adenina doprowadzi to do transwersji $G \rightarrow T$. Ma i wsp. zaobserwowali występowanie obu produktów oksydacji DNA w komórkach nowotworowych i zapalnych w obrębie guza u pacjentów z rakiem pęcherza związanym z zakażeniem przywrą krwi [23]. Lokalizacja jądrowa była wspólna dla obu markerów, natomiast 8-nitroguanina występowała ponadto w cytoplazmie, co sugeruje jej tworzenie zarówno w DNA, jak i w RNA. W zdrowych komórkach urothelium nie zaobserwowano tworzenia się omawianych modyfikacji guaniny.

Wolne rodniki azotowe mają zdolność potranslacyjnej modyfikacji białek. Powodują nitrowanie i S-nitrozylację reszt aminokwasowych kinaz białkowych i czynników transkrypcyjnych przyczyniając się do ich inaktywacji. Oddziałując z resztami tyrozynowymi białek RNS, prowadzą do powstania nitrotyrozyny, która jest znakiem rozpoznawczym nitracyjnego uszkodzenia białek. Modyfikacje ważnych dla komórki białek zaburza przekazywanie sygnału, hamowanie apoptozy i promowanie proliferacji komórek. Jednym z mechanizmów ucieczki komórek nowotworowych przed apoptozą jest zwiększona S-nitrozylacja białek. Przykładem hamowania apoptozy przez NO jest inaktywacja kaspazy 9 przez S-nitrozylację. Tlenek azotu modyfikuje również aktywność białka p53 – produktu genu supresorowego. Białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym uruchamiającym biosyntezę białek odpowiedzialnych za apoptozę. NO powoduje akumulację i modyfikacje potranslacyjne (nitrowanie tyrozyny, S-nitrozylację) białka p53 i w konsekwencji zahamowanie jego wiązania z DNA. NO może także regulować funkcję białka p53 przez S-nitrozylację reszty cysteinowej białka Hdm2. Hdm2 wiąże p53, dając sygnał do jego degradacji w proteasomie. Nitrozylacja Hdm2 blokuje jego funkcję, prowadząc do kumulacji p53. NO przez stymulację EGF (czynnika wzrostu śródbłonka naczyń) przyczynia się także do nasilonej angiogenezy, która warunkuje dostarczanie składników odżywczych do tkanki guza i powiększanie jego rozmiarów [20,25]. U osób z podwyższonym stężeniem NO wykryto także większą gęstość mikronaczyń [24]. Nadmierne wytwarzanie iNOS ponadto koreluje z przejściem w bardziej zaawansowane stadia raka pęcherza. Sandes i wsp. ocenili aktywność iNOS na liniach komórkowych inwazyjnych i nieinwazyjnych mysich guzów pęcherza oraz w preparatach pochodzących od pacjentów z rakiem pęcherza [32]. W każdym z przypadków wykazano związek między występowaniem iNOS w tkance guza i progresją do postaci inwazyjnych. Rola NO w rozwoju nowotworów pęcherza wskazuje, iż jego zablokowanie może działać terapeutycznie. Wstępne badania przeprowadzone na liniach komórkowych przez Belgorosky'ego i wsp. wykazały zmniejszenie wzrostu guzów wytwarzających iNOS po zablokowaniu tlenu azotu [4]. Obecny w dużych stężeniach NO wykazuje jednak właściwości cytotoksyczne i wyzwala śmierć komórek nowotworowych, dlatego potencjalne zastosowanie inhibitora tlenu NO w terapii raka pęcherza wymaga dalszych badań.

PODSUMOWANIE

Ostatnie lata poszerzyły wiedzę na temat biologii guzów, w tym guzów pęcherza moczowego. Liczne publikacje wskazują na rolę stresu oksydacyjnego w rozwoju raka pęcherza. Badanie mechanizmów zaangażowanych w rozwój guza pęcherza może posłużyć do sformułowania strategii chemioprewencji nowotworów pęcherza moczowego oraz wytyczenia kierunków dalszych badań. Produkty peroksydacji lipidów mogą brać udział nie tylko w inicjacji raka

pęcherza (przez uszkodzenia DNA), ale i w kolejnych etapach nowotworzenia, sprzyjając dalszym modyfikacjom prowadzącym do nabycia przez komórki raka pęcherza zdolności inwazji. Potencjał redoks komórki wpływa na czynniki transkrypcyjne regulujące ekspresję genów odpowiedzialnych za proliferację lub śmierć komórki. Do czynników transkrypcyjnych wrażliwych na stres oksydacyjny należą m.in. NF- κ B, AP-1, STAT3, HIF-1 α czy Nrf2. Czynniki transkrypcyjne często uczestniczą w podtrzymywaniu stanu zapalnego w mikrośrodowisku guza. Na przykład

aktywny czynnik STAT3 w komórkach rakowych przedłuża utrzymywanie się NF- κ B w jądrze komórkowym. Uwalniana pod wpływem NF- κ B interleukina 6 aktywuje natomiast STAT3 w komórkach rakowych.

Tlenek azotu – prekursor pozostałych reaktywnych form azotu – odgrywa również istotną rolę w biologii guzów. Dotychczasowe badania wskazują, że stężenie NO rośnie w przebiegu nowotworów. Liczne badania wykazały, że również nowotwory pęcherza charakteryzują się nasilonym wytwarzaniem NO.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Antico Arciuch V.G., Alippe Y., Carreras M.C., Poderoso J.J.: Mitochondrial kinases in cell signaling: facts and perspectives. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2009; 61: 1234-1249
- [2] Badjatia N., Satyam A., Singh P., Seth A., Sharma A.: Altered antioxidant status and lipid peroxidation in Indian patients with urothelial bladder carcinoma. *Urol. Oncol.*, 2010; 28: 360-367
- [3] Bednarek I., Sypniewski D., Gawlik N., Galilejczyk A., Goras K.: The efficiency of silencing expression of the gene coding STAT3 transcriptional factor and susceptibility of bladder cancer cells to apoptosis. *Contemp. Oncol.*, 2012; 16: 316-321
- [4] Belgorosky D., Langle Y., Prack Mc Cormick B., Colombo L., Sandes E., Eijan A.M.: Inhibition of nitric oxide is a good therapeutic target for bladder tumors that express iNOS. *Nitric Oxide*, 2014; 36: 11-18
- [5] Chiou C.C., Chang P.Y., Chan E.C., Wu T.L., Tsao K.C., Wu J.T.: Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine and its analogs as DNA marker of oxidative stress: development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate cancers. *Clin. Chim. Acta*, 2003; 334: 87-94
- [6] Degoricija M., Situm M., Korać J., Miljković A., Matić K., Paradzik M., Marinović Terzić I., Jerončić A., Tomić S., Terzić J.: High NF- κ B and STAT3 activity in human urothelial carcinoma: a pilot study. *World J. Urol.*, 2014; 32: 1469-1475
- [7] Deniz H., Karakok M., Yagci F., Güldür M.E.: Evaluation of relationship between HIF-1 α immunoreactivity and stage, grade, angiogenic profile and proliferative index in bladder urothelial carcinomas. *Int. Urol. Nephrol.*, 2010; 42: 103-107
- [8] Drobna Z., Jaspers I., Thomas D.J., Styblo M.: Differential activation of AP-1 in human bladder epithelial cells by inorganic and methylated arsenicals. *FASEB J.*, 2003; 17: 67-69
- [9] Federico A., Morgillo F., Tuccillo C., Ciardiello F., Loguercio C.: Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *Int. J. Cancer*, 2007; 121: 2381-2386
- [10] Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D.M., Forman D., Bray F.: Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer*, 2015; 136: E359-E386
- [11] Fialkow L., Wang Y., Downey G.P.: Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic. Biol. Med.*, 2007; 42: 153-164
- [12] Gecit I., Aslan M., Gunes M., Pirincci N., Esen R., Demir H., Ceylan K.: Serum prolidase activity, oxidative stress, and nitric oxide levels in patients with bladder cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2012; 138: 739-743
- [13] Genestra M.: Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell. Signal.*, 2007; 19: 1807-1819
- [14] Iida K., Itoh K., Maher J.M., Kumagai Y., Oyasu R., Mori Y., Shimazui T., Akaza H., Yamamoto M.: Nrf2 and p53 cooperatively protect against BBN-induced urinary bladder carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 2007; 28: 2398-2403
- [15] Ioachim E., Michael M., Salmas M., Michael M.M., Stavropoulos N.E., Malamou-Mitsi V.: Hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α expression in bladder cancer and their associations with other angiogenesis-related proteins. *Urol. Int.*, 2006; 77: 255-263
- [16] Karlou M., Saetta A.A., Korkolopoulou P., Levidou G., Papanastasiou P., Boltetsou E., Isaiadis D., Pavlopoulos P., Thymara I., Thomas-Tsagli E., Patsouris E.: Activation of extracellular regulated kinases (ERK1/2) predicts poor prognosis in urothelial bladder carcinoma and is not associated with B-Raf gene mutations. *Pathology*, 2009; 41: 327-334
- [17] Khadjavi A., Barbero G., Destefanis P., Mandili G., Giribaldi G., Mannu F., Pantaleo A., Ceruti C., Bosio A., Rolle L., Turrini F., Fontana D.: Evidence of abnormal tyrosine phosphorylated proteins in the urine of patients with bladder cancer: the road toward a new diagnostic tool? *J. Urol.*, 2011; 185: 1922-1929
- [18] Kilic S., Bayraktar N., Beytur A., Ergin H., Bayraktar M., Egri M.: Can the levels of nitric oxide in the urine, serum and tumor tissue be putative markers for bladder cancer. *Int. J. Urol.*, 2006; 13: 1079-1085
- [19] Koga F., Yoshida S., Tatokoro M., Kawakami S., Fujii Y., Kumagai J., Neckers L., Kihara K.: ErbB2 and NF κ B overexpression as predictors of chemoradiation resistance and putative targets to overcome resistance in muscle-invasive bladder cancer. *PLoS One*, 2011; 6: e27616
- [20] Kundu J.K., Surh Y.J.: Emerging avenues linking inflammation and cancer. *Free Radic. Biol. Med.*, 2012; 52: 2013-2037
- [21] Lee C.H., Jeon Y.T., Kim S.H., Song Y.S.: NF- κ B as a potential molecular target for cancer therapy. *Biofactors*, 2007; 29: 19-35
- [22] Levidou G., Saetta A.A., Korkolopoulou P., Papanastasiou P., Gioti K., Pavlopoulos P., Diamantopoulou K., Thomas-Tsagli E., Xiromeritis K., Patsouris E.: Clinical significance of nuclear factor (NF)- κ B levels in urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Virchows Arch.*, 2008; 452: 295-304
- [23] Ma N., Thanan R., Kobayashi H., Hammam O., Wishahi M., El Leithy T., Hiraku Y., Amro E.K., Oikawa S., Ohnishi S., Murata M., Kawanishi S.: Nitritative DNA damage and Oct3/4 expression in urinary bladder cancer with *Schistosoma haematobium* infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2011; 414: 344-349
- [24] Michaud D.S.: Chronic inflammation and bladder cancer. *Urol. Oncol.*, 2007; 25: 260-268
- [25] Murata M., Thanan R., Ma N., Kawanishi S.: Role of nitritative and oxidative DNA damage in inflammation-related carcinogenesis. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2012; 2012: 623019
- [26] Okamoto M., Kawai K., Reznikoff C.A., Oyasu R.: Transformation in vitro of a nontumorigenic rat urothelial cell line by hydrogen peroxide. *Cancer Res.*, 1996; 56: 4649-4653
- [27] Opanuraks J., Boonla C., Saelim C., Kittikiwit W., Sumpatanukul

- P, Honglertsakul C., Tosukhowong P.: Elevated urinary total sialic acid and increased oxidative stress in patients with bladder cancer. *Asian Biomed.*, 2010; 4: 703-710
- [28] Pialoux V., Mounier R., Brown A.D., Steinback C.D., Rawling J.M., Poulin M.J.: Relationship between oxidative stress and HIF-1 α mRNA during sustained hypoxia in humans. *Free Radic. Biol. Med.*, 2009; 46: 321-326
- [29] Piotrowska A., Iżykowska I., Podhorska-Okołów M., Zabel M., Dziągiew P.: Budowa białek z rodziny NF- κ B i ich rola w procesie apoptozy. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2008; 62: 64-74
- [30] Przybyszewski W.M., Rzeszowska-Wolny J.: Stres oksydacyjny w procesach przerostu i kancerogenezy gruczołu sterczowego. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2009; 63: 340-350
- [31] Sandes E.O., Faletti A.G., Riveros M.D., Vidal Mdel C., Gimenez L., Casabe A.R., Eijan A.M.: Expression of inducible nitric oxide synthase in tumoral and non-tumoral epithelia from bladder cancer patients. *Nitric Oxide*, 2005; 12: 39-45
- [32] Sandes E.O., Lodillinsky C., Langle Y., Belgorosky D., Marino L., Gimenez L., Casabe A.R., Eijan A.M.: Inducible nitric oxide synthase and PPAR γ are involved in bladder cancer progression. *J. Urol.*, 2012; 188: 967-973
- [33] Schetter A.J., Heegaard N.H., Harris C.C.: Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis*, 2010; 31: 37-49
- [34] Ścibior-Bentkowska D., Czczot H.: Komórki nowotworowe a stres oksydacyjny. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2009; 63: 58-72
- [35] Stępnik M.: Molekularne aspekty toksycznego działania tlenu azotu. *Medycyna Pracy*, 2001; 52: 375-381
- [36] Wang H., Xi S., Xu Y., Wang F., Zheng Y., Li B., Li X., Zheng Q., Sun G.: Sodium arsenite induces cyclooxygenase-2 expression in human uroepithelial cells through MAPK pathway activation and reactive oxygen species induction. *Toxicol. In Vitro*, 2013; 27: 1043-1048
- [37] Wang X.J., Sun Z., Chen W., Eblin K.E., Gandolfi J.A., Zhang D.D.: Nrf2 protects human bladder urothelial cells from arsenite and monomethylarsonous acid toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2007; 225: 206-213
- [38] Wiczyńska B., Rolski J.: Terapia celowana. Część I. Mechanizmy przesyłania sygnałów przy udziale receptorów o aktywności kinazy tyrozynowej. *Współcz. Onkol.*, 2007; 11: 331-336
- [39] Wojciechowska U., Didkowska J., Zatoński W.: Pięcioletnie przeżycia chorych na nowotwory złośliwe w Polsce. *Nowotwory*, 2010; 60: 122-128
- [40] Zhang B., Lu Z., Hou Y., Hu J., Wang C.: The effects of STAT3 and Survivin silencing on the growth of human bladder carcinoma cells. *Tumour Biol.*, 2014; 35: 5401-5407

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.