



Politechnika Śląska

Wydział Automatyki, Elektroniki i Informatyki

Sylwia Ciesielska

MECHANIZMY REGULACJI STANU REDOKS
W ŻYWYCH KOMÓRKACH

Rozprawa doktorska napisana
pod kierunkiem
prof. dr hab. Joanny Rzeszowskiej

Gliwice 2023

Serdecznie dziękuję:

Pani prof. dr hab. Joannie Rzeszowskiej za pomoc merytoryczną, krytyczne uwagi oraz okazaną mi długoletnią cierpliwość i wyrozumiałość, ale przede wszystkim za cenne rady życiowe.

Koleżankom i kolegom z Centrum Biotechnologii, na których pomoc zawsze mogłam liczyć.

Rodzicom, bez których ciężkiej pracy i wiary w moje możliwości nie byłoby mnie w tym miejscu

Babci za wsparcie duchowe i wszystkie lata wiary we mnie

Mężowi i synowi za wszystko

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE	5
ABSTRACT	7
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW I OZNACZEŃ	9
WSTĘP	10
Reaktywne formy tlenu w systemach biologicznych	10
Stan redoks	10
Reaktywne formy tlenu	10
Źródła reaktywnych form tlenu	11
Rodzaje reaktywnych form tlenu	14
Produkcja i neutralizacja reaktywnych form tlenu	17
Redukcja i utlenianie w systemach redoks.....	20
Zależność procesów komórkowych od reaktywnych form tlenu	21
Regulacja aktywności genów kodujących białka uczestniczące w systemach redoks	23
Matematyczne odwzorowywanie procesów zachodzących w komórkach i związanych z reaktywnymi formami tlenu	24
CELE PRACY	25
MATERIAŁY I METODY	26
WYNIKI	32
Ekspresja enzymów uczestniczących w regulacji redoks w różnych typach komórek	32
Regulacja aktywności genów kodujących białka uczestniczące w systemach redoks	35
Wpływ czynników środowiskowych na reaktywne formy tlenu	39
Poziom reaktywnych form tlenu w komórkach po ekspozycji na promieniowanie UVA	40
Model matematyczny pozwalający na analizę mechanizmów neutralizacji reaktywnych form tlenu	43
Dane do modelu i schemat w Simulinku	46
Modelowanie sytuacji pojawiających się w komórce podczas stresu oksydacyjnego	48
Neutralizacja H ₂ O ₂ w komórkach nowotworowych.....	52
Neutralizacja H ₂ O ₂ w nowotworowych komórkach radiowrażliwych i radiooporych....	55
DYSKUSJA	58
Ścieżki regulujące reaktywne formy tlenu w różnych typach komórek.....	58
Stymulacja proliferacji po ekspozycji na promieniowanie UVA.....	59

Model matematyczny pozwalający na analizę mechanizmów neutralizacji reaktywnych form tlenu	60
Zmiany ekspresji genów po ekspozycji na promieniowanie jonizujące	63
Regulacja neutralizacji reaktywnych form tlenu w komórkach radiowrażliwych i radioopornych.....	64
Nieintuicyjne mechanizmy regulacji	66
SPIS TABEL	71
SPIS RYSUNKÓW	72
BIBLIOGRAFIA.....	74

STRESZCZENIE

Reaktywne formy tlenu (RFT) są podstawowym elementem pojawiającym się w komórkach żyjących w tlenowym środowisku. Uważane są za szkodliwe produkty przemiany materii, mogące negatywnie wpływać na komórkę powodując jej starzenie lub śmierć, jednak w wielu przypadkach mogą uczestniczyć w komórkowych procesach regulacyjnych i pozytywnie wpływać na komórki. Niniejsza praca dotyczy badania mechanizmów regulujących poziomy niektórych reaktywnych form tlenu.

Wykorzystując dostępne bazy danych, dane dostępne w literaturze, a także dostępne metody eksperymentalne w pracy badano czy mechanizmy regulujące komórkowy stan oksydoredukcyjny działają podobnie we wszystkich typach komórek. Dokonano analizy ekspresji genów związanych ze stresem oksydacyjnym, a także mechanizmami neutralizacyjnymi. Przeprowadzone analizy dla wielu różnych linii komórkowych o różnym pochodzeniu tkankowym sugerują, że komórki różnych typów wykazują różnice w ekspresji genów, których produkty uczestniczą na przykład w neutralizacji H_2O_2 (geny: peroksyredoksyna 2 (PRDX2), której poziom jest niższy w nowotworowych liniach komórkowych pochodzących z nerki, inhibitora tioredoksyny (TXNIP), którego poziom jest niższy w komórkach pochodzących z nowotworów skóry i wątroby, a wyższy w liniach komórkowych pochodzących z nowotworów piersi, jelita grubego i górnego odcinka pokarmowego) oraz w neutralizacji O_2^- (gen ATOX1, którego poziom jest wyższy w komórkach pochodzących z nowotworów skóry). Analiza sekwencji genów regulujących RFT wykazuje obecność sekwencji oddziałujących z miRNA zarówno dla genów kodujących białka uczestniczące w produkcji jak i neutralizacji RFT, a co za tym idzie ekspresja enzymów związanych z procesami regulującymi RFT jest kontrolowana na poziomie translacji, poprzez oddziaływanie z miRNA.

Stres oksydacyjny w komórkach może powstawać pod wpływem czynników środowiskowych, takich jak promieniowanie jonizujące lub UV. W pracy badano czy komórki w podobny sposób odpowiadają na czynniki środowiskowe indukujące stres oksydacyjny przeprowadzając szczegółowe badania eksperymentalne dla dwóch linii komórkowych Me45 i HCT116. Ekspozycja komórek na promieniowanie UV powoduje indukcję reaktywnych form tlenu oraz zmiany w proliferacji, w zależności od użytej dawki

promieniowania. Dla wyższych dawek promieniowania obserwowana jest śmierć, jednak w szczególności interesujące okazały się niższe, specyficzne dla danej linii komórkowej dawki, dla których obserwowano stymulację proliferacji.

Jedną z głównych reaktywnych form tlenu obecnych we wszystkich komórkach jest H_2O_2 , który może pełnić funkcje cząsteczki sygnalizacyjnej w sygnalizacji zewnętrznej i wewnętrznej komórkowej. W pracy stworzono model matematyczny opisujący proces neutralizacji H_2O_2 w różnych typach komórek i porównywano wydajność systemów neutralizacji H_2O_2 przy wykorzystaniu symulacji komputerowych w oparciu o dostępne dane dotyczące ekspresji genów, które uczestniczą w tym procesie. Przeprowadzone symulacje potwierdzają, że linie komórkowe różnego, a nawet tego samego pochodzenia tkankowego w inny sposób neutralizują H_2O_2 , prowadząc do różnic w ustalonych poziomach H_2O_2 . Wyniki symulacji sugerują, że różnice w radiowrażliwości komórek nowotworowych mogą wynikać z różnic w wydajności neutralizacji H_2O_2 .

Przedstawione podejście eksperymentalne w połączeniu z matematycznymi symulacjami modelowymi daje wgląd w nowe elementy problematyki związanej z równowagą redoks w komórkach. Moje badania nad wpływem promieniowania UV na procesy redoks i proliferację komórkową są istotne, ponieważ jesteśmy stale narażeni na promieniowanie UVA oraz na promieniowanie jonizujące, a uzyskane wyniki dotyczące neutralizacji RFT mogą być przydatne dla różnego rodzaju terapii.

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) are the basic element appearing in cells living in an oxygen environment. They are considered harmful metabolic products that can negatively affect the cells, causing ageing and death, but in many cases they can participate in cellular regulatory processes and positively affect cells. This work concerns the study of the mechanisms regulating the levels of some reactive oxygen species.

Using available databases, data available in the literature, as well as available experimental methods, the study examined whether the mechanisms regulating the cellular redox state act similarly in all cell types. The expression of genes related to oxidative stress as well as neutralization mechanisms was analyzed. The analyzes carried out for many different cell lines of different tissue origins suggest that various types of cells show differences in the expression of genes whose products are involved in, for example, H₂O₂ neutralization (genes: PRDX2, whose level is lower in kidney cell lines, TXNIP whose level is lower in skin and liver cells, and higher in breast, colon and upper digestive tract cell lines) and in the neutralization of O₂⁻ (ATOX1 gene, the level of which is higher in skin cells). Sequence analysis of ROS-regulating genes shows the presence of sequences interacting with miRNAs for both genes encoding proteins involved in the production and neutralization of ROS, and thus the expression of enzymes related to ROS-regulating processes is controlled at the translation level by interactions with miRNAs.

Oxidative stress in cells can be caused by environmental factors such as ionizing or UV radiation. The study investigated whether cells respond in a similar way to environmental factors inducing oxidative stress by conducting detailed experimental studies for two cell lines Me45 and HCT116. Exposure of cells to UV radiation causes the induction of reactive oxygen species and changes in proliferation, depending on the dose of radiation used. Death is observed at higher doses of radiation, but of particular interest were the lower, cell line-specific doses that stimulated proliferation.

One of the main reactive oxygen species present in all cells is H₂O₂, which can function as a signaling molecule in extra- and intracellular signaling. In the work, a mathematical model describing the process of H₂O₂ neutralization in various types of cells was created and the efficiency of its neutralization systems was compared using computer simulations based on available data of the expression of genes that participate in this process. The simulations carried out confirm that cell lines of various and even the same tissue origin

neutralize H_2O_2 differently, leading to differences in the H_2O_2 levels. The simulation results suggest that the differences in the radiosensitivity among various types of cancer cells may be due to differences in the efficiency of H_2O_2 neutralization.

The presented experimental approach, combined with mathematical model simulations, gives an insight into new elements of issues related to the redox balance in cells. My research showing the impact of UV radiation on redox processes and cell proliferation is important because we are constantly exposed to UVA and ionizing radiation, and the results obtained regarding the neutralization of ROS may be useful for various types of therapies.

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW I OZNACZEŃ

RFT – reaktywne formy tlenu

RFA- reaktywne formy azotu

O_2^- - anionorodnik ponadtlenkowy

H_2O_2 - nadtlenek wodoru

NO – tlenek azotu

$ONOO^-$ - nadtlenoazotyn

NOX – oksydaza NADPH

NOS – syntaza tlenku azotu

NOSIP – enzym oddziałujący z NOS

CAT- katalaza

GSH- glutation

GSSG – utleniona forma glutationu

GPX- peroksydaza glutationowa

PRDX- peroksyredoksyna

TXN – tioredoksyna

TXNIP- enzym oddziałujący z TXN

TXNRD – reduktaza tioredoksyny

miRNA- mikro RNA

WSTĘP

Reaktywne formy tlenu w systemach biologicznych

Stan redoks

Reakcje redoks to wszystkie reakcje utleniania i redukcji, w których następuje przepływ elektronu związany z pojawianiem się i neutralizacją reaktywnych form tlenu (RFT, ang. *reactive oxygen species*, ROS) i azotu (RFA, ang. *reactive nitrogen species*, RNS) zwanych inaczej wolnymi rodnikami (Thannickal & Fanburg 2000; Immenschuh & Baumgart-Vogt 2005; Sarsour et al. 2009). Regulacja stanu oksydoredukcyjnego wydaje się być kluczowym elementem decydującym o odpowiedzi komórek na różne bodźce środowiskowe czy stosowane w terapii. Zarówno w komórkach prawidłowych, jak i nowotworowych zmiany stanu redoks mogą zachodzić podczas normalnego cyklu życiowego komórek oraz pod wpływem różnych czynników chemicznych i fizycznych, np. takich jak promieniowanie UV czy jonizujące (Thannickal & Fanburg 2000; Sarsour et al. 2009).

Reakcje redoks mają wpływ na utrzymanie homeostazy w komórkach. Reakcje te stanowią ciągłe współzawodnictwo pomiędzy reaktywnymi formami tlenu i antyoksydantami, a utrzymanie homeostazy polega na utrzymaniu równowagi pomiędzy produkcją RFT, a ich neutralizacją przez antyoksydanty (Thannickal & Fanburg 2000; Sarsour et al. 2009). Nawet małe zmiany stanu redoks mogą decydować o losie komórek i wpływać na ich przeżycie lub prowadzić do ich śmierci (Sarsour et al. 2009).

Reaktywne formy tlenu

Reaktywne formy tlenu są zazwyczaj opisywane jako szkodliwe produkty uboczne życia w tlenowym środowisku (Sarsour et al. 2009). Są rozpoznawane jako przekaźniki drugiego stopnia w ogólnej sygnalizacji komórkowej (Zhang et al. 2008; Sarsour et al. 2009). Przez wiele lat były uważane za szkodliwe dla komórek, zaangażowane w procesy starzenia i powodujące ich śmierć (Feinendegen et al. 2004; Trachootham et al. 2008; Sarsour et al. 2009). Obecnie uznawane są za kluczowe elementy regulacji procesów komórkowych takich jak proliferacja, senescencja czy apoptoza (Feinendegen 1999; Thannickal & Fanburg 2000). Wysoce prawdopodobne jest to, że komórki nie potrafią odróżnić reaktywnych form tlenu produkowanych po ekspozycji na promieniowanie od tych, które powstają podczas

prawidłowego procesu oddychania komórkowego (Feinendegen et al. 2004), w którym mitochondria metabolizują standardowo ok. 1-2% tlenu do anionorodnika ponadtlenkowego (Richter 1992; Thannickal & Fanburg 2000).

Źródła reaktywnych form tlenu

RFT mogą być generowane przez źródła egzogenne lub endogenne; źródła egzogenne obejmują promieniowanie jonizujące i niejonizujące, leki, zanieczyszczenia, żywność, ultradźwięki, ksenobiotyki i toksyny (Kohen & Nyska 2002; Marengo et al. 2016; Kurutas 2016), endogenne źródła RFT obejmują organelle komórkowe o wysokim zużyciu tlenu, takie jak mitochondria, peroksysomy i retikulum endoplazmatyczne oraz enzymy takie jak oksydazy NADPH (ang. *NADPH oxidases*, NOX) i syntazy tlenku azotu (ang. *nitric oxide synthases*, NOS), oksydazy ksantyny (ang. *xanthine oxidases*, XO) oraz cytochrom P450 (Phaniendra et al. 2015).

Głównymi przedstawicielami komórkowych RFT są: anionorodnik ponadtlenkowy (O_2^-), rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$), tlen singletowy (1O_2) i nadtlenek wodoru (H_2O_2), które powstają w znacznych ilościach jako toksyczne produkty uboczne w reakcjach mitochondrialnego oddychania komórkowego (Phaniendra et al. 2015). RFA obejmują tlenek azotu (NO), nadtlenoazotyn ($ONOO^-$) i dwutlenek azotu (NO_2). Znaczne ilości O_2^- , H_2O_2 , $\cdot OH$ i NO mogą być również wytwarzane w szlaku oddechowym peroksysomów, gdzie elektrony z różnych metabolitów redukują tlen, a energia jest uwalniana w postaci ciepła (Schrader & Fahimi 2006). Głównym procesem metabolicznym wytwarzającym H_2O_2 w peroksysomach jest β -utlenianie kwasów tłuszczowych, a główną rolą peroksysomów jest redukcja H_2O_2 (Schrader & Fahimi 2006; Phaniendra et al. 2015).

Środowiskowe źródła reaktywnych form tlenu - promieniowanie UV

Promieniowanie ultrafioletowe (UV) jest to promieniowanie elektromagnetyczne o zakresie długości fali 100-400nm, które można podzielić na 3 główne frakcje: UVA (315-400nm), UVB (280-315) oraz UVC (100-280nm). Promieniowanie UV nie ma wystarczającej energii do jonizacji atomów i jest niewidzialne dla ludzkiego oka. Odpowiednie frakcje promieniowania UV docierają do powierzchni Ziemi w różnym zakresie; promieniowanie UVA stanowi około 95% promieniowania docierającego do powierzchni Ziemi,

promieniowanie UVB stanowi ok. 5%, wartość ta jest zależna od warunków pogodowych, natomiast promieniowanie UVC jest całkowicie zatrzymywane przez warstwę ozonową (Ravanat et al. 2001; WHO 2006). W zależności od dawki promieniowania UV może powodować różne efekty, małe dawki mogą być korzystne dla organizmów żywych i wykorzystywane, np. w leczeniu egzemy, łuszczycy lub krzywicy, natomiast wyższe dawki mogą powodować oparzenia słoneczne, niszczenie włókien kolagenowych, a także nowotwory (Ravanat et al. 2001; WHO 2006).

Promieniowanie UV jest znanym induktorem różnych rodzajów uszkodzeń DNA, powoduje powstawanie m.in. pirymidynowych dimerów cyklobutanu (ang. *Cyclobutane pyrimidine dimers*, CPD) oraz fotoproduktów (6-4) (Li & Ho 1998). Promieniowanie UV, głównie UVA może indukować RFT (Bachelor & Bowden 2004). U człowieka UVA dociera do skóry właściwej i tkanki podskórnej i nie ma bezpośredniego wpływu na DNA (nie jest bezpośrednio absorbowane przez DNA), ale może pośrednio wpływać na struktury komórkowe poprzez indukcję RFT (Bachelor & Bowden 2004; WHO 2006). UVA może indukować RFT takie jak O_2^- , H_2O_2 , rodnik hydroksylowy, $ONOO^-$ i tlen singletowy (Bachelor & Bowden 2004; Cortat et al. 2013), ale także powodować zwiększoną produkcję antyoksydantów w komórkach, np. ludzkie skórne fibroblasty odpowiadają na promieniowanie UVA zwiększoną produkcją TXN (Didier et al. 2001).

Badania szlaków sygnałowych powiązanych ze stymulacją proliferacji komórek przez promieniowanie UVA, wykazały zmiany w poziomach białek zaangażowanych w kontrolę proliferacji, takich jak cyklina D1 (Shintani et al. 2002; Dai et al. 2016), Pin1 (Han et al. 2011) i Kin17 (Kannouche et al. 1998) lub aktywację receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR), który jest silnie mitogenny w wielu typach komórek (Dai et al. 2016). Eksperymenty na myszach wykazały, że UVA może przyspieszać wzrost guza (Sluyter & Halliday 2000; Bachelor & Bowden 2004). Wynika z tego, że promieniowanie UVA może bezpośrednio wpływać na stan redoks w komórkach i modulować procesy w nich zachodzące. Jest dobrym wyborem do badań nad mechanizmami regulacji stanu redoks.

Środowiskowe źródła reaktywnych form tlenu - promieniowanie jonizujące

Promieniowanie jonizujące to promieniowanie elektromagnetyczne posiadające wystarczającą energię do oderwania elektronów od atomów lub cząsteczek. Promieniowanie jonizujące można podzielić na dwa rodzaje: niecząstkowe (promienie gamma

i rentgenowskie) i cząstki stałe (cząstki alfa i beta, neutrony i protony) (Institute of Medicine (US) Committee to Study the Feasibility of, and Need for 1995). Atomy składają się z jądra złożonego z protonów i neutronów, wokół których krążą elektrony. Dostarczona energia wystarczająca do oderwania elektronu z orbity, tworząca pary jonów prowadzi do procesu jonizacji. Gdy dostarczona energia wystarcza tylko do przesunięcia elektronu obserwowane jest wzbudzenie. Oba te procesy są niestabilne i trwają od 10^{-5} do 10^{-7} s. Po tym czasie jony i stany wzbudzenia wracają do swojego podstawowego stanu energetycznego z wydzieleniem kwantu promieniowania wtórnego. Ocenę dawki promieniowania uzyskuje się za pomocą dwóch jednostek: dawki ekspozycji określającej zdolność do jonizacji powietrza wyrażoną w kulombach na kilogram (C/kg) oraz dawki pochłoniętej określającej ilość energii uwolnionej przez dowolny rodzaj promieniowania pochłoniętego przez masę materii wyrażoną w Grejach (Gy) (Lefemme et al. 1995; Bernhard et al. 1995; Institute of Medicine (US) Committee to Study the Feasibility of 1995).

W przypadku organizmów żywych promieniowanie jonizujące powoduje nie tylko reakcje fizyczne, ale także chemiczne i biologiczne. Efekt biologiczny polega na przekazywaniu energii promieniowania do poszczególnych komponentów komórki. Efekty, które pojawiają się w komórce zależą od dawki promieniowania, czyli ilości pochłoniętej energii i promieniowrażliwości, mogą obejmować tkanki, narządy oraz cały organizm. Uszkodzenia struktur komórkowych zwanych tarczami wynikają z niszczącego działania promieniowania. Główną tarczą komórkową jest DNA w jądrze, jednak równie ważne są inne struktury komórkowe. Bezpośrednie trafienie w DNA jest raczej mało prawdopodobne, ponieważ każda komórka składa się w 70% z wody. Uderzenie w wodę powoduje reakcje chemiczne, które prowadzą do powstania wolnych rodników z jednym lub kilkoma niesparowanymi elektronami. Wolne rodniki są wysoce reaktywne i mogą prowadzić do zmian w komórkach w zależności od cząsteczek, z którymi reagują. Zwykle tworzą one organiczne wolne rodniki w reakcjach z cząstkami organicznymi, a w reakcji z DNA lub białkami najczęściej prowadzą do ich modyfikacji lub zniszczenia. Promieniowanie jonizujące może indukować RFT w zależności od dawki promieniowania. Komórki posiadają specjalne mechanizmy naprawy DNA i neutralizacji wolnych rodników, jednak jeśli uszkodzenie jest zbyt duże lub gdy poziom RFT jest zbyt wysoki komórka umiera (Lefemme et al. 1995; Bernhard et al. 1995).

Rodzaje reaktywnych form tlenu

Anionorodnik ponadtlenkowy, $O_2^{\cdot-}$

Anionorodnik ponadtlenkowy jest uważany za pierwotny rodnik wśród szerokiej gamy reaktywnych form tlenu (Karu et al. 1993). Powstaje gdy tlen akceptuje dodatkowy elektron (Sarsour et al. 2009). Może być indukowany przez promieniowanie (Thiel 1986; Narayanan et al. 1997), aktywację NOX, (Skonieczna et al. 2017), NOS (Pou et al. 1992; Thomas et al. 2008), ale także podczas normalnego metabolizmu zachodzącego w mitochondriach, peroksysomach, błonach jądrowych i cytoplazmie (Immenschuh & Baumgart-Vogt 2005; Sarsour et al. 2009). Anionorodnik ponadtlenkowy jest neutralizowany przez dysmutazę ponadtlenkową SOD (ang. *superoxide dismutase*), która bierze udział w konwersji anionorodnika do nadtlenku wodoru (Candas & Li 2014), taka konwersja może zachodzić także spontanicznie (Sarsour et al. 2009). Wolne rodniki mogą wzajemnie na siebie wpływać i zmieniać swoje zachowanie, m.in. poprzez blokowanie innych uczestników ścieżek neutralizacyjnych, np. anionorodnik ponadtlenkowy może hamować katalazę oraz peroksydazę glutationową (Satomi et al. 1995; Vasquez-Vivar et al. 2002).

Nadtlenek wodoru, H_2O_2

Nadtlenek wodoru powstaje przez dysmutację z $O_2^{\cdot-}$, jest także produkowany także przez enzymy takie jak oksydaza aminokwasowa, oksydaza ksantyny oraz NOX (Lee et al. 2004; Nisimoto et al. 2014). H_2O_2 może swobodnie przechodzić przez błony komórek i indukować bezpośrednio rozrywanie wiązań fosfodiestrowych (Radi et al. 2002; Sarsour et al. 2009). Ze względu na długi okres półtrwania jest uważany za molekułę sygnalizacyjną (Burdon 1995). H_2O_2 może reagować z metalami, produkując przy tym $\cdot OH$ (reakcja Fentona) (Henle & Linn 1997). Uważa się, że największa toksyczność H_2O_2 i $O_2^{\cdot-}$ jest osiągana przy tranzycji do rodników hydroksylowych (Henle & Linn 1997). Neutralizacja nadtlenku wodoru, a tym samym ochrona przed uszkodzeniem jest przeprowadzana głównie przez katalazę (ang. *catalase*, CAT) (Radi et al. 2002; Sarsour et al. 2009), peroksyredoksyny (ang. *peroxiredoxin*, PRDX) (Immenschuh & Baumgart-Vogt 2005; Poynton & Hampton 2014), i peroksydazę glutationową (ang. *glutathione peroxidase*, GPX) (Meister 1988; Shelly 2009).

Rodnik hydroksylowy, $\cdot OH$

Rodnik hydroksylowy jest jednym z najbardziej aktywnych biologicznie rodników, jest on nieustannie wytwarzany w procesach redukcji anionorodnika tlenkowego do wody. W reakcji Haber-Weissa rodnik hydroksylowy powstaje w obecności jonów żelaza i H_2O_2 . Pierwszy krok redukcji obejmuje redukcję trójwartościowego jonu żelaza i anionorodnika ponadtlenkowego, która prowadzi do powstania tlenu i jonu żelazawego. W następnym kroku następuje reakcja Fentona, w której jon żelazawy i H_2O_2 przekształcane są w rodnik hydroksylowy (Lee et al. 2004; Lipinski 2011). Reakcja Fentona może zachodzić także niezależnie (Lee et al. 2004; Lipinski 2011). Rodnik hydroksylowy może ulegać dalszym reakcjom, takim jak reakcja z tlenem, z wytworzeniem rodnika nadtlenkowego lub rozkład do rodników fenoksylowych przez eliminację wody (Lee et al. 2004). Rodniki hydroksylowe mogą być neutralizowane przez substancje zawierające podwójne wiązania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, przez substancje zawierające pierścienie fenolowe mające zdolność do zmiatania rodników hydroksylowych dzięki aromatycznej hydroksylacji, np. resweratrol, przez substancje z klasy polienów i polifenoli, takich jak flawonoidy, obecne głównie w owocach i warzywach (Lee et al. 2004; Lipinski 2011), a także przez tioredoksyny (Das & Das 2000).

Tlen singletowy, 1O_2

Tlen singletowy jest zwykle wytwarzany przez fotochemiczną, termiczną, chemiczną lub enzymatyczną aktywację O_2 . Może także powstawać z H_2O_2 , który reaguje z $O_2^{\cdot -}$, z HOCl lub chloroaminami w komórkach i tkankach (Lee et al. 2004; Ogilby 2010). Tlen singletowy jest bardzo silnym utleniaczem o dość długim okresie półtrwania (Ogilby 2010). Łatwo utlenia składniki komórkowe, takie jak lipidy, białka i kwasy nukleinowe, jest także zaangażowany w utlenianie cholesterolu (Lee et al. 2004). 1O_2 może dyfundować na znaczne odległości, w tym przez błony komórkowe. Badania pokazały, że działanie tlenu singletowego mogą neutralizować b-karoten, a-tokoferol (Ogilby 2010), a także tioredoksyna (Das & Das 2000).

Tlenek azotu, NO

Tlenek azotu (NO) jest to wysoce reaktywny gaz (Villalobo 2006) będący mediatorem wielu funkcji komórkowych związanych z proliferacją, cyklem komórkowym i apoptozą. NO może być traktowany jako przekaźnik parakryny lub autokryny, a jego produkcja i degradacja zależy od typu komórki (Napoli et al. 2013). NO jest produkowany przez syntazy tlenku azotu NOS (Villalobo 2006). Substratem do produkcji przez NOS tlenku azotu jest L-arginina, której poziom jest regulowany przez enzymy cyklu mocznikowego (Andrew & Mayer 1999; Morris 2004). NO może być uważany za antyoksydant, ponieważ współzawodniczy o $O_2^{\cdot-}$ z SODem (Virág et al. 2003). W wyniku reakcji $O_2^{\cdot-}$ z NO powstaje ONOO⁻, co obniża tym samym nie tylko poziom $O_2^{\cdot-}$, ale także H_2O_2 .

Nadtlenoazotyn, ONOO⁻

Nadtlenoazotyn powstaje w wyniku reakcji $O_2^{\cdot-}$ z NO obniżając poziom $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 (Szabó 1996; Sarsour et al. 2009). Nawet niewielkie zmiany $O_2^{\cdot-}$ lub tlenku azotu mogą znacznie zwiększyć produkcję ONOO⁻ (Kamat 2006). ONOO⁻ może dezaktywować SOD (Candas & Li 2014) powodując tym samym dodatnie sprzężenie zwrotne i przedłużać okres trwania $O_2^{\cdot-}$ (Radi et al. 2002; Phaniendra et al. 2015), natomiast H_2O_2 , które może indukować jeden z enzymów produkujących NO - iNOS (Lubart et al. 2005) może przedłużać okres półtrwania ONOO⁻ (Szabó 1996). Nadtlenuazotyn to toksyczny rodnik powodujący peroksydację lipidów, może reagować z tiolami i indukować uszkodzenia DNA (Virág et al. 2003; Rusyn et al. 2004). ONOO⁻ ma zdolność dyfuzji przez komórki (Rusyn et al. 2004) i może powodować uszkodzenia DNA większe niż równoważna dawka NO (Virág et al. 2003; Matsumoto et al. 2012). Choć ONOO⁻ może generować rodnik hydroksylowy (Di Mascio et al. 1994; Wiseman & Halliwell 1996), jego profil uszkodzeń DNA jest inny niż uszkodzenia DNA powodowane przez rodniki hydroksylowe lub tlen singletowy (Epe et al. 1996).

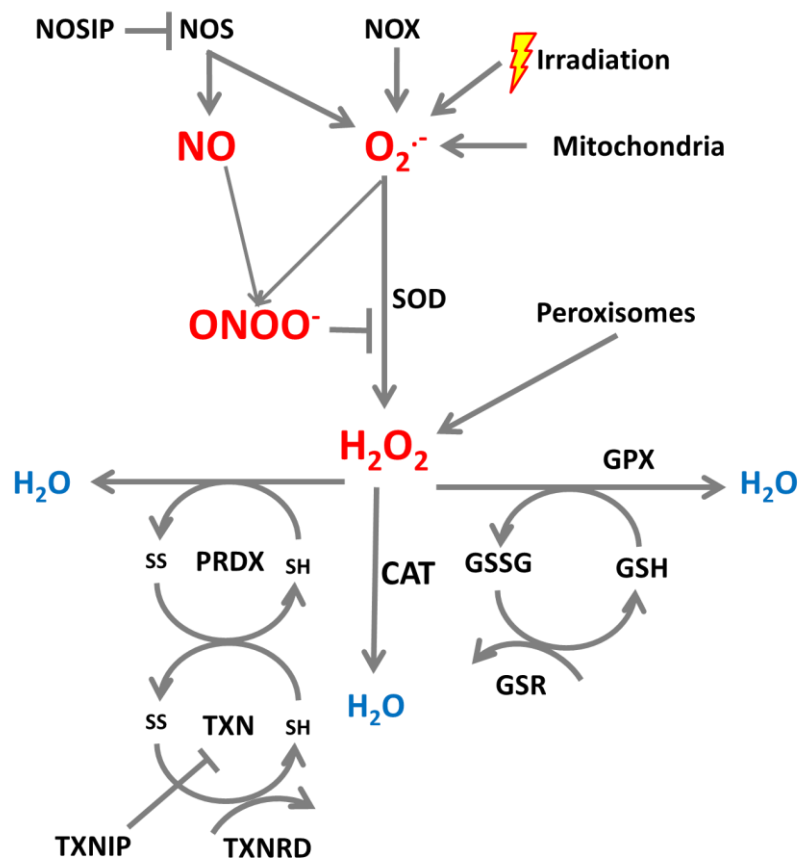
Rodnik dwutlenku azotu, NO₂

Rodnik dwutlenku azotu jest to silnie utleniający rodnik, wytwarzany w metabolizmie azotynów i azotanów. Może być generowany w wielu szlakach biochemicznych, jednak do najważniejszych zalicza się reakcje katalizowane przez peroksydazę i rozkład

nadtlenoazotynu (Zhouen et al. 1998; Augusto et al. 2002). NO_2 jest odpowiedzialny za peroksydację lipidów, może utleniać także cysteiny oraz tyrozyny w peptydach, prowadząc do zahamowania ich aktywności enzymatycznej. Dobrymi antyoksydantami NO_2 są pochodne kwasu hydroksycynamonowego, do których należą m.in. kwas ferulowy, kwas synapowy i kwas kawowy (Zhouen et al. 1998; Augusto et al. 2002).

Produkcja i neutralizacja reaktywnych form tlenu przez enzymy

Wolne rodniki mogą być przekształcane i neutralizowane w różny sposób (Rysunek 1). Anionorodnik ponadtlenkowy ($\text{O}_2^{\cdot-}$) reaguje z dysmutazą ponadtlenkową (SOD), a następnie jest przetwarzany do nadtlenku wodoru (H_2O_2) lub reaguje z tlenkiem azotu (NO) tworząc nadtlenoazotyn (ONOO^-). H_2O_2 może być konwertowany do wody przez katalazę (CAT), peroksyredoksyny (PRDX) oraz peroksydazę glutationową (GPX).



Rysunek 1. Produkcja i neutralizacja RFT.

Źródło opracowanie własne, przekształcone z (Ciesielska et al. 2021).

Oksydazy NADPH (NOX) są to enzymy odpowiedzialne za produkcję RFT, regulujące liczne, zależne od redoks szlaki sygnałowe, które wpływają na różnicowanie komórek, proliferację, apoptozę i rozwój embrionalny (Skonieczna et al. 2017). Ze względu na rolę w produkcji RFT wyróżnia się w szczególności izoformy NOX2 i NOX4; NOX2 wytwarza O_2^- , podczas gdy komórki, w których NOX4 ulega ekspresji zawierają wykrywalne poziomy H_2O_2 zamiast O_2^- (Jadhav et al. 2014). Komórki mogą wytwarzać O_2^- nie tylko przez enzymy z rodziny NOX (Marengo et al. 2016), ale w pewnych okolicznościach także przez syntazy tlenu azotu (NOS) (Kim & Park 2010).

Istnieją trzy rodzaje NOS: iNOS (indukowalna), nNOS (neuronalna), eNOS (śródbłonkowa) (Alderton et al. 2001). Dwie izoformy, neuronalna i śródbłonkowa są zależne od wapnia (Alderton et al. 2001), podczas gdy indukowalna izoforma jest niezależna od wapnia i może być indukowana przez H_2O_2 (Lubart et al. 2005), NF- κ B (Pall 2008) lub cytokiny i produkty bakteryjne (Feng 2012). Ważną właściwością NOS jest ich zdolność do przełączania się między produkcją rodnika ponadtlenkowego lub tlenu azotu, która jest ściśle uzależniona od dostępności kofaktora tetrahydrobiopteryny (BH₄) i jego utlenionej postaci dihydrobiopteryny (BH₂) (Vasquez-Vivar et al. 2002). NOS jest regulowany także przez białko oddziałujące z syntazą tlenu azotu (ang. *nitric oxide interacting protein*, NOSIP), które oddziałuje z NOS i ogranicza wytwarzanie NO (Dreyer et al. 2004)

Anionorodnik ponadtlenkowy jest przekształcany w H_2O_2 przez dysmutazę ponadtlenkową (SOD) (Sarsour et al. 2009; Candas & Li 2014). Tlenek azotu konkuruje o O_2^- z SOD, a O_2^- wraz z tlenkiem azotu może tworzyć nadtlenoazotyn, który hamuje SOD. SOD jest elementem systemu antyoksydacyjnego chroniącego komórki przed szkodliwym działaniem O_2^- (Candas & Li 2014) poprzez konwersję O_2^- do H_2O_2 i tlenu. O_2^- może być neutralizowane przez trzy izoformy SOD, przez CuZnSOD (SOD1) w cytozolu, przez MnSOD (SOD2) w mitochondriach oraz przez zewnątrzkomórkowe SOD (SOD3) w przestrzeni zewnątrzkomórkowej (Candas & Li 2014).

H_2O_2 może zostać przekształcony do \cdot OH w obecności miedzi i żelaza (Florence 1984; Puppo & Halliwell 1988) lub może zostać zneutralizowany do H_2O przez katalazę (CAT), antyoksydant obecny w prawie wszystkich organizmach tlenowych (Nandi et al. 2019), poprzez interakcję z peroksydazą glutationową (GPX), w którym glutation przekształcany jest do swojej utlenionej formy GSSG (Meister 1988; Adamiec & Skonieczna

2019) oraz przez enzymy z rodziny peroksyredoksyn (PRDX), które ulegają utlenieniu poprzez redukcję H_2O_2 (Immenschuh & Baumgart-Vogt 2005; Sue et al. 2005).

Katalaza jest jednym z najstarszych enzymów antyoksydacyjnych. Katalazy dzieli się zwykle na trzy typy: katalazy typowe występujące w organizmach oddychających tlenowo, katalazy-peroksydazy obecne w grzybach, archebakteriach i bakteriach oraz katalazy manganowe występujące wyłącznie w bakteriach. Typowe katalazy dzielą się na trzy podgrupy, katalaza z trzeciej grupy występuje u archebakterii, grzybów, protistów, roślin i zwierząt; katalaza ludzka należy do tej grupy (Glorieux & Calderon 2017). Katalaza jest obecna w większości komórek głównie w peroksysomach (zwłaszcza komórek wątroby) oraz w cytoplazmie (erytrocytach), nie występuje w mitochondriach, chociaż badania pokazały, że występuje w mitochondriach zlokalizowanych w sercu szczurów (Bai & Cederbaum 2001; Glorieux & Calderon 2017). Oprócz neutralizacji H_2O_2 , katalaza rozkłada nadtlenoazotyny i utlenia tlenek azotu do azotynu (Bai & Cederbaum 2001; Glorieux & Calderon 2017).

Peroksyredoksyny, a dokładniej peroksydazy tioredoksynowe, są szeroko rozpowszechnionymi enzymami antyoksydacyjnymi specyficznymi dla tioli, mogą stanowić do 1% wszystkich białek w niektórych organizmach (Immenschuh & Baumgart-Vogt 2005). Służą głównie jako przeciwutleniacze dla H_2O_2 i $ONOO^-$, mogą zredukować nawet do 90% nadtlenczków występujących w komórkach. Można wyróżnić sześć peroksyredoksyn: PRDX1, PRDX2 i PRDX6 zlokalizowane w cytozolu, PRDX3 zlokalizowana w mitochondriach, PRDX4 zlokalizowana w przestrzeni zewnątrzkomórkowej i PRDX5 zlokalizowana w mitochondriach i peroksysomach (Sue et al. 2005).

Działanie peroksydazy glutationowej opiera się na glutationie (GSH), jednej z najważniejszych cząsteczek zaangażowanych w ochronę przed toksycznym działaniem RFT, która jest powszechnie wytwarzana we wszystkich komórkach (Meister 1988). W systemie opierającym się na GSH bardzo ważne jest przekształcanie GSH pomiędzy formą zredukowaną i utlenioną, realizowane przez reduktazy glutationowe i peroksydazy. Peroksydazy glutationowe podobnie jak peroksyredoksyny mają różne lokalizacje komórkowe: GPX1 występuje w cytozolu, jądrze i mitochondriach, GPX2 gromadzi się w cytozolu i jądrze, GPX3 w cytozolu, natomiast GPX4 występuje w jądrze, cytozolu, mitochondriach i jest także obecna w błonach komórkowych, z którymi jest związana (Margis et al. 2008).

Redukcja i utlenianie w systemach redoks

W celu przeciwdziałania wzrostowi RFT spowodowanemu czynnikami środowiskowymi, komórki wykorzystują różne przeciwutleniacze, które tworzą układy antyoksydacyjne. Przeciwutleniacze inaczej antyoksydanty są to specjalne molekuly, które mogą konwertować i neutralizować RFT oraz regulować ich poziom aktywność różnymi ścieżkami sygnałowymi (Kohen & Nyska 2002). Głównymi elementami takich układów są enzymy, które z łatwością wymieniają elektrony, i których stany utlenione i zredukowane tworzą pary redoks. Przykładami są glutation/dwusiarczek glutationu (GSH/GSSG), utleniony/zredukowany dinukleotyd nikotynamidoadeninowy (NAD⁺/NADH) oraz fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADP⁺/NADPH) (Meister 1988; Bradshaw 2019). Stosunek utlenionej do zredukowanej formy glutationu jest często wykorzystywany jako wskaźnik stanu redoks komórki (Meister 1988)

Aby utrzymać odpowiednie stężenie cząsteczek w ich formie zredukowanej, komórki wykorzystują specjalne enzymy, które są w stanie je zredukować (Meister 1988). Do prawidłowego działania całego systemu antyoksydacyjnego, utlenione enzymy muszą ponownie zostać zredukowane. Rolę tę pełnią reduktazy glutationowe (GSR) (Meister 1988) i tioredoksyny (TXN) (Powis & Montfort 2001). Tiorredoksyny są małymi białkami, które są redukowane w zależności od NADPH przez reduktazę tioredoksynową (TXNRD). Służą jako dawcy elektronów i redukują grupy cysteinowe na białkach. Tiorredoksyna wraz z reduktazą tioredoksynową stanowią bardzo ważny element układu antyoksydacyjnego peroksyredoksyn i peroksydazy glutationowej (Powis & Montfort 2001). Peroksyredoksyny, tioredoksyny i glutation zawierają cysteiny z grupami tiolowymi, które występują w formie zredukowanej (S-H) lub utlenionej (S-S). Peroksyredoksyny utleniają się podczas redukcji H₂O₂, a następnie są redukowane przez tioredoksyny, które ulegają utlenieniu. Aby układ ten działał poprawnie, utlenione tioredoksyny są redukowane przez reduktazy tioredoksyny (TXNRD), podstawowe elementy układu tioredoksynowego, które przywracają ich aktywność enzymatyczną (Arnér & Holmgren 2000). Elektrony potrzebne do redukcji enzymów pochodzą z trwale zachodzących reakcji redukcji podczas reakcji metabolicznych (Arnér & Holmgren 2000; Sue et al. 2005). W skład systemu tioredoksynowego wchodzi także białko, które z nią oddziałuje (ang. *thioredoxin interacting protein*, TXNIP) i moduluje działanie układu tioredoksyna-reduktaza tioredoksyny, hamując funkcję antyoksydacyjną tioredoksyny oraz powodując nagromadzenie RFT i stres komórkowy (Powis & Montfort 2001).

Zależność procesów komórkowych od reaktywnych form tlenu

Przeżycie komórek może być zależne od mechanizmów związanych z modyfikacją białek wrażliwych na stan redoks i związanych z przeżyciem komórek przez wpływ na ścieżki sygnalizacyjne takie jak: MAPK, PI3K/Akt lub p53, przez czynniki transkrypcyjne takie jak NF- κ B, Ap-1 lub Nrf-2 lub przez białka wykonawcze takie jak kaspazy, Bcl-2 lub cytochrom c (Trachootham et al. 2008). Na przykład czynnik transkrypcyjny Nrf-2 jest odpowiedzialny za ekspresję wielu genów związanych ze stanem redoks, np. SOD1, CAT, PRDX, TXN czy GCLC, GCLM, GSS związanych z metabolizmem glutationu (He et al. 2020). Wpływ RFT na żywotność, proliferację i apoptozę został opisany między innymi w badaniach Kitamoto, w których pokazano, że zahamowanie NOX2, a w konsekwencji RFT promowało apoptozę, natomiast zwiększona produkcja RFT związana ze wzrostem stężenia NOX2 wpływała stymulująco na wzrost komórek w kostniakomięśniu (Kitamoto et al. 2018). Pośród enzymów mających wpływ na proliferację wymienia się także tioredoksynę, której zwiększona ekspresja powoduje zwiększenie wzrostu komórek nowotworowych i hamuje apoptozę (Raffel et al. 2003). Różne poziomy RFT mogą mieć wpływ na proliferację poprzez utlenianie cystein w białkach, które biorą udział w kontroli cyklu komórkowego (Chiu & Dawes 2012). Na przykład utlenianie cystein przez H_2O_2 w fosfatazach Cdc25C, PTEN lub LMW-PTP prowadzi do ich dezaktywacji przez formację wewnątrzcysteinowych wiązań dwusiarczkowych. W rezultacie ma to wpływ na progresję cyklu komórkowego w fazach G2/M oraz wzrost i przeżycie komórek (Cho et al. 2004).

RFT są ważnymi regulatorami wielu funkcji komórkowych między innymi proliferacji czy apoptozy (Feinendegen 1999; Thannickal & Fanburg 2000). Niskie stężenia RFT zazwyczaj promują wzrost komórek, a wyższe senescencję lub ich śmierć (Yasuda et al. 1998; Zhang et al. 2008; Wang et al. 2011). Na przykład niskie stężenia $O_2^{\cdot -}$ stymulują proliferację w komórkach mięśni gładkich i białaczce (Brown et al. 1999; Day & Suzuki 2005), a niskie stężenia H_2O_2 stymulują proliferację i wzrost fibroblastów (Murrell et al. 1990; Davies 1999). Efekt stymulacji wzrostu związany z RFT obserwowany był także w drożdżach i bakteriach (Christman et al. 1985; Davies et al. 1995). Znanymi induktorami RFT są promieniowanie UVA, którego niskie dawki mogą stymulować proliferację (Ciesielska et al. 2019) oraz światło lasera diodowego o małej mocy, któremu również towarzyszy zwiększona proliferacja komórek. W przypadku lasera diodowego o małej mocy po dodaniu katalazy lub dysmutazy ponadtlenkowej nie obserwowano zwiększonej

prolifracji (Grossman et al. 1998), co sugeruje, że RFT są przynajmniej częściowo zaangażowane w stymulację proliferacji (Klotz et al. 1999).

Hormeza jest to zjawisko, w którym czynnik toksyczny dla danego organizmu może być dla niego korzystny w małych dawkach (Oberbaum & Cambar 1994; Luckey 2006; Mattson & Calabrese 2010). W 1988 roku Schultz pokazał, że substancje takie jak m.in. jod, brom, chlorek rtęci, które są trujące dla drożdży mogą mieć pozytywny wpływ na ich metabolizm kiedy podawane są w małych dawkach (Oberbaum & Cambar 1994). Hormeza jest zatem opisywana jako kontrregulacja do wejścia (czynnika toksycznego), który zaburza równowagę i może powodować zmiany w tempie wzrostu (Oberbaum & Cambar 1994). Stebbing twierdził, że hormeza jest to tzw. specyficzna nadkorekcja, w wyniku której obserwowany jest większy niż normalnie wzrost, i że dla wyższych dawek jest potrzebna większa korekcja, która nie może być skompensowana przez dany system, dlatego jest obserwowana jako zahamowanie wzrostu (Oberbaum & Cambar 1994). Ponadto odkryto, że małe dawki toksycznych substancji nie wpływają na metabolizm glukozy w drożdżach (jednak mogą pobudzać glikogen), w przeciwieństwie do wysokich dawek, które go hamują (Oberbaum & Cambar 1994).

Szczególnym przykładem hormezy jest hormeza radiacyjna, która jest związana z korzystnym wpływem niskich dawek promieniowania na dany system biologiczny. Hormeza radiacyjna obejmuje następujące procesy: stymulację proliferacji, aktywację ścieżek sygnałowych związanych z autofagią, odpowiedzią immunologiczną, metabolizmem, a także z odpowiedzią na uszkodzenia DNA (ang. *DNA damage response, DDR*) (Bernhard et al. 2008; Mägdefrau et al. 2018). Badania pokazały, że niewielki stres związany z niskimi dawkami promieniowania powodujący uszkodzenia DNA może wpływać korzystnie na przeżycie komórek eukariotycznych. Obserwowano obniżenie poziomu uszkodzeń chromosomów, a także opóźnienie procesów starzenia, co może być związane ze zwiększoną aktywacją procesów naprawczych (Schumacher 2009; Szumiel 2012).

Ekspozycja komórek na niskie dawki promieniowania powoduje indukcję RFT, syntezę ATP, zmiany w przepuszczalności błony oraz uwolnienie NO, obserwowano także zmiany pH, a także w niektórych, szczególnych przypadkach zwiększoną proliferację (Zungu et al. 2009). Niskie dawki promieniowania powodują indukcję RFT, jednak komórki nie są w stanie rozróżnić, które RFT zostały wyprodukowane przez samą komórkę, np. podczas oddychania komórkowego, a które po ekspozycji na niskie dawki promieniowania

(Feinendegen et al. 2004). W ujęciu hormezy, RFT mogą zostać sklasyfikowane jako klasyczna toksyna, ponieważ mogą zachowywać się zarówno jako czynniki szkodliwe, uszkodzające komórki, jak i pełniące funkcję ochronne w zależności od stężenia (niskie stężenia H₂O₂ mogą stymulować proliferację fibroblastów, podczas gdy wyższe stężenia indukują apoptozę) (Murrell et al. 1990; Davies 1999).

Regulacja aktywności genów kodujących białka uczestniczące w systemach redoks

W komórkach regulacja odbywa się na wielu poziomach. Istnieją czynniki, które mogą wpływać nie tylko na poziom transkrypcji wybranych genów, ale także na poziom białek zaangażowanych w systemy redoks. Jednym z takich elementów regulacji w komórkach są mikro RNA (miRNA). MiRNA są to krótkie, jednoniciowe, niekodujące cząsteczki regulatorowe zbudowane zazwyczaj z ok. 21-23 nukleotydów biorące udział w potranskrypcyjnej regulacji genów. MiRNA tworzą kompleksy z białkami Argonautów (Ago), formując kompleksy RISC (ang. *RNA induced silencing complexes*), a następnie wiążą się (najczęściej) do rejonów niepodlegających translacji 3' UTR celowanego mRNA danego genu, hamując jego translację lub powodując degradację. miRNA wiążą się do mRNA przez komplementarność pomiędzy nukleotydami w pozycji 2-7 nukleotydów w rejonie końca 5' miRNA. Region interakcji miRNA-mRNA nazywany jest sekwencją „seed”, dzięki temu kompleks RISC łączy się ze specyficznymi transkryptami (Grenda et al. 2013; Ha & Kim 2014; Podralska et al. 2020). Geny miRNA są często zorganizowane w grupy i są zlokalizowane pomiędzy sekwencjami kodującymi białka, mogą istnieć jako niezależne grupy sekwencji lub wewnątrz sekwencji kodujących. Może to prowadzić do jednoczesnej transkrypcji miRNA oraz mRNA (Grenda et al. 2013; Ha & Kim 2014). Dojrzałe cząsteczki miRNA powstają w skomplikowanym procesie biogenezy, w którym wyróżnia się kilka podstawowych etapów, poprzedzających połączenie z białkami Ago i załadowanie miRNA do kompleksu RISC. MiRNA są zaangażowane w niemal wszystkie procesy komórkowe wliczając proliferację czy śmierć komórkową. Większość z genów kodujących białka jest kontrolowane przez miRNA, w związku z tym transkrypty genów związanych ze stanem redoks również podlegają takiej regulacji. Enzymy zaangażowane w produkcję i neutralizację RFT zawierają sekwencje, które mogą być hamowane lub degradowane przez wiele miRNA. Transkrypty tych genów są bezpośrednio hamowane przez

miRNA, zmieniając tym samym poziomy RFT w komórkach. Oznacza to, że równowaga redoks jest utrzymywana dzięki odpowiedniej regulacji miRNA-RFT (Ciesielska et al. 2021).

Matematyczne odwzorowywanie procesów zachodzących w komórkach i związanych z reaktywnymi formami tlenu

Do prawidłowego działania komórki wymagają określonych warunków oksydoredukcyjnych. Dlatego zachodzące w nich procesy utleniania i redukcji muszą być ściśle kontrolowane i tworzą sprzężone ze sobą systemy regulacyjne. Do lepszego zrozumienia procesów obserwowanych w komórkach przydatne są modele matematyczne, które w uproszczony sposób odwzorowują reakcje zachodzące w komórkach. Symulacje komputerowe pozwalają na prześledzenie wielu różnych wariantów zachowania się komórek. W literaturze istnieją różne modele opisujące systemy związane z reaktywnymi formami tlenu i reaktywnymi formami azotu. Istnieją modele produkcji RFT przez kompleksy I i II ETC, mitochondria i oksydazy NADPH, modele dyfuzji H_2O_2 , modele neutralizacji RFT, modele obejmujące sygnalizację Nrf2 (Aon et al. 2012), modele badające rolę $O_2^{\cdot -}$, modele związane z nitracją tyrozyny, a także modele dyfuzji i transportu NO i RFT (Cortassa et al. 2004). Na przykład w modelu Kembro i innych przedstawiono model dwukompartmentalny, który pozwala na badanie dynamiki RFT w mitochondriach. Pokazuje jak regulacja redoks może wpływać na funkcje mitochondriów, a także jaka jest rola kompartmentalizacji w modulacji środowiska redoks. W modelu brane są pod uwagę przede wszystkim NADH/NAD⁺, NADPH/NADP⁺, GSH/GSSG, TXN/TXNox (Kembro et al. 2013). Model stanowi narzędzie umożliwiające badanie interakcji między sieciami jonowymi, energetycznymi i metabolicznymi RFT w mitochondriach i jest rozwinięciem modelu opisanego w (Wei et al. 2011), w którym skupiano się głównie na energetyce mitochondrialnej, regulacji pH i dynamice jonów w mitochondriach. W modelu Ng i innych przedstawiono zależność pomiędzy neutralizacją H_2O_2 , a glutationem, model brał pod uwagę zależności wynikające ze stężenia glutationu dostępnego do redukcji H_2O_2 (Ng et al. 2007). W (Makino et al. 1994) zaprezentowano model, który bazując na wcześniej opracowanych modelach pokazuje dynamikę neutralizacji H_2O_2 . Skupia się on głównie na H_2O_2 , a nie na możliwych interakcjach występujących pomiędzy enzymami.

CELE PRACY

Głównym celem pracy jest sprawdzenie czy mechanizmy regulujące komórkowy stan oksydoredukcyjny działają podobnie we wszystkich typach komórek. W związku z tym kluczowe jest sprawdzenie czy w komórkach różnych typów enzymy zaangażowane w te procesy są regulowane na poziomie transkrypcji i czy można wykazać znamienne różnice międzykomórkowe, np. w ekspresji genów zaangażowanych w produkcję i neutralizację reaktywnych form tlenu i azotu. Równie ważne wydaje się zbadanie czy poziomy enzymów zaangażowanych w regulację procesów oksydoredukcyjnych mogą być regulowane w procesie translacji na drodze oddziaływań z miRNA.

Stres oksydacyjny w komórkach może powstawać pod wpływem czynników środowiskowych, takich jak promieniowanie jonizujące lub UV. Kolejnym celem niniejszej pracy było zbadanie czy komórki w podobny sposób odpowiadają na czynniki środowiskowe indukujące stres oksydacyjny.

Jedną z głównych reaktywnych form tlenu obecnych we wszystkich komórkach jest H_2O_2 , który może pełnić funkcje cząsteczki sygnalizacyjnej w sygnalizacji wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej. Następnym celem było stworzenie modelu matematycznego opisującego proces neutralizacji H_2O_2 i porównanie systemów neutralizacji tego rodnika przy wykorzystaniu symulacji komputerowych w różnych typach komórek.

Szczegółowe cele pracy:

- Analiza ekspresji genów związanych z reaktywnymi formami tlenu i azotu w komórkach pochodzących z różnych tkanek w oparciu o dostępne bazy danych (ok. 1000 linii komórkowych)
- Porównanie systemów neutralizacji rodników tlenowych w komórkach hodowanych in vitro Me45 i HCT116
- Zbadanie wpływu promieniowania UVA i jonizującego na poziomy RFT i RFA oraz na procesy komórkowe z wykorzystaniem badań eksperymentalnych na komórkach Me45 i HCT116 hodowanych in vitro.
- Poszukiwanie wagi poszczególnych elementów systemów regulujących H_2O_2 przy użyciu symulacji komputerowych z wykorzystaniem danych dotyczących ekspresji wybranych genów dostępnych w bazach danych.

MATERIAŁY I METODY

Hodowla komórkowa

Eksperymenty zostały wykonane z użyciem dwóch linii komórkowych: ludzkiego czerniaka Me45 (linia wyprowadzona w Centrum Onkologii w Gliwicach z węzła chłonnego przerzutu pierwotnego nowotworu skóry) (Krzywon et al. 2018) oraz komórek nowotworu jelita grubego HCT116 (ang. *Human Colorectal Carcinoma*; p53+/, ATCC). Hodowlę komórek prowadzono w inkubatorze w standardowych warunkach tj. w 37°C, przy 5% stężeniu CO₂ oraz stałej wilgotności 80%. Komórki obu linii hodowano w pożywce DMEM/F12 (PAN, Biotech, Aidenbach, Niemcy, nr kat. P04- 1150) wzbogaconej w 10% wołową surowicę płodową (EURx, Gdańsk, Polska, nr kat. E5050-03-500). Kiedy komórki osiągały około 80% konfluencji pasażowano je z użyciem roztworu trypsyny/EDTA (PAN, Biotech, Aidenbach, Niemcy, nr kat. P10-024100). Naczynia hodowlane dobierano w zależności od potrzeb oraz rodzaju eksperymentu. Analizę danych mikromacierzowych zawierających ekspresję genów związanych ze stanem redoks wykonano dodatkowo dla linii komórkowej białaczki erytroidalnej pochodzenia szpikowego K562 (ang. *human immortalised myelogenous leukemia*, linia wyprowadzona od pacjenta z przewlekłą białaczką szpikową z przełomem blastycznym, ATCC-CCL243).

Warunki napromieniania komórek

Komórki napromieniowywano z otwartymi wieczkami w temperaturze pokojowej (21°C) różnymi dawkami z zakresu 0,05–50 kJ/m² promieniowania UVA (365nm) generowanego przez urządzenie UV Crosslinker (model CL-1000, UVP, Upland, CA, USA). Odległość od źródła promieniowania wynosiła: 160 mm. Temperatura w urządzeniu dla dawki 10kJ/m² wzrosła o ok. 2°C. Uwzględniając temperaturę pokojową 21°C, wzrost ten nie miał wpływu na komórki, zaobserwowane zmiany mają związek jedynie z działaniem promieniowania UVA, z pominięciem szoku cieplnego.

Test klonogeny

Test klonogeny jest to test opracowany w 1955 roku przez T.T. Pucka i P.I. Marcusa pozwalający na ocenę przeżywalności i proliferacji komórek. W teście wykorzystywana jest

zdolność komórek do tworzenia kolonii przez pojedyncze komórki, gdzie kolonię definiuje się jako przynajmniej 50 komórek. Test klonogenny jest często wykorzystywany do oceny cytotoksyczności różnych czynników, a także wpływu promieniowania na populacje komórkowe (Franken et al. 2006).

Komórki Me45 i HCT116 wysiano na 60 mm szalki (Sarstedt, Numbrecht, Niemcy, nr kat. 83.3900) w ilości 1000-5000 na szalkę i napromieniowano z otwartymi wieczkami w temperaturze pokojowej (21°C) różnymi dawkami (0,05–50 kJ/m²) promieniowania UVA (365nm) generowanego przez urządzenie UV Crosslinker (model CL-1000, UVP, Upland, CA, USA). Zarówno komórki kontrolne, jak i napromieniowane inkubowano w zależności od linii komórkowej od 5 do 10 dni w standardowych warunkach. Po upływie określonego czasu, kolonie komórek utrwalano w 2 ml zimnego 96% etanolu przez 3 minuty, następnie komórki przepłukano roztworem PBS (PAN Biotech., Aidenbach, Niemcy, nr kat. P04-36500) oraz wybarwiono 0,5% roztworem błękitu metylenowego. Następnie zliczono komórki w koloniach zawierających więcej niż 50 komórek (estymowano pod mikroskopem) i obliczono frakcję przeżywającą (ang. *surviving fraction*) oraz wydajność posiewu (ang. *plating efficiency*) komórek napromieniowanych w odniesieniu do nienapromieniowanych komórek kontrolnych.

Oznaczanie reaktywnych form tlenu i azotu w komórkach

Oznaczanie poziomu wolnych rodników w komórkach może być realizowane za pomocą wielu specyficznych metod, takich jak np. spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR), spektroskopia elektronowego rezonansu spinowego (ESR) (Bartosz 2006) lub metod wykorzystujących właściwości optyczne takie jak luminescencja (np. chemiluminescencja (Kim et al. 2019)), czy fluorescencja (Gomes et al. 2005). Ze względu na wysoką czułość oraz prostotę pozyskiwania danych najczęściej wykorzystywane są metody fluorescencyjne, w których sygnał emitowany jest po reakcji znacznika fluorescencyjnego z RFT lub RFA. Poziom fluorescencji może być następnie zmierzony za pomocą mikroskopu, cytometrii przepływowej lub fluorymetru (Gomes et al. 2005).

W pracy wykorzystano trzy barwniki fluorescencyjne: DCFH-DA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, nr kat. 287810), MitoSox Red (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, nr kat.

M36008) oraz DAF-FM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, nr kat. D23844). DCFH-DA jest to chemicznie zredukowana forma fluoresceiny (H_2DCFDA) używana jako wskaźnik RFT w komórkach, która podczas kontaktu z RFT i RFA rozkładana jest do wysoce fluorescencyjnej formy 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) (Gomes et al. 2005). Związek ten początkowo był uważany za specyficzny wskaźnik H_2O_2 w komórkach (Keston & Brandt 1965), jednak obecnie udowodniono, że DCFH może być także utleniany przez inne rodzaje RFT, takie jak HO^\bullet i ROO^\bullet , a także RFA takie jak $^\bullet NO$ oraz $ONOO^-$ (Crow 1997). MitoSOX Red jest to barwnik używany do specyficznego wykrywania $O_2^{\bullet -}$. MitoSOX przy kontakcie z anionorodnikiem ponadtlenkowym zostaje utleniony i emituje czerwoną fluorescencję. Związek ten nie reaguje z innymi formami RFT i RFA (Robinson et al. 2008). DAF-FM (4-amino-5-metylamino-2',7'-difluorescein diacetate) jest to barwnik używany do wykrywania tlenu azotu. DAF-FM może przenikać przez błony komórkowe, po wejściu do komórki zmienia się w nieprzenikalną przez błony komórkowe formę. Związek ten nie jest fluorescencyjny, dopiero przy kontakcie z NO, tworzy fluorescencyjny benzotriazol (Namin et al. 2013).

Oznaczenie poziomu globalnych reaktywnych form tlenu

Oznaczenie poziomu wewnątrzkomórkowych RFT wykonano przy użyciu barwnika DCFH-DA, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, nr kat. 287810). Na 6 dołkowe płytki (Sarstedt, Numbrecht, Niemcy, nr kat. 83.3920.300) wysiano komórki linii HCT116 i Me45 w ilości 100000 na dołek. Wysiane komórki zebrano w fazie wzrostu i zawieszono w medium hodowlanym, do którego dodano barwnik 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, nr kat. 287810) w stężeniu 30 μM . Następnie inkubowano komórki przez 15 minut w temperaturze 37°C w ciemności, zwirowano, odsączono zawiesinę i zawieszono ponownie w PBS. Próbki przechowywano na lodzie do czasu pomiaru cytometrycznego. Poziom RFT tj. intensywność fluorescencji zmierzono za pomocą cytometru (Becton Dickinson FACS Canto) używając konfiguracji dla kanału FITC (488 nm laser line, LP mirror 503, BP filter 530/30) dla 10000 komórek na próbkę. Wyniki przedstawiono jako średnią fluorescencję \pm odchylenie standardowe dla trzech niezależnych eksperymentów.

Oznaczenie poziomu anionorodnika ponadtlenkowego

Do pomiaru anionorodnika ponadtlenkowego w komórkach użyto barwnika MitoSox Red (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, nr kat. M36008). Na 6 dołkowe płytki (Sarstedt, Numbrecht, Niemcy, nr kat. 83.3920.300) wysiano komórki linii HCT116 i Me45 w ilości 100000 na dołek. Wysiane komórki zebrano w fazie wzrostu i zawieszono w medium hodowlanym, do którego dodano barwnik MitoSox Red w stężeniu 5 μ M. Następnie inkubowano komórki przez 20 minut w temperaturze 37°C, w ciemności, zwirowano, odsączono zawiesinę i zawieszono ponownie w PBS. Próbkę przechowywano na lodzie do czasu pomiaru cytometrycznego. Poziom anionorodnika tj. intensywność fluorescencji zmierzono za pomocą cytometru (Becton Dickinson FACS Canto) używając konfiguracji (488 nm laser line, LP mirror 566, BP filter 585/42) dla 10000 komórek na próbkę. Wyniki przedstawiono jako średnią fluorescencję \pm odchylenie standardowe dla trzech niezależnych eksperymentów.

Oznaczanie poziomu tlenu azotu

Do pomiaru tlenu azotu w komórkach użyto barwnika DAF-FM, 4-amino-5-metylamino-2',7'-difluorescein diacetate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, nr kat. D23844). Na 6 dołkowe płytki (Sarstedt, Numbrecht, Niemcy, nr kat. 83.3920.300) wysiano komórki linii HCT116 i Me45 w ilości 100000 na dołek. Wysiane komórki zebrano w fazie wzrostu i zawieszono w medium hodowlanym, do którego dodano barwnik DAF-FM w stężeniu 1 μ M. Następnie inkubowano komórki przez 30 minut w temperaturze 37°C w ciemności, zwirowano, odsączono zawiesinę i zawieszono ponownie w PBS. Poziom NO, tj. intensywność fluorescencji zmierzono za pomocą cytometru (Becton Dickinson FACS Canto) używając konfiguracji dla kanału FITC (488 nm laser line, LP mirror 503, BP filter 530/30) dla 10000 komórek na próbkę. Wyniki przedstawiono jako średnią fluorescencję \pm odchylenie standardowe dla trzech niezależnych eksperymentów.

Ekspresja genów związanych ze stanem redoks w komórkach, analiza mikromacierzy mRNA

Mikromacierze DNA jest to technologia rozwijana od lat 80 XX wieku, w której wykorzystuje się ideę badania ekspresji wielu genów jednocześnie. Obecnie mikromacierze

są powszechnie stosowane m.in. w badaniach toksykologicznych czy medycynie, w szczególności w onkologii w diagnostyce i terapii nowotworów (Kazula 2009; Bumgarner 2013).

W pracy wykorzystano dane z eksperymentów mikromacierzowych dostępne w bazie danych ArrayExpress pod numerem E-MEXP-2623 (Athar et al. 2018). W przedstawionych mikromacierzach za pomocą techniki mikromacierzy Affymetrix sprawdzano zmiany ekspresji genów komórek kontrolnych i napromieniowanych. Komórki linii HCT116, Me45 oraz K562 wystawiono na działanie promieniowania jonizującego w dawce 4Gy (1Gy/min, w systemie Clinac 600 GMV). Dokładne dane dotyczące hodowli komórek, warunków napromieniania oraz używanych metod mikromacierzowych przedstawiono w (Rzeszowska-Wolny et al. 2009; Herok et al. 2010). Wszystkie dane są zgodne z MIAME, a jakość mikromacierzy oceniano za pomocą pakietu simpleaffay Bioconductor (Claire & Miller 2005). Surowe dane oparte na HG-U133A otrzymane z dwóch eksperymentów przetwarzano przy użyciu Brainarray EntrezGene specific custom CDF (v22) (Dai et al. 2005) w języku R używając algorytmu Robust MultiArray Average (RMA) z biblioteki Affy Bioconductor (Gautier et al. 2004). Różną ekspresję genów określono za pomocą algorytmu limma z korekcją q-wartości dla wielokrotnego testowania (Storey & Tibshirani 2003; Ritchie et al. 2015).

Wybór genów związanych ze stanem redoks

Geny kodujące białka związane ze stanem redoks wyznaczono przy użyciu bazy danych Gene Ontology (GO) (Ashburner et al. 2000; The Gene Ontology Consortium 2019). Wyszukiwanie przeprowadzono na podstawie określeń w języku angielskim związanych ze stanem redoks takich jak: *oxide*, *superoxide*, *nitric oxide*, *hydrogen peroxide*, *ROS*, *reactive oxygen species*, *NO synthase* oraz *NADPH oxidases*. W ten sposób zidentyfikowano 574 geny, których ekspresje porównywano w obrębie linii HCT116, Me45 i K562 dla komórek kontrolnych i napromieniowanych 4Gy promieniowania jonizującego.

Ekspresja genów związanych ze stanem redoks w różnych typach komórek

Ekspresję genów związanych ze stanem redoks dla różnych linii komórkowych wyznaczono na podstawie danych RNA-seq dostępnych w bazie danych Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) (Ghandi et al. 2019). Analizę przeprowadzono dla 1025 nowotworowych linii

komórkowych pochodzących z różnych tkanek. Znormalizowane odczyty porównano w skali logarytmicznej dla 29 genów przydzielonych do odpowiednich kategorii w zależności od ich powiązania z procesami redoks (np. geny związane z neutralizacją H_2O_2) i przedstawiono na tzw. heatmapie.

Wybór miRNA odpowiedzialnych za hamowanie ekspresji genów związanych ze stanem redoks

Dokonano selekcji genów odpowiedzialnych za produkcję i neutralizację RFT i RFA, a następnie znaleziono miRNA odpowiedzialne za hamowanie ich ekspresji. miRNA bezpośrednio hamujące transkrypty danego genu, których interakcja została potwierdzona za pomocą testu lucyferazy wyszukano z dostępnych danych literaturowych. MiRNA hamujące dany gen rozpoznane za pomocą innych metod zostały wyselekcjonowane z bazy miRTarBase (Huang et al. 2020).

Model matematyczny

Równania do modelu matematycznego zostały zaimplementowane w środowisku Matlab Simulink, w którym zostały wykonane wszystkie symulacje przedstawione w pracy. Wersja MATLABa, której używano to R2021a.

Analiza statystyczna

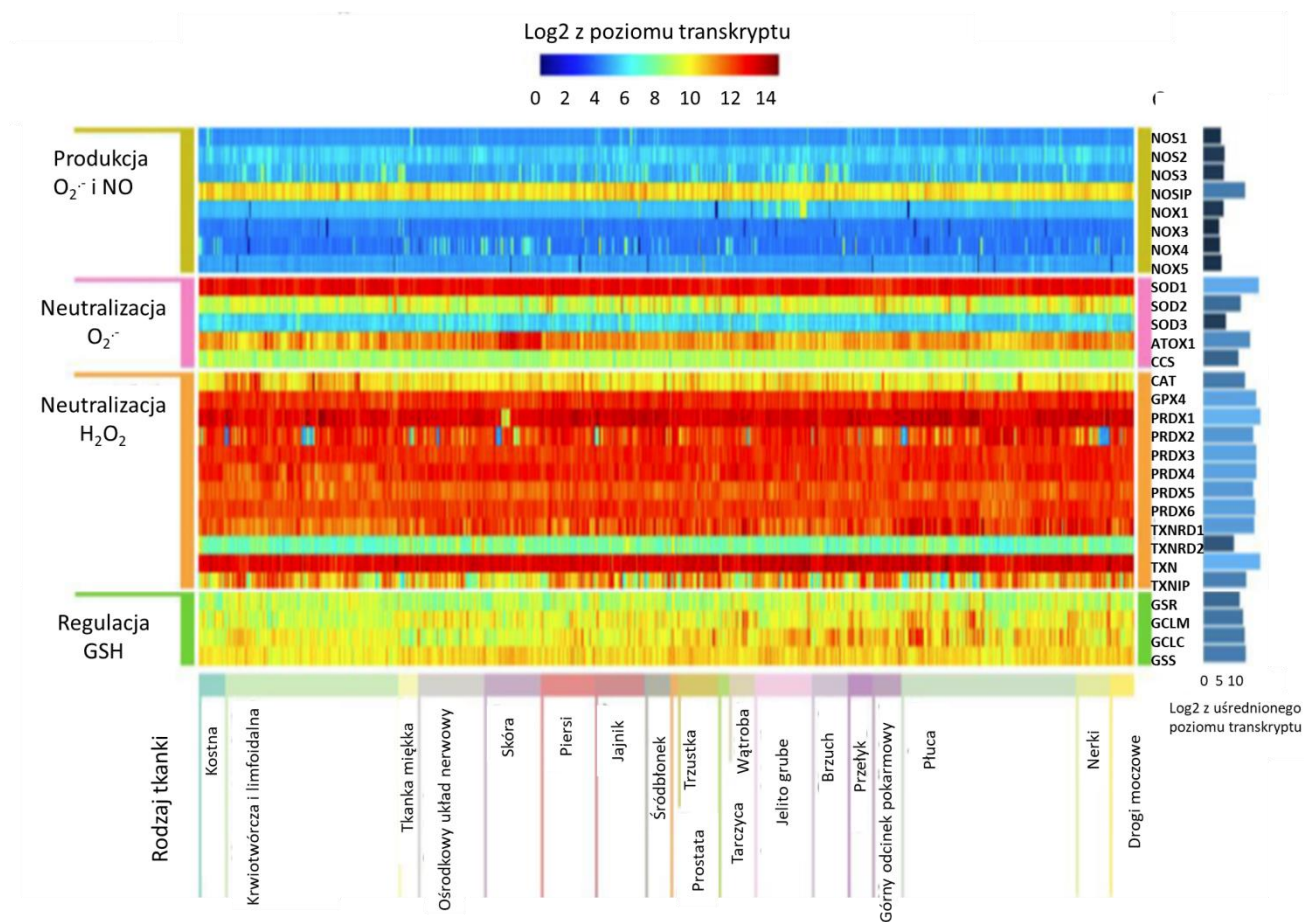
Dla wszystkich wykonanych eksperymentów wykonano co najmniej trzy niezależne powtórzenia. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm odchylenie standardowe. Niektóre z wyników prezentowano jako krotność zmiany w odniesieniu do komórek kontrolnych. Różnice pomiędzy próbkami testowano za pomocą dwustronnego testu t-Studenta i uznawano za znamienne statystycznie przy p-wartości $<0,05$. Analizę statystyczną przeprowadzono w środowisku Matlab (wersja R2020a).

WYNIKI

Ekspresja enzymów uczestniczących w regulacji redoks w różnych typach komórek

W pracy porównano ekspresję transkryptów kodujących białka biorące udział w regulacji neutralizacji RFT i RFA w komórkach. Większość z tych enzymów jest wysoko ekspresjonowana, co oznacza, że są one ważnym elementem regulującym RFT. W pracy przeprowadziłam analizy ekspresji genów kodujących enzymy uczestniczące w regulacji stanu redoks, porównując poziomy transkryptów tych genów w ponad 1000 typów komórek nowotworowych z różnych tkanek. Do uzyskania danych dla tysięcy linii komórkowych, które można bezpośrednio porównywać wykorzystano zasoby dostępne w bazie danych Cancer Cell Line Encyclopedia (Ghandi et al. 2019). Następnie porównałam ekspresję genów w wielu różnych typach komórek. Na rysunku 2 przedstawiono wyniki dla wszystkich 1025 typów komórek jako mapę cieplną. Komórki (w kolumnach) pogrupowano według tkanki, z której pochodzą, a geny pogrupowano w rzędach według pełnionych przez nie funkcji. Po prawej stronie mapy cieplnej podane zostały średnie wartości poziomów transkrypcji każdego genu (\log_2) we wszystkich liniach komórkowych.

Ekspresja genów zaangażowanych w produkcję i neutralizację O_2^- i NO jest podobna w większości komórek, ale obserwuje się również specyficzność do typu komórek i specyficzność tkankową (Rysunek 2). Geny kodujące białka uczestniczące bezpośrednio w produkcji O_2^- i NO mają niski poziom transkryptów we wszystkich typach komórek. Dysmutazy anionorodnika nadadtlenkowego, które neutralizują O_2^- , mają ekspresję ściśle zależną od izoenzymu: SOD1 ma najwyższą, SOD3 najniższą, a SOD2 ma ekspresję pośrednią między pozostałymi dwoma (Rysunek 2). ATOX1, który przekazuje jony miedzi do SOD3, wydaje się mieć ekspresję zależną od linii komórkowej, która jest szczególnie wysoka w liniach komórkowych nowotworów skóry (nie jest jasne, czy jest on specyficzny dla komórek nowotworów skóry, czy jest również obserwowany w normalnych komórkach skóry).



Rysunek 2. Mapa termiczna ekspresji enzymów biorących udział w produkcji $O_2^{\cdot-}$, NO i H_2O_2 oraz ich neutralizacji w 1025 liniach komórkowych pochodzących z różnych tkanek.

Główne enzymy kierujące neutralizacją H_2O_2 wykazują w większości podobną, ale wysoką ekspresję w różnych liniach komórkowych. Oznacza to, że neutralizacja H_2O_2 musi być bardzo ważna dla komórek. W szczególności GPX4 ma nieco wyższą ekspresję niż inne enzymy neutralizujące, a CAT, TXNRD2 i TXNIP niższą. W przypadku grupy enzymów neutralizujących H_2O_2 , nie można wyróżnić znaczących różnic tkankowych, jednak dla komórek skóry oraz wątroby obserwowana jest niższa ekspresja genu TXNIP, a w komórkach nowotworowych piersi, górnego odcinka pokarmowego oraz jelita grubego podwyższona. W komórkach nerek można zaobserwować niższy poziom PRDX2. W innych przypadkach ekspresja jest podobna, zauważalne są jednak różnice pomiędzy liniami komórkowymi o tym samym pochodzeniu tkankowym, np. dla genu TXNIP w komórkach

jajnikowych lub dla katalazy w przypadku tkanki hematopoetycznej i limfoidalnej. W przypadku genów związanych z regulacją glutationu, obserwowane są różnice w ich ekspresji, jednak żaden przedstawiony gen nie różni się znacząco w przedstawionych tkankach, co może oznaczać, że regulacja ta jest podobna w różnych typach komórek. W innych tkankach poziomy ekspresji, nie różnią się znacząco od średniej, ale niektóre tkanki nie są reprezentowane przez wystarczającą liczbę linii komórkowych pozwalających na identyfikację ekspresji specyficznej tkankowo.

Kontynuując badania dokonałam dokładniejszej analizy dla dwóch linii komórkowych Me45 i HCT116, ze względu na dostępność tych linii w laboratorium Centrum Biotechnologii, w którym pracuję. Linia Me45 nie została umieszczona na mapie cieplnej, ponieważ nie ma jej w bazie danych, a wyniki ekspresji genów przeprowadzone w laboratorium ze względu na system oznaczania mikromacierzowego są niemożliwe do porównania. Aby uzyskać więcej informacji na temat mechanizmów, które mogą pojawiać się w komórkach, porównałam ekspresję różnych genów kodujących białka zaangażowane bezpośrednio lub pośrednio w procesy redoks w tych liniach komórkowych. Poziomy ekspresji ponad 500 genów znalezionych na podstawie terminów ontologicznych porównałam przy użyciu danych z mikromacierzy dla komórek Me45 i HCT116 (Jaksik et al. 2014). Obie linie komórkowe mają wysoką ekspresję genów zaangażowanych w regulację redoks, a ekspresja niektórych z tych genów jest znacznie wyższa w komórkach Me45 lub HCT116. Przykłady takich genów przedstawiłam w tabeli 1.

Komórki Me45 mają niższy poziom transkryptów tioredoksyny (TXN) i peroksyredoksyny (PRDX) oraz wyższy poziom transkryptów białka hamującego tioredoksynę (TXNIP). Z drugiej strony, geny kodujące S-transferazy glutationowe (GST) wykazują wyższą ekspresję w komórkach Me45, przy czym największa różnica jest widoczna dla transkryptu GSTM3. Transkrypty przeciwutleniacza ATOX1, który może zwiększać aktywność białka SOD1 poprzez dostarczanie jonów miedzi i wpływać na ekspresję genu SOD3 jako czynnika transkrypcyjnego (Culotta et al. 2006; Ozumi et al. 2012), są ponad 10 razy liczniejsze w Me45 niż w komórkach HCT116. Istnieje również kilka genów, których ekspresja jest znacznie wyższa w komórkach HCT116, na przykład cyklohydrolaza GTP 1, która koduje enzym ograniczający szybkość biosyntezy tetrahydrobiopteryny (BH4), kofaktora wymaganego do aktywności syntaz tlenu azotu (Crabtree et al. 2013; Benson et al. 2013).

Geny o wyższej ekspresji w komórkach Me45 niż w komórkach HCT116			
Nazwa genu	Symbol genu	Poziom transkryptu w komórkach Me45 [j.u.]*	Stosunek poziomu transkryptu komórek Me45 do HCT116
Glutathione S-Transferase Mu 3	<i>GSTM3</i>	299	27
Antioxidant 1 Copper Chaperone	<i>ATOX1</i>	3336	11,3
Thioredoxin Interacting Protein	<i>TXNIP</i>	346	10,7
Glutathione S-Transferase Alpha 4	<i>GSTA4</i>	316	3
Peroxidasin	<i>PXDN</i>	80	2,8
Geny o wyższej ekspresji w komórkach HCT116 niż w komórkach Me45			
Nazwa genu	Symbol genu	Poziom transkryptu w komórkach HCT116 [j.u.]*	Stosunek poziomu transkryptu komórek HCT116 do Me45
GTP Cyclohydrolase 1	<i>GCHI</i>	260	19
Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase 1	<i>DDAHI</i>	279	11
Thioredoxin Like 1	<i>TXNLI</i>	1281	4
Glutamate-Cysteine Ligase Modifier Subunit	<i>GCLM</i>	170	3,4
Thioredoxin Related Transmembrane Protein 1	<i>TMX1</i>	397	2,5
Peroxiredoxin 2	<i>PRDX2</i>	1448	2,5
Thioredoxin	<i>TXN</i>	2269	2,4

Tabela 1. Ekspresja genów w komórkach Me45 i HCT116 (dane mikromacierzowe). *jednostki umowne otrzymane ze znormalizowanych danych mikromacierzowych

Regulacja aktywności genów kodujących białka uczestniczące w systemach redoks

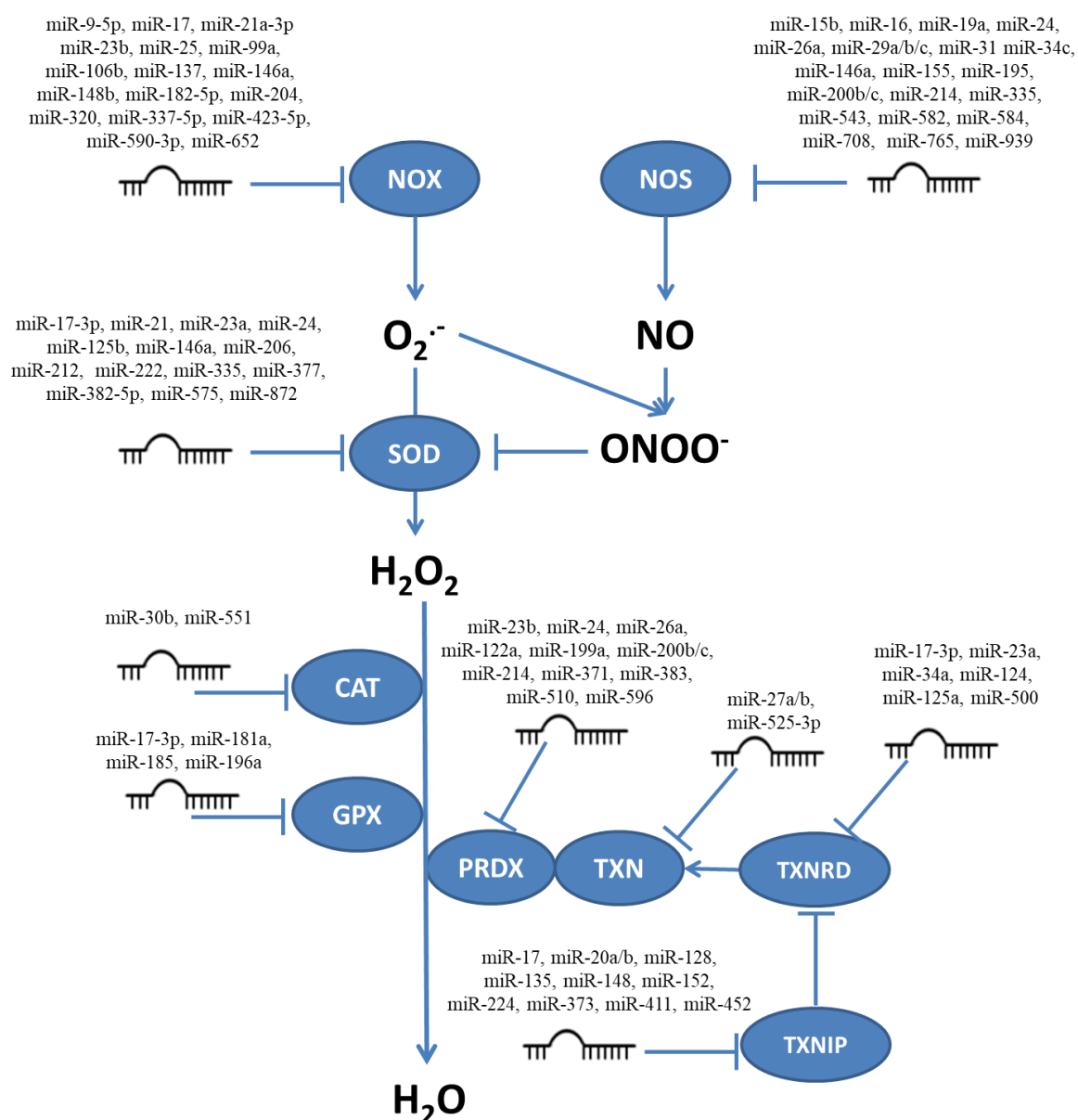
W następnym etapie analizy regulacji systemów redoks, sprawdzałam czy istnieją czynniki, które mogą wpływać nie tylko na poziom ekspresji wybranych genów, ale także na poziom białek zaangażowanych w systemy redoks. Jednym z takich elementów regulacji w komórkach są miRNA. W celu sprawdzenia czy RFT są regulowane na poziomie translacji przeanalizowałam wpływ miRNA na enzymy produkujące i neutralizujące RFT, a także ich ewentualny wpływ na procesy komórkowe. Zebrane dane pokazują, że istnieje regulacja mRNA przez miRNA, co pokazano w przykładach wskazując na efekty związane z proliferacją i apoptozą komórek.

Reaktywne formy tlenu uczestniczą w sygnalizacji wewnątrz- i międzykomórkowej, a komórki zawierają specyficzne systemy, które regulują homeostazę redoks. Systemy

regulujące RFT w komórkach obejmują zarówno enzymy, które mogą wytwarzać RFT, takie jak NADPH-zależne i inne oksydazy lub syntazy tlenu azotu, oraz enzymy neutralizujące RFT, takie jak dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, peroksyredoksyny, tioredoksyny, reduktazy tioredoksyny, peroksyreduktazy glutationowe i wiele innych. Większość genów kodujących te enzymy zawiera sekwencje, w które celują mikro RNA (miRNA), będące elementami kompleksów wyciszających. MiRNA odgrywają ważną rolę w hamowaniu translacji ich docelowych matrycowych RNA (mRNA). W tym rozdziale opisano miRNA, które bezpośrednio hamują i przez to mogą wpływać na enzymy odpowiedzialne za neutralizację RFT i ich możliwą rolę w utrzymaniu homeostazy redoks.

Enzymy zaangażowane w produkcję i neutralizację RFT zawierają sekwencje, które mogą być hamowane lub degradowane przez wiele miRNA. Rysunek 3 pokazuje miRNA, które celują w transkrypty enzymów związanych z produkcją RFT i RFA, takich jak NOX i NOS oraz z konwersją O_2^- do H_2O_2 , takich jak SOD, a także miRNA, które celują w transkrypty enzymów związanych z neutralizacją H_2O_2 przez enzymy takie jak katalaza, peroksydazy glutationowe oraz peroksyredoksyny z tioredoksynami. Wpływ miRNA na enzymy docelowe przedstawiam tylko dla tych miRNA, dla których znalazłam potwierdzenie eksperymentalne w literaturze. Dokładny opis miRNA, które wpływają na enzymy produkujące i neutralizujące RFT został opublikowany w (Ciesielska et al. 2021).

Dane zebrane dla różnych miRNA, których celem są NOX i NOS sugerują, że te dwa enzymy mogą regulować przeżycie komórek poprzez generowanie RFT i wykazywać przeciwne efekty związane zarówno z sygnałami pro-przeżyciowymi (ang. *pro-survival*), jak i proapoptycznymi (ang. *pro-apoptotic*) (Ciesielska et al. 2021). Termin „pro-survival” obejmuje wzrost proliferacji i zmniejszenie apoptozy, a „pro-apoptotic” odwrotnie, terminy te wprowadziłam na podstawie danych literaturowych dotyczących zmian w komórkach.



Rysunek 3. MiRNA celujące w enzymy odpowiedzialne za produkcję (NOX i NOS) i neutralizację anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$) i tlenku azotu (NO) wraz z dysmutazą ponadtlenkową (SOD), która przekształca $O_2^{\cdot-}$ w H_2O_2 oraz odpowiedzialne za neutralizację H_2O_2 . ⊥ oznacza inhibicję.

Nadmierne poziomy RFT mogą powodować śmierć lub starzenie się komórek, a ich poziom może wpływać na przeżycie komórek. Przedstawione w niektórych pracach zahamowanie NOX przez miRNA powodowało obniżenie poziomu RFT, co skutkowało zahamowaniem apoptozy i indukcją proliferacji m.in. w komórkach soczewki ludzkiej oraz w mysich podocytach (Y. Xu et al. 2018; Li et al. 2020); natomiast w przypadku gruczolaka płuca i nowotworu prostaty obserwowano efekt odwrotny - zahamowanie NOX przez miRNA indukowało apoptozę i hamowało proliferację oraz wzrost nowotworu.

Przedstawione efekty związane z enzymem NOX dotyczyły różnych miRNA. W przypadku NOS zahamowanie translacji (NOS3) realizowane przez te same miRNA (miR-24 oraz miR-155) pozwalało na zaobserwowanie efektów pro-przeżyciowych w jednych typach komórek m.in. w kardiomiocytach i fibroblastach sercowych oraz efektów pro-apoptotycznych w innych typach komórek m.in. w trofoblastach (Meloni et al. 2013; Zhang et al. 2017).

W literaturze można znaleźć dane pokazujące, że zahamowanie enzymów antyoksydacyjnych zwiększa poziom RFT i intuicyjnie powinno negatywnie wpływać na komórki oraz powodować ich śmierć. Zmiany transkryptów GPX, PRDX i genów układu tioredoksynowego poprzez regulację miRNA prowadzą do zmian RFT w komórkach i mogą wpływać na przeżycie komórek (Tabela 2). W większości przedstawionych przez różne laboratoria wyników dla linii komórkowych, w których miRNA hamują transkrypty genów neutralizujących obserwowano efekt proapoptotyczny, jednak w niektórych komórkach, takich jak komórki niedrobnokomórkowego nowotworu płuc (ang. *non-small cell lung cancer*, NSCLC), nowotworu piersi lub komórek białaczki, spadek enzymów antyoksydacyjnych nie prowadził do apoptozy, ale raczej miał działanie pro-przeżyciowe, być może odzwierciedlając różnice w optymalnym poziomie RFT wymaganym do określonych procesów komórkowych w różnych typach komórek .

Celowany transkrypt i zwiększony poziom miRNA	Efekt komórkowy	Typ komórek	Referencja
GPX1 ⊣ miR-181a	Proapoptotyczny	Kardiomiocyty	(Wang et al. 2014)
GPX2 ⊣ miR-17-3p	Proapoptotyczny	Nowotwór prostaty	(Xu et al. 2010; Z. Xu et al. 2018)
GPX3 ⊣ miR-196a	Pro-przeżyciowy	NSCLC	(Liu et al. 2019)
PRDX1 ⊣ miR-510	Pro-przeżyciowy	Nowotwór piersi	(Guo et al. 2013)
PRDX1 ⊣ miR-596	Proapoptotyczny	Nowotwór żołądka	(Zhang & Dai 2019)
PRDX2 ⊣ miR-122a, miR-200b, miR-200c	Proapoptotyczny	Nowotwór wątrobowokomórkowy, nowotwór jelita grubego, nowotwór płuc	(Diao et al. 2010; Cortez et al. 2014; Lv et al. 2017)
PRDX3 ⊣ miR-383	Proapoptotyczny	Rdzeniak zarodkowy	(Li et al. 2013)
PRDX6 ⊣ miR-199a-3p	Pro-przeżyciowy	Białaczka	(Alemdehy et al. 2015)
PRDX6 ⊣ miR-24-3p, miR-371	Proapoptotyczny	Nowotwór żołądka, model myszy z heteroprzeszczepem PC9	(Sahu et al. 2016; Li et al. 2016)
TXN1 ⊣ miR-525-3p	Pro-przeżyciowy	EA, HeLa, RPE, U2-OS	(Kraemer et al. 2013)
TXNRD1 ⊣ miR-23a/b, miR124, miR-125a/b-5p	Proapoptotyczny	Komórki mięśnia szkieletowego, nowotwór płuc, nowotwór głowy i szyi, nowotwór wątrobowokomórkowy, ludzkie komórki nabłonka barwnikowego, nowotwór prostaty	(Xu et al. 2010; Tian et al. 2016; Hao et al. 2017; Mercatelli et al. 2017; Z. Xu et al. 2018; Hua et al. 2019;

Celowany transkrypt i zwiększony poziom miRNA	Efekt komórkowy	Typ komórek	Referencja
			Vo et al. 2019)
TXNRD2 † miR-34a	Proapoptotyczny	Komórki mezangialne	(Bai et al. 2011)
TXNIP † miR-20b, miR-135a, miR-152, miR-224, miR-224/452, miR-373, miR-411-5p	Pro-przeżyciowy	HUVECs, mikroglejowe komórki BV2, nowotwór trzustki, czerniak, nowotwór piersi, NSCLC	(Yan et al. 2011; Knoll et al. 2014; Zhu et al. 2015; Zhu et al. 2018; Zhang et al. 2019; Dong et al. 2020; Hu et al. 2020)
**TXNIP † miR-17 miR-148a	Proapoptotyczny	Komórki mięśnia sercowego myszy z cukrzycą, hepatocyty	(Dong et al. 2016; Heo et al. 2019)
**Poziomy miR-17 oraz miR-148a były obniżone, a zatem oczekiwano efektu proapoptotycznego † oznacza inhibicję.			

Tabela 2. Efekty komórkowe związane ze zwiększeniem poziomu miRNA, które celują w transkrypty enzymów neutralizujących H₂O₂. miRNA w szarych wierszach wykazują odwrotny wpływ na przeżycie komórek niż te w białych wierszach.

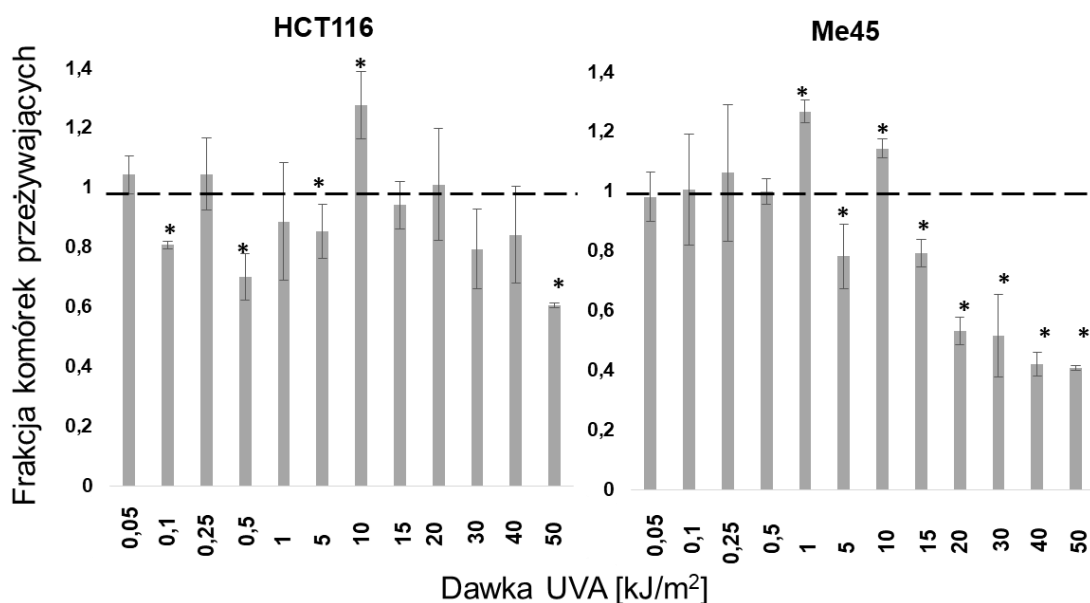
Źródło opracowanie własne, przekształcone z (Ciesielska et al. 2021).

Wpływ czynników środowiskowych na reaktywne formy tlenu

Komórki nowotworowe charakteryzują się nieograniczonymi możliwościami proliferacyjnymi, z tego względu badanie procesu proliferacji jest istotne w przypadku analiz związanych z takimi komórkami. W trakcie analiz zainteresowałam się tym, jak promieniowanie UV, na które jesteśmy nieustannie narażeni w środowisku może wpływać na komórki, stan redoks i procesy zależne od RFT. RFT i RFA odgrywają ważną rolę w wielu wewnątrz- i międzykomórkowych szlakach sygnałowych oraz uczestniczą w regulacji cyklu komórkowego (Menon & Goswami 2007). Promieniowanie UV może indukować RFT i RFA zwiększając tym samym ich poziom w komórkach (Bachelor & Bowden 2004). W pracy zbadano podstawowe mechanizmy regulacji redoks w komórkach, a przede wszystkim, czy i jak zmiany ich poziomu RFT w napromieniowanych komórkach mogą być związane z wpływem promieniowania, np. UVA na proliferację komórek ludzkiego czerniaka (Me45) i nowotworu jelita grubego (HCT116)

Komórki HCT116 i Me45 wystawiono na działanie różnych dawek promieniowania UVA (0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40 oraz 50 kJ/m²), a ich proliferację zbadano za pomocą testu klonogenego. Niektóre dawki stymulowały proliferację, a inne ją hamowały w porównaniu do nienapromieniowanych komórek kontrolnych w obu liniach komórkowych HCT116 i Me45. Odpowiedź komórek na promieniowanie była inna

w zależności od typu komórek, a dawki stymulujące klonogenność były specyficzne dla danej linii komórkowej (Rysunek 4). Komórki HCT116 wykazywały znamienne statystycznie wzrost tworzonych kolonii po ekspozycji na 10 kJ/m² (p-wartość 0,02) oraz spadek po 0,1, 40 i 50 kJ/m² (p-wartości 0,02, 0,05 i <0,01). Klonogenność komórek Me45 wzrosła po napromieniowaniu 1 i 10 kJ/m² (p-wartość <0,01), ale zmniejszyła się po 15 do 50 kJ/m² (odpowiednio p-wartości 0,01, 0,01, 0,045, 0,04 i <0,01).



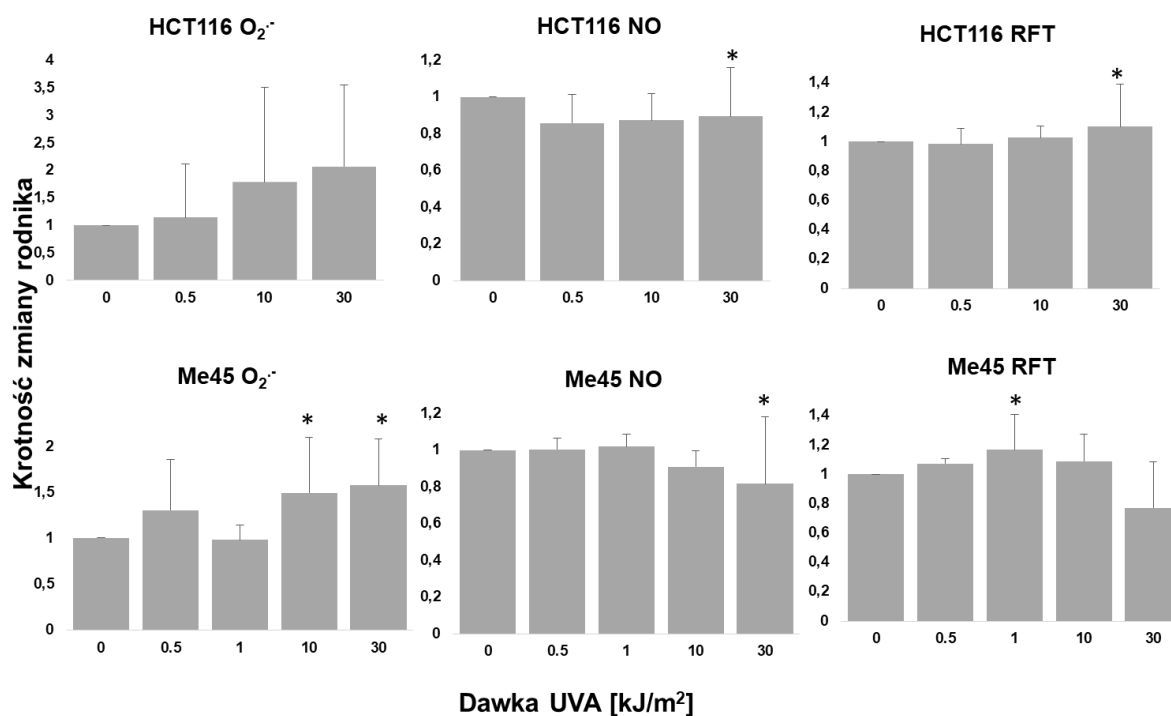
Rysunek 4. Klonogenność komórek po ekspozycji na różne dawki promieniowania UVA. (A) komórki HCT116, (B) komórki Me45. Dane pokazują średnią i odchylenie standardowe z 3 eksperymentów. Gwiazdki oznaczają znamienne statystycznie, pomiędzy komórkami napromieniowanymi i kontrolnymi ($p < 0,05$). Pozioma, przerywana linia reprezentuje poziom kontroli.

Poziom reaktywnych form tlenu w komórkach po ekspozycji na promieniowanie UVA

Testy klonogenne wskazywały, że UVA w dawce 30kJ/m² powoduje znaczne obniżenie klonogenności w komórkach Me45 i HCT116, natomiast dawka 10kJ/m² stymuluje tworzenie kolonii w obu liniach komórkowych, dawka 1kJ/m², stymuluje tworzenie kolonii w komórkach Me45, rozpoznano także dawki (np. 0,5kJ/m²), które nie miały widocznego wpływu na obie linie komórkowe. Dawki 0,5, 1, 10, oraz 30kJ/m² zostały wybrane do dalszych badań.

W celu porównania poziomów RFT i RFA w komórkach napromieniowanych różnymi dawkami UVA z tymi poziomami w komórkach kontrolnych, zastosowane zostały specyficzne sondy fluorescencyjne i cytometria przepływowa. Rysunek 5 przedstawia wpływ

UVA na poziomy: $O_2^{\cdot -}$, który jest wykrywany przez barwnik MitoSOX, NO wykrywany przez DAF-FM i RFT wykrywany przez DCFH-DA. Średnie wartości dla każdej dawki obliczono ze wszystkich dwunastu testów przeprowadzonych w różnych eksperymentach w różnych punktach czasowych.

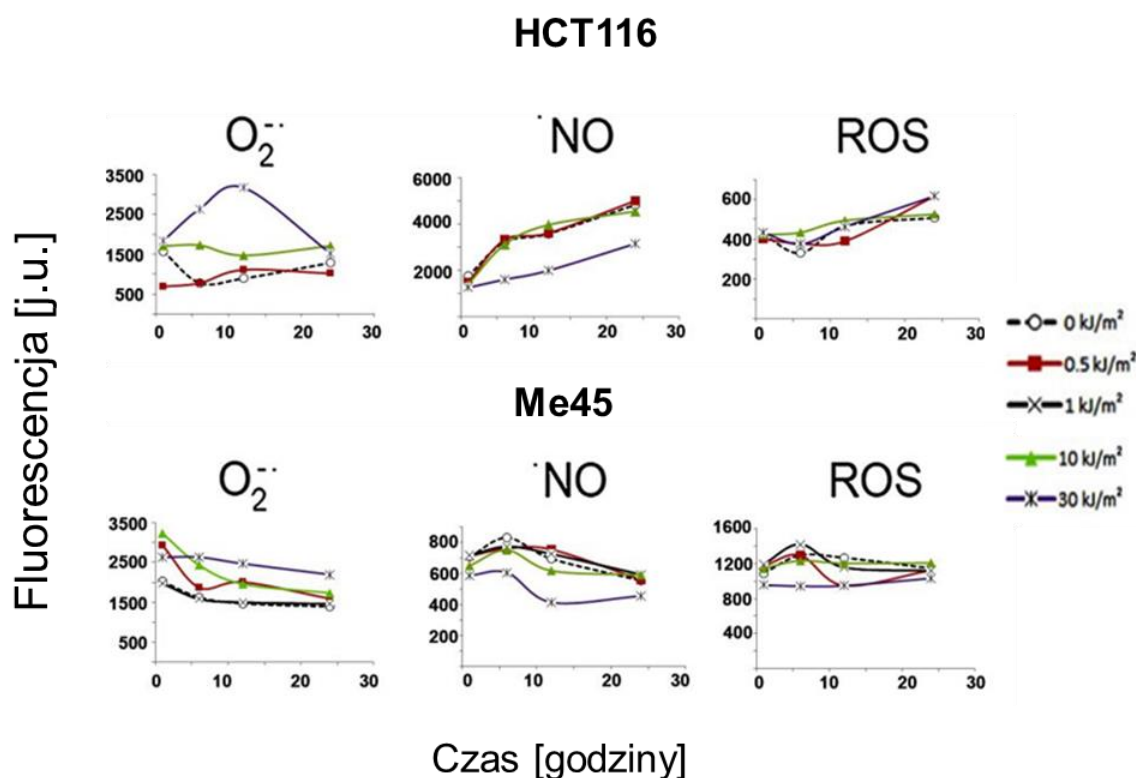


Rysunek 5. Średnie poziomy RFT, $O_2^{\cdot -}$ i NO w komórkach HCT116 i Me45 ekspozycyjnych na różne dawki promieniowania UVA. Wyniki przedstawiono jako krotność zmiany w napromieniowanych komórkach w porównaniu do nienapromieniowanej kontroli. Dane pokazują średnią i odchylenie standardowe z 4 eksperymentów; statystycznie istotne różnice ($p < 0,05$) oznaczono gwiazdkami.

Średnie poziomy RFT, $O_2^{\cdot -}$ i NO w komórkach HCT116 i Me45 nie zmieniają się znacząco po ekspozycji komórek na różne dawki promieniowania UVA. Jednak średnie poziomy anionorodnika ponadtlenkowego wykazywały tendencję do wzrostu wraz ze wzrostem dawki UVA w obu liniach komórkowych, ale zmiany te nie były istotne statystycznie. Poziomy NO nie zmieniły się lub nieznacznie spadły przy wyższych dawkach. Poziomy RFT wykryte za pomocą DCFH-DA również nie zmieniły się w napromieniowanych komórkach HCT116, ale komórki Me45 wykazywały niewielkie nieregularne wzrosty przy niższych dawkach i spadki przy wyższych dawkach. Barwnik DCFH-DA może wykrywać kilka różnych rodników, jednak po raz pierwszy został użyty do wykrywania H_2O_2 (Ubezio & Civoli 1994; Arnold et al. 2001) i wydaje się prawdopodobne, że zmiany RFT wykrywane przez ten barwnik odzwierciedlają głównie

zmiany poziomu H_2O_2 . Niektóre z różnic w średnich poziomach rodników RFT, $O_2^{\cdot-}$ lub NO między komórkami kontrolnymi, a napromieniowanymi były istotne statystycznie. Średni poziom NO w komórkach HCT116 i Me45 dla dawki 30kJ/m^2 był zmiennie niższy od średniego poziomu komórek kontrolnych, poziom $O_2^{\cdot-}$ w komórkach Me45 dla dawki 10 i 30kJ/m^2 był zmiennie wyższy niż w komórkach kontrolnych, a poziom RFT był zmiennie wyższy w komórkach HCT116 dla dawki 30kJ/m^2 oraz w komórkach Me45 dla dawki 1kJ/m^2 w porównaniu do komórek kontrolnych.

Stosowane dawki UVA nie zmieniły znacząco średnich poziomów RFT, jednak wpłynęły na ich wahania. Zmiany w czasie poziomów RFT i RFA oznaczanych za pomocą DCFH-DA, MITOSox oraz DAF-FM w komórkach napromieniowanych określoną dawką lub nienapromieniowanych przedstawiono na rysunku 6. Komórki Me45 i HCT116 reagowały na różne dawki z bardzo różną kinetyką poziomów rodników. Dynamika tych zmian była specyficzna dla typu komórki. Na pierwszy rzut oka trudno jest zidentyfikować cechy, które mogłyby być skorelowane ze zwiększonym lub obniżonym potencjałem klonogennym, który był obserwowany po napromienianiu niektórymi dawkami.



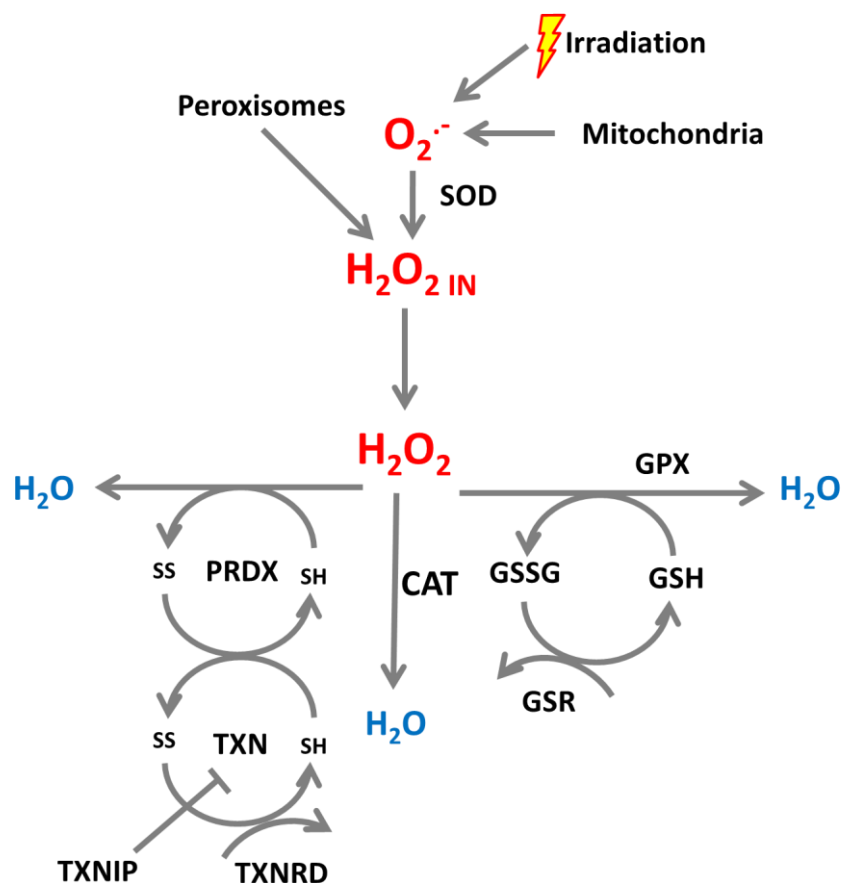
Rysunek 6. Zmiany anionorodnika nadadtlenkowego, tlenku azotu i RFT w czasie wykrywanych odpowiednio przez MITOSox, DAF-FM i DCFH-DA w komórkach kontrolnych i napromieniowanych UVA. Każda krzywa przedstawia wyniki po ekspozycji na konkretną dawkę UVA; dane są średnimi z trzech eksperymentów, słupki błędów nie zostały pokazane dla przejrzystości.

Poziomy wewnątrzkomórkowych RFT, O_2^- i NO, oznaczane za pomocą specyficznych barwników, zmieniały się w czasie zarówno w komórkach kontrolnych jak i napromienionych. W niektórych przypadkach kinetyka zmian poziomu RFT po ekspozycji na promieniowanie była podobna do kinetyki obserwowanej w komórkach kontrolnych; na przykład w obu typach komórek Me45 i HCT116 ogólny schemat zmian poziomu NO nie zmieniał się po napromieniowaniu, chociaż ich poziom różnił się (Rysunek 6), co sugeruje, że schemat zmian poziomu NO jest ważny dla mechanizmów regulacyjnych w obu typach komórek. W przypadku innych rodników podobieństwo między komórkami napromieniowanymi i kontrolnymi było znacznie niższe, na przykład w komórkach Me45 wahania poziomu anionorodnika ponadtlenkowego nie zmieniały się znacznie po napromieniowaniu i były podobne do wahań obserwowanych w komórkach kontrolnych, podczas gdy wahania w komórkach HCT116 różniły się w zależności od dawki UVA, gdzie przebiegi były odwrotne w komórkach kontrolnych do przebiegów obserwowanych po dawkach hamujących proliferację, ale podobne do przebiegów obserwowanych po dawkach stymulujących proliferację. W komórkach HCT116 poziom RFT wykryty przez DCFH-DA zmieniał się z większą regularnością niż w komórkach Me45, podczas gdy w komórkach Me45 napromieniowanych dawkami UVA hamującymi proliferację obserwowane były różnice w porównaniu do komórek kontrolnych. Wzrost tempa proliferacji po napromienianiu obserwowano, gdy wahania poziomu RFT zachowały schemat obserwowany w komórkach kontrolnych, oznacza to, że zachowanie schematu fluktuacji różnych rodników w obu liniach komórkowych było ważne.

Model matematyczny pozwalający na analizę mechanizmów neutralizacji reaktywnych form tlenu

Procesy regulacyjne RFT zapewniają prawidłowe funkcjonowanie komórek, a zaburzona równowaga, nazywana stresem oksydacyjnym, może prowadzić do śmierci komórki lub jej patologii. Zaobserwowane w badaniach i analizach różnice w ekspresji enzymów neutralizujących zasugerowały, że ważna byłaby możliwość przewidywania różnic w poziomach RFT dla różnych typów komórek. Istniejące modele matematyczne związane z neutralizacją RFT skupiały się głównie na procesach oksydacyjnych zachodzących w mitochondriach podczas gdy ja skupiłam się na różnicach w neutralizacji pomiędzy różnymi typami komórek, dlatego stworzyłam model matematyczny opisujący proces

neutralizacji H_2O_2 . Do porównań różnic międzykomórkowych wykorzystałam symulacje komputerowe i dane dotyczące ekspresji enzymów w różnych typach komórek z ogólnodostępnych baz danych. Na rysunku 7 przedstawiam schemat modelu neutralizacji H_2O_2 , który został zastosowany w symulacjach.



Rysunek 7. Schemat neutralizacji RFT wykorzystywany w modelu matematycznym (model konceptualny, wyodrębnienie szlaku neutralizacji H_2O_2 z sieci powiązań).

Przedstawiony w pracy model miał na celu sprawdzenie czy istnieją różnice, pomiędzy systemami neutralizacji H_2O_2 , w których wykorzystywane są następujące enzymy: peroksyredoksyny (PRDX) z tioredoksyną (TXN), peroksydaza glutationowa (GPX) wykorzystująca glutation, a także katalaza (CAT). Pierwsze dwa systemy są złożone i wymagają kilku reakcji utleniania i redukcji, dlatego zdecydowałam się uwzględnić te zależności w modelu. Peroksyredoksyna w formie zredukowanej (PRDX) zostaje utleniona (PRDXox), do ponownej redukcji wykorzystywana jest tioredoksyna (TXN), która następnie zostaje utleniona, a dalej ponownie zostaje zredukowana przez reduktazę tioredoksyny. W przypadku peroksydazy glutationowej do redukcji wykorzystywany jest glutation (GSH), który ulega utlenieniu (GSSG), a następnie jest zredukowany przez reduktazę glutationową.

Za pomocą stworzonego modelu próbowałam sprawdzić także czy istnieją różnice w neutralizacji H_2O_2 pomiędzy liniami komórkowymi, w których ekspresja enzymów neutralizujących jest różna, a ze względu na powiązanie RFT z promieniowaniem, przeanalizowałam również zależności poszczególnych systemów związane z radiowrażliwością i radioopornością.

Po wydzieleniu obiektu modelowania oraz jego otoczenia, stworzony został zbiór równań różniczkowych opisujących neutralizację H_2O_2 przez enzymy neutralizujące przedstawione na rysunku 7. Równania 1-7 zaimplementowano w środowisku Simulink będącym częścią pakietu środowiska MATLAB. Stworzony model posłużył do przeprowadzenia symulacji komputerowych.

$$\frac{dH_2O_2}{dt} = H_2O_2_{IN} - k_{CAT}H_2O_2 * CAT - k_{GPX}H_2O_2 * GSH * GPX - k_{PRDX}H_2O_2 * PRDX$$

$$\frac{dGSH}{dt} = -k_{GPX}H_2O_2 * GSH * GPX + k_{GSR}GSSG * GSR$$

$$\frac{dGSSG}{dt} = k_{GPX}H_2O_2 * GSH * GPX - k_{GSR}GSSG * GSR$$

$$\frac{dPRDX}{dt} = -k_{PRDX}H_2O_2 * PRDX + k_{TXN}TXN * PRDX_{ox}$$

$$\frac{dPRDX_{ox}}{dt} = k_{PRDX}H_2O_2 * PRDX - k_{TXN}TXN * PRDX_{ox}$$

$$\frac{dTXN}{dt} = -k_{TXN}TXN * PRDX_{ox} + k_{TXNR}TXN_{ox} * TXNR$$

$$\frac{dTXN_{ox}}{dt} = k_{TXN}TXN * PRDX_{ox} - k_{TXNR}TXN_{ox} * TXNR$$

Zbiór równań 1. Równania opisujące neutralizację H_2O_2 w komórkach

W zbiorze równań 1: [PRDX], [PRDX_{ox}], [TXN], [TXN_{ox}], [GSH], [GSSG] oznaczają stężenia odpowiednio peroksyredoksyny, peroksyredoksyny utlenionej, tioredoksyny, tioredoksyny utlenionej, glutationu i utlenionego glutationu. Założyłam, że sumaryczna ilość form zredukowanych i utlenionych jest stała i typowa dla komórki. Należy uwzględnić, że $PRDX_{TOTAL} = PRDX + PRDX_{ox}$, $GSH_{TOTAL} = GSH + GSSG$, $TXN_{TOTAL} = TXN + TXN_{ox}$. W implementacji przyjąłam również, że stężenia GSR, GPX, TXNR, CAT są wartościami stałymi, zależnymi od typu komórek. Założyłam, że w komórkach dopływ H_2O_2

w komórkach jest w przybliżeniu stały i składa się na niego wiele czynników, np. stały dopływ z mitochondriów lub peroksysomów czy zwiększony dopływ po napromieniowaniu komórek. W równaniu (1) H_2O_{2IN} ma odzwierciedlać ten stały dopływ RFT. W moich symulacjach rozważyłam sytuację, w której napromienienie było krótkotrwałe i powodowało podwyższenie H_2O_2 , dlatego do implementacji zastosowałam funkcję skokową o odpowiednio krótkim czasie trwania, które również zostało oznaczone jako H_2O_{2IN} .

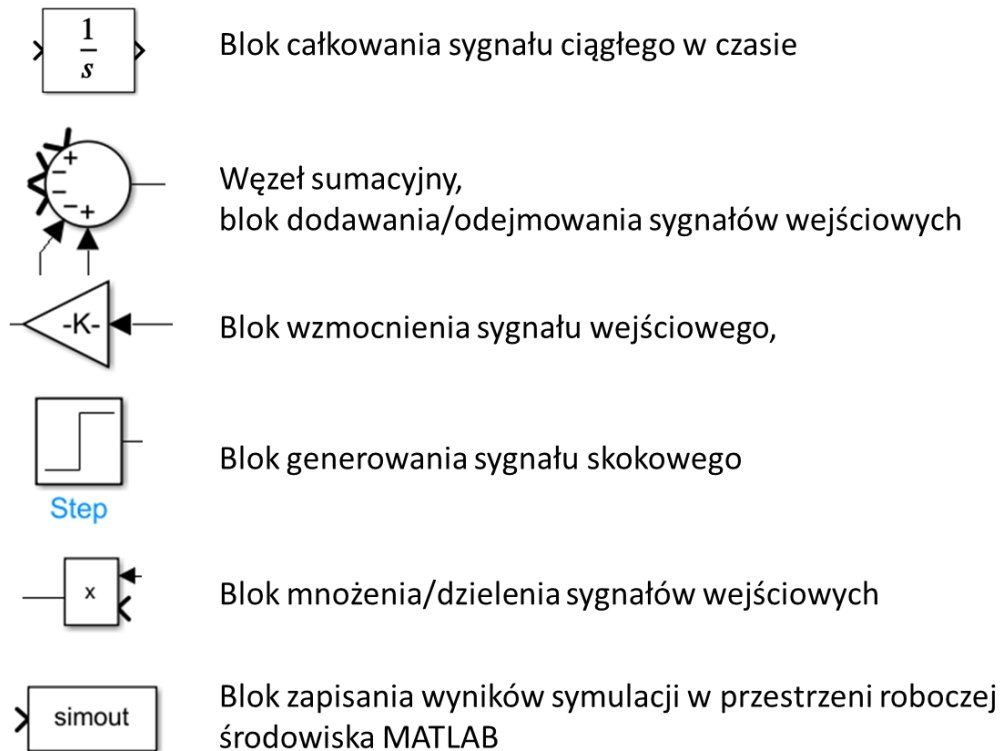
Dane do modelu i schemat w Simulinku

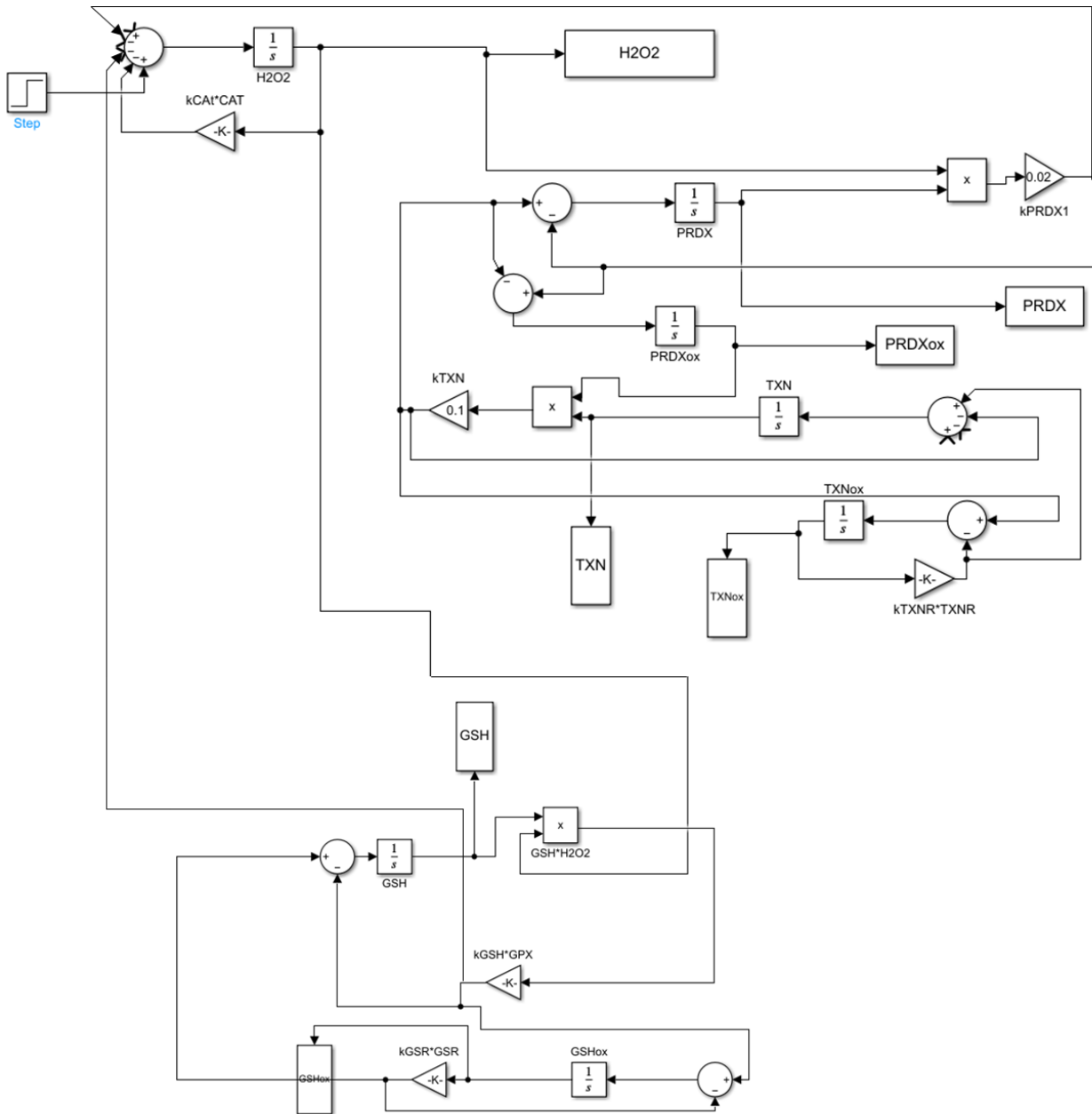
Dane do modelu zostały zaadaptowane z kilku publikacji przedstawionych w (Ambarsari & Lindawati; Makino et al. 1994; Cortassa et al. 2004; Aon et al. 2012; Karpenko et al. 2021) i przedstawiłam je w tabeli 3. W tych publikacjach parametry k zostały wyznaczone eksperymentalnie dla różnych typów komórek. W modelu założono, że parametry reakcji pozostają takie same dla różnych typów komórek, pomiędzy komórkami różna jest ekspresja enzymów neutralizujących. Można więc założyć, że dane przedstawione w tabeli 3 są zestawem parametrów dla pewnej hipotetycznej linii komórkowej, do której odnoszone będą pozostałe obliczane wartości.

Dane do modelu	Wartość [mM]	Odkaz
Poziom PRDX	0,15	(Aon et al. 2012)
Poziom TXN	0,025	(Aon et al. 2012)
Poziom TXNRD	0,025	(Aon et al. 2012)
Poziom GSH	3	(Aon et al. 2012)
Poziom GPX	0,05	(Aon et al. 2012)
Poziom GSR	0,05	(Aon et al. 2012)
Poziom CAT	0,001	(Cortassa et al. 2004)
kCAT CAT K_m dla H_2O_2	0,08-0,24	(Ambarsari & Lindawati; Karpenko et al. 2021)
kGSR *GSSG GPX K_m dla GSSG	0,06	(Aon et al. 2012)
kTXNox *TXNR TXNRD K_m dla TXNox	0,05	(Aon et al. 2012)
kPRDXox *TXN TXN K_m dla PRDXox	0,1	(Aon et al. 2012)
kGPX * H_2O_2 GPX K_m dla H_2O_2	0,2-0,5	(Makino et al. 1994; Karpenko et al. 2021)
kPRDX * H_2O_2 PRDX K_m dla H_2O_2	0,02	(Karpenko et al. 2021)

Tabela 3. Dane wykorzystywane w modelu neutralizacji RFT.

Zaprezentowany model neutralizacji H_2O_2 został zaimplementowany w programie MATLAB, z wykorzystaniem pakietu Simulink. Na rysunku 8 przedstawiono schemat blokowy modelu w Simulinku wraz z objaśnieniami używanych symboli.



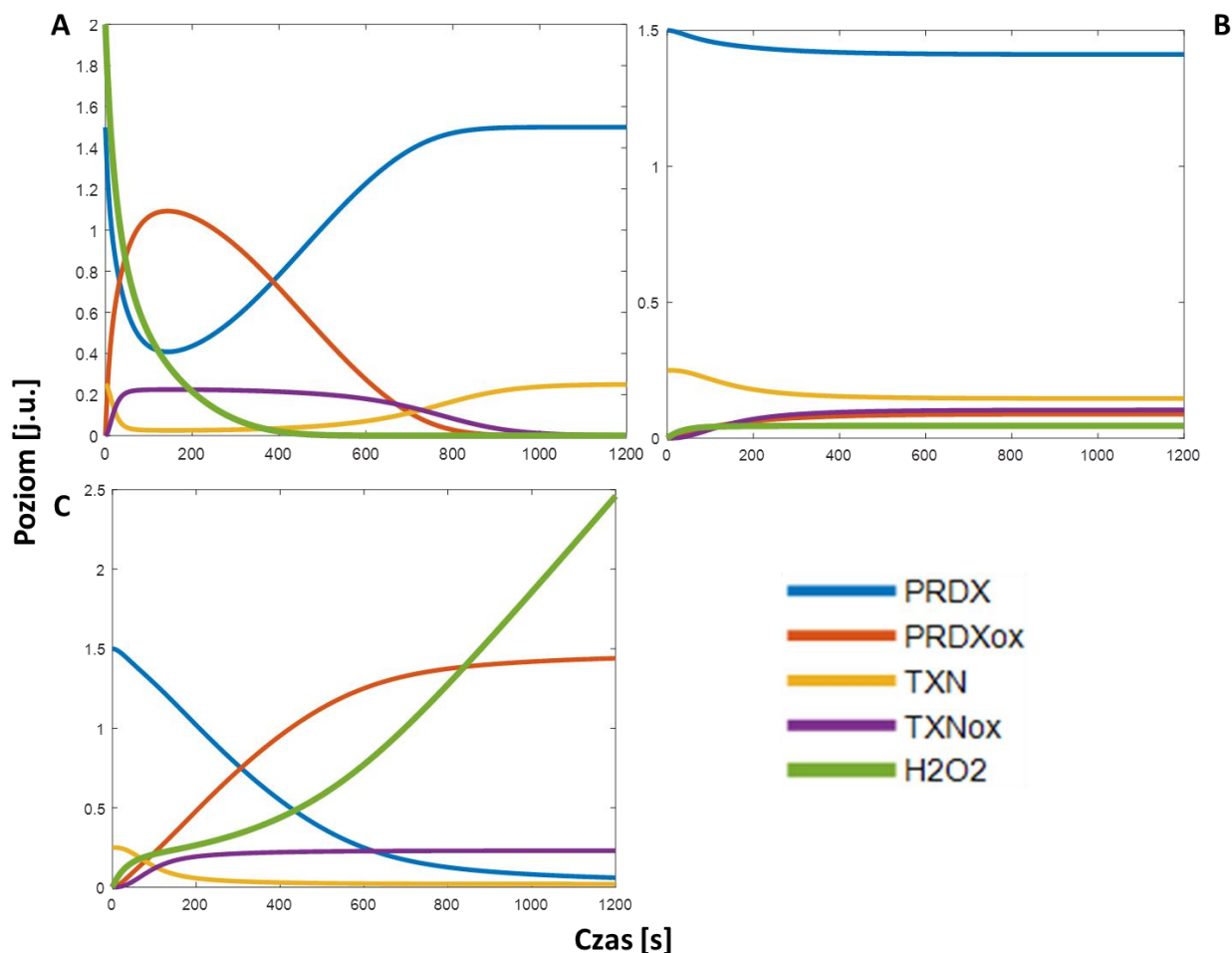


Rysunek 8. Schemat neutralizacji H₂O₂, implementacja w środowisku Matlab Simulink (wyjaśnienie używanych symboli powyżej).

Modelowanie sytuacji pojawiających się w komórce podczas stresu oksydacyjnego

Forma zredukowana i utleniona PRDX i TXN w neutralizacji H₂O₂, mają bardzo duże znaczenie, ponieważ enzymy w formie utlenionej nie są w stanie zredukować H₂O₂ do wody. W reakcji neutralizacji następuje redukcja H₂O₂ przez peroksyredoksynę w formie zredukowanej (SH), która przechodzi do formy utlenionej (SS). Aby ponownie wrócić do formy zredukowanej musi zostać zredukowana przez inny enzym, tj. tioredoksynę, która

w tym procesie również ulega utlenieniu. Jeśli założymy, że system neutralizacji jest systemem z jednorazowo dodaną ograniczoną ilością H_2O_2 to enzymy przechodzą do formy utlenionej w czasie neutralizacji H_2O_2 dostępnego w systemie. Po neutralizacji całego H_2O_2 dostępnego w systemie wracają do formy zredukowanej (Rysunek 9A).



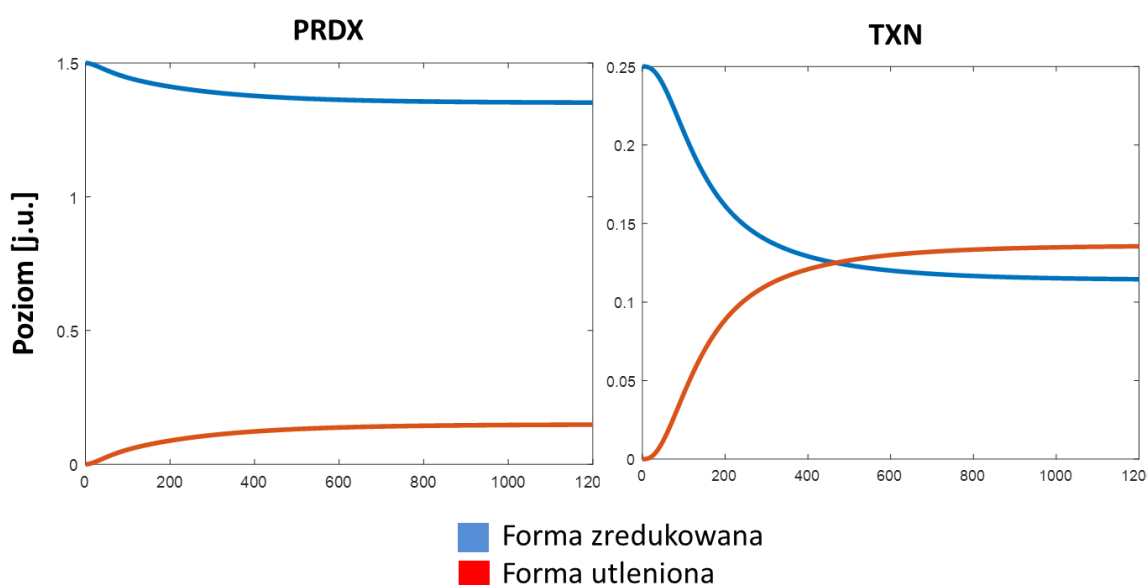
Rysunek 9. Dynamika H_2O_2 , peroksyredoksyn i tioredoksyn w sytuacjach (A) system startuje z ograniczonej ilości H_2O_2 bez dodatkowego dopływu H_2O_2 , (B) i (C) w systemie pojawia się stały dopływ H_2O_2 w (B) 10 razy mniejszy niż w (C).

Im więcej H_2O_2 w systemie tym neutralizacja przebiega dłużej, jednak przy budowie układu w prezentowanym modelu enzymy zawsze wracają do formy zredukowanej (w przypadku braku H_2O_2 w systemie, układ enzymów dąży do formy zredukowanej). W układach rzeczywistych w komórkach większość, ale nie całość enzymów neutralizujących H_2O_2 jest w formie zredukowanej. Dodatkowo komórki posiadają specjalne enzymy produkujące RFT i RFA, które prawdopodobnie są wykorzystywane do zachowania równowagi pomiędzy formą zredukowaną i utlenioną (należy pamiętać, że utlenianie w komórkach jest jedną z form regulacji). W moim modelu po usunięciu z systemu H_2O_2 ,

peroksyredoksyny wracają do formy zredukowanej szybciej niż tioredoksyny, które wpływają na redukcję peroksyredoksyn (Rysunek 9A).

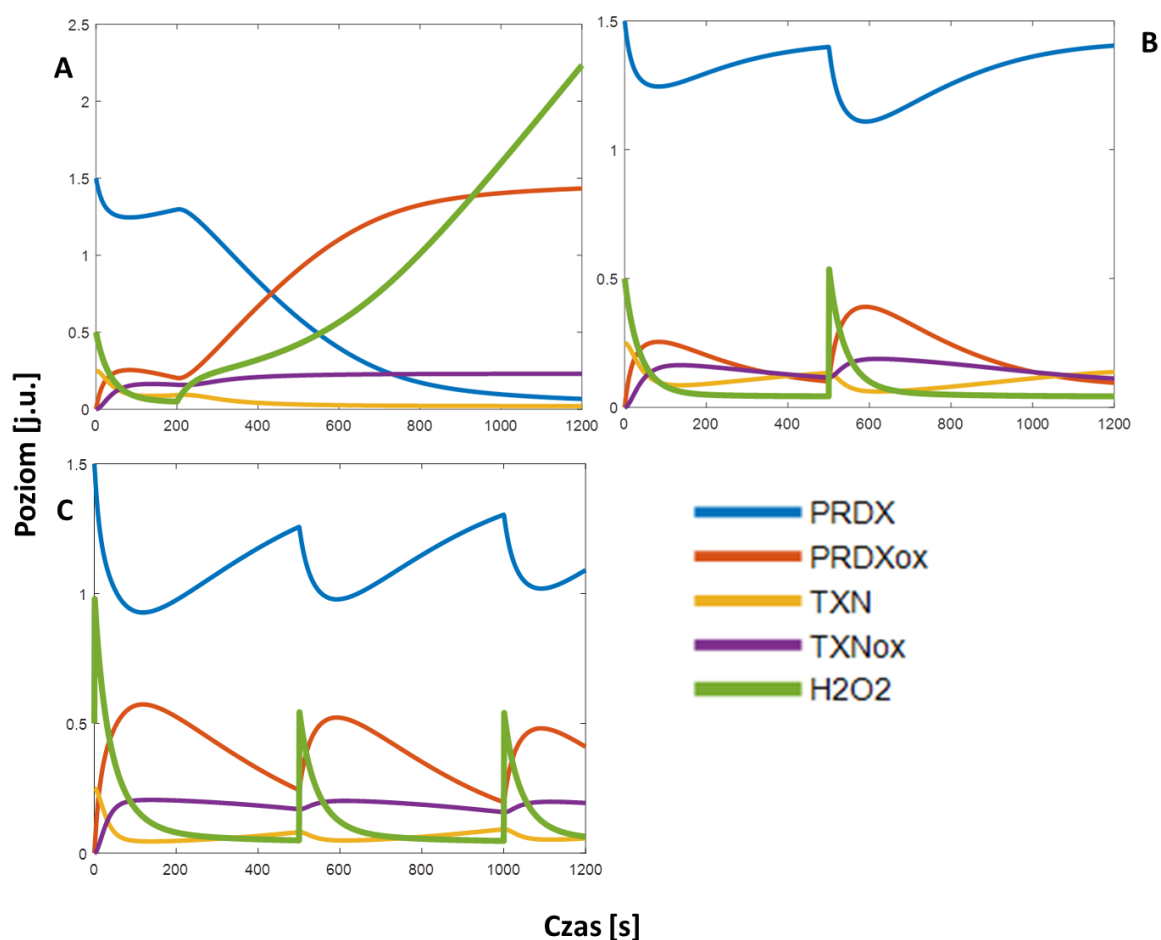
Jeśli natomiast założymy stały dopływ H_2O_2 do systemu (np. stały dopływ z mitochondriów), to jeśli w systemie neutralizacyjnym pojawi się za dużo H_2O_2 , enzymy neutralizujące nie są w stanie go zneutralizować i pozostają w formie utlenionej (Rysunek 9C). Enzymy są w stanie neutralizować H_2O_2 tylko do pewnego poziomu. Po wyczerpaniu puli zredukowanych enzymów, nie są one w stanie zneutralizować H_2O_2 , jego poziom w systemie rośnie. W rzeczywistym systemie taka sytuacja byłaby prawdopodobnie równoznaczna ze śmiercią komórki; komórki, które nie potrafią poradzić sobie z nadmierną ilością RFT umierają.

Zbyt duży dopływ H_2O_2 powoduje niewydolność systemu neutralizacji. W modelu możliwe jest jednak dobranie takiego poziomu H_2O_2 (dopływ ciągły), aby nastąpiła równowaga pomiędzy formami zredukowanymi i utlenionymi. Na rysunku 9B pokazano jak modelowy układ dąży do stanu ustalonego (dopływ H_2O_2 10 razy mniejszy niż na rysunku 9C). Ze względu na większą przejrzystość na rysunku 10 pokazałam dynamikę peroksyredoksyn i tioredoksyn z rysunku 9B nie uwzględniając H_2O_2 . Utrzymanie równowagi między formami zredukowanymi i utlenionymi wydaje się najbardziej prawdopodobne w rzeczywistym układzie komórek. RFT są stale produkowane przez komórki, a enzymy neutralizacyjne są w stanie zneutralizować ich nadmiar, tak aby zachować stabilność.



Rysunek10. Dynamika peroksyredoksyn i tioredoksyn w układzie z równowagą z rysunku 9B.

Dodatknie do systemu, w którym ustalona była równowaga dodatkowej ilości H_2O_2 (np. pojawiające się po napromienieniu) może spowodować różne działanie systemu. Na rysunku 11A przedstawiono przypadek chronicznego dopływu zwiększonej ilości H_2O_2 (pojawiającego się w chwili czasowej 200s), która spowodowała, że system nie był w stanie poradzić sobie z neutralizacją, a poziom H_2O_2 zaczął wzrastać. W układzie pojawiła się dodatkowa ilość H_2O_2 , której system nie był w stanie zneutralizować, co jest równoznaczne ze śmiercią komórki. Na rysunku 11B przedstawiono sytuację, w której zwiększenie H_2O_2 było chwilowe (chwila 500s). Nie spowodowało to nadmiernego wzrostu H_2O_2 w systemie, który wrócił do równowagi ustalonej wcześniej. Oznacza to, że komórki powinny być w stanie poradzić sobie z krótkim stresem, a następnie mogą wrócić do stanu ustalonego przed zadziałania bodźca.



Rysunek 11. Pojawienie się w układzie ze stanem ustalonym dodatkowej ilości H_2O_2 dostarczanej chronicznie do układu (A), pojawienie się w układzie jednorazowo dodatkowej ilości H_2O_2 (B) lub cykliczne pojawianie się H_2O_2 (C).

Dodawanie do układu H_2O_2 w określonych odstępach czasu (fluktuacja poziomu dopływającego H_2O_2) przedstawia rysunek 11C. Jest to sytuacja najbardziej zbliżona do sytuacji w komórkach, w których zwykle obserwujemy wahania poziomów RFT. Obserwowane fluktuacje mogą być tłumaczone, pojawianiem się dodatkowego H_2O_2 do neutralizacji.

Neutralizacja H_2O_2 w komórkach nowotworowych

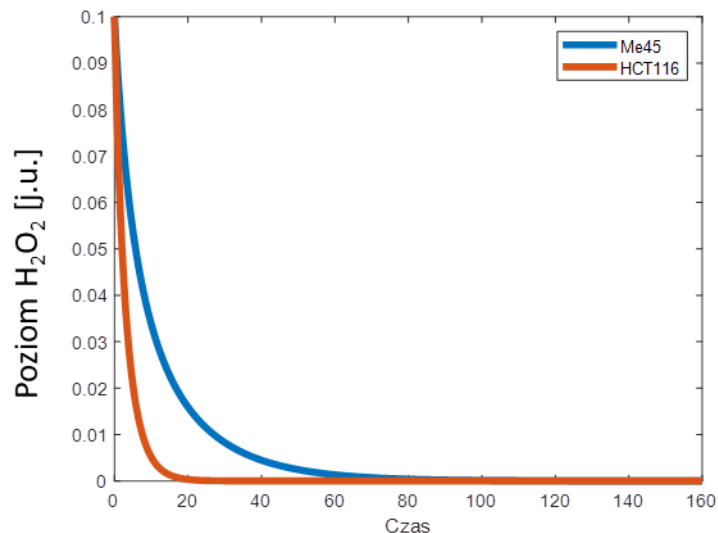
Przy wykorzystaniu stworzonego modelu sprawdzałam, czy proces neutralizacji jest różny w różnych liniach komórkowych. W pracy badano dwie linie komórkowe HCT116 i Me45, dla których zakładamy istnienie różnych wiodących procesów neutralizacji, które mogą dalej wpływać na odpowiedź komórek na ten sam bodziec.

W ogólnodostępnych bazach danych znalazłam dane dotyczące ekspresji enzymów jedynie dla linii HCT116, dla której przyjąłam, że poziomy enzymów w tej linii odpowiadają poziomom w mojej hipotetycznej linii, dla której dane przedstawiłam w tabeli 3. Wartości parametrów dla pozostałych linii komórkowych i dla linii Me45 (brak linii Me45 w bazie danych CCLE) obliczałam na podstawie proporcji ekspresji poziomów mRNA w danej linii i modelowej linii HCT116 (np. w komórkach HCT116 jest 2,73 razy więcej transkryptu TXN niż w komórkach Me45, w związku z tym wartość współczynnika TXN przyjąłam jako 1 dla HCT116 i 0,37 dla linii Me45). W tabeli 4 przedstawiono dane mikromacierzowe dotyczące transkryptów badanych enzymów uzyskane w laboratorium Centrum Biotechnologii dla linii HCT116 i Me45. Dla przedstawionego przeze mnie modelu nie ma znaczenia jakie wartości zostaną podane jako poziomy bazowe, dlatego, że zawsze będzie to proporcjonalnie więcej lub mniej dla danej linii komórkowej.

Enzym	Me45	HCT116	Stosunek Me45/HCT116
PRDX2	594,4	1450,2	0,41
TXN	985,5	2690,5	0,37
TXNRD1	781,4	717	1,09
GPX4	1086,1	1354,3	0,8
GSR	133,9	106,4	1,26
CAT	410,5	252,4	1,63

Tabela 4. Dane mikromacierzowe wybranych enzymów w liniach HCT116 i Me45

Dla przedstawionych linii komórkowych HCT116 i Me45 wykonałam dodatkowo symulacje, w których komórki są w układzie bez stałego dopływu H_2O_2 , można je traktować jako odosobniony układ, w którym istnieje pewna określona ilość H_2O_2 do neutralizacji (Rysunek 12). W takim przypadku można zaobserwować, że komórki HCT116 dużo szybciej osiągają stan ustalony i usuwają z systemu H_2O_2 , niż komórki Me45.



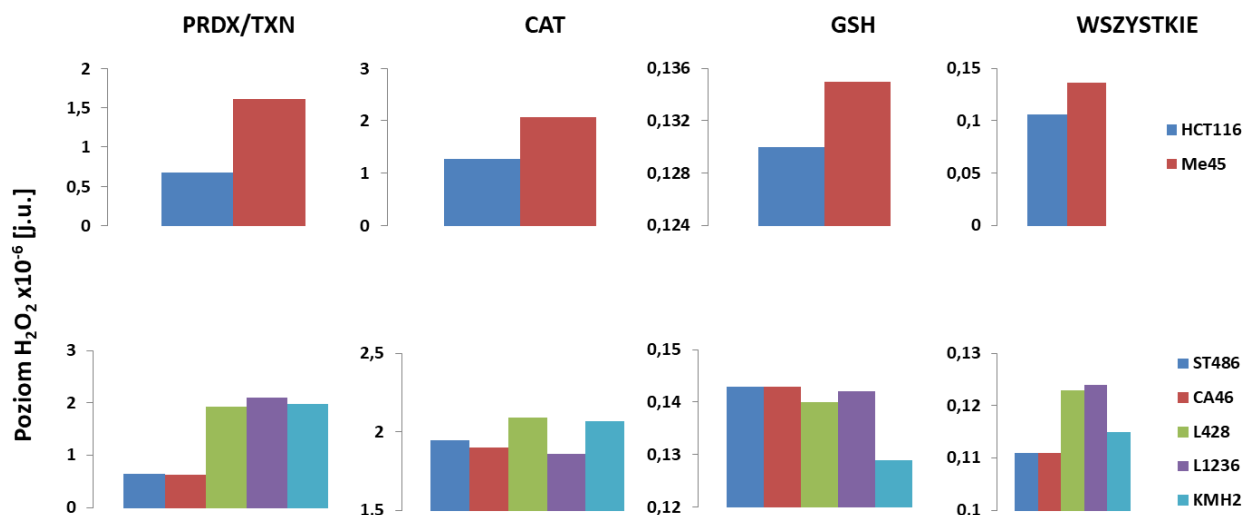
Rysunek 12. Neutralizacja zadanego poziomu H_2O_2 bez stałego dopływu w liniach komórkowych Me45 i HCT116.

Po odnotowaniu znaczących różnic pomiędzy komórkami HCT116 i Me45, postanowiłam sprawdzić czy podobne różnice mogą być zaobserwowane dla innych linii komórkowych. W dalszych symulacjach komputerowych wykorzystałam stały dopływ H_2O_2 do systemu, co w rzeczywistym układzie może być uznawane za stały dopływ z mitochondriów, a następnie sprawdzałam jak przebiega neutralizacja H_2O_2 wyłączając po kolei różne systemy neutralizacji (sytuacja taka jest możliwa, np. w przypadku mutacji któregoś z enzymów) oraz dla wszystkich systemów działających prawidłowo. Do dalszych analiz wybrałam kilka linii komórkowych chłoniaków Hodgkina (L428, L1236 i KMH2) oraz Burkitta (ST486 i CA46). W tabeli 5 przedstawiłam dane mikromacierzowe dla linii komórkowych chłoniaka Hodgkina i Burkitta.

Enzym	Stosunek linii komórkowej do linii HCT116				
	ST486	CA46	L428	L1236	KMH2
PRDX2	1,04	0,99	0,34	0,31	0,33
TXN	0,92	0,89	0,98	1	1,03
TXNRD1	0,96	0,86	0,85	0,8	0,95
GPX4	0,94	0,94	0,96	0,95	1,04
GSR	0,92	0,84	0,9	0,78	0,89
CAT	1,05	1,08	0,97	1,1	0,98

Tabela 5. Pobrane z bazy CCLE wartości ekspresji wybranych genów dla linii komórkowych chłoniaków Burkitta (ST486, CA46) oraz Hodgkina (L428, L1236, KMH2) pobrane z bazy CCLE przedstawione w jednostkach obliczonych w odniesieniu do linii HCT116.

Symulacje komputerowe wykazały, że neutralizacja w różnych typach komórek przebiega inaczej (Rysunek 13). W liniach komórkowych HCT116 i Me45 różnice widoczne są dla każdego systemu neutralizacji, jednak w przypadku chłoniaków Hodgkina i Burkitta, znaczące różnice można zaobserwować głównie w systemie PRDX/TXN. Różnica ta jest znacząca, symulacje pozwalają na rozróżnienie jednego typu chłoniaka od drugiego.



Rysunek 13. Porównanie neutralizacji H_2O_2 w różnych liniach komórkowych za pomocą symulacji komputerowych, w których zakładano wyłączanie różnych systemów neutralizacji. Komórki otrzymywały chronicznie $1 \times 10^{-8} H_2O_2$ do neutralizacji. Na wykresach przedstawiony jest poziom H_2O_2 po neutralizacji w stanie ustalonym dla systemów CAT, PRDX-TXN, GSH-GPX osobno oraz dla wszystkich systemów razem. W pierwszym rzędzie porównano linie HCT116 i Me45, a w drugim rzędzie linie chłoniaków Burkitta i Hodgkina.

Neutralizacja w nowotworowych komórkach radioopornych i radiowrażliwych

W przedstawionych w poprzednim rozdziale nowotworowych liniach komórkowych obserwowane są różnice w neutralizacji H_2O_2 , w szczególności dla systemu PRDX/TXN. Promieniowanie jonizujące, podobnie jak promieniowanie UV indukuje RFT, prowadząc do zmian w komórkach. Większość nowotworów jest leczona za pomocą promieniowania jonizującego, które jest uznana i skuteczną metodą terapii. W napromieniowanych komórkach obserwuje się zmiany ekspresji genów, zatrzymanie proliferacji, a także śmierć komórek. Jednak nie wszystkie komórki odpowiadają na leczenie, a te, które unikają śmierci określa się mianem opornych na promieniowanie, radioopornych (Busato et al. 2022).

Postanowiłam sprawdzić czy obserwowane różnice pomiędzy chłoniakami Hodgkina i Burkitta oraz komórkami linii Me45 i HCT116 mogą występować także pomiędzy komórkami radiowrażliwymi i radioopornymi. W modelu wprowadziłam stały dopływ H_2O_2 do komórek różnych typów, a następnie sprawdzałam jak przebiega w nich neutralizacja. Komórki radiooporne i radiowrażliwe wybrałam na podstawie danych literaturowych, dla nowotworów płuc (Lee et al. 2017), nowotworów piersi (Anastasov et al. 2012; Ko et al. 2018), nowotworów jelita (Kobunai et al. 2011) oraz nowotworów krwi (Maslennikova et al. 2017). Dane dotyczące ekspresji genów dla wybranych linii komórkowych pobrałam z bazy CCLE. W tabelach 6,7,8 i 9 przedstawiłam te dane. Przy dobieraniu parametrów, podobnie jak w przypadku linii Me45, stosowałam metodę porównawczą poziomu transkryptów w odniesieniu do linii HCT116.

Enzym	Stosunek: Linia komórkowa/HCT116			
	MDAMB361 RS	MDAMB231 RS	MCF7 RR	T47D RR
PRDX2	0,97	0,99	1,04	0,99
TXN	0,99	1,02	0,95	0,97
TXNRD1	0,97	1,02	0,82	0,83
GPX4	1,01	1,02	0,99	0,98
GSR	0,85	0,77	0,83	0,81
CAT	0,99	1,02	0,95	1,11

Tabela 6. Pobrane z bazy CCLE wartości ekspresji wybranych genów dla linii komórkowych nowotworu piersi rozróżnionych pod względem radiowrażliwości (RS – radiowrażliwe, RR – radiooporne) przedstawione w jednostkach obliczonych w odniesieniu do linii HCT116.

Enzym	Stosunek: Linia komórkowa/HCT116		
	H1299	A549	H460
	RS	RR	RR
PRDX2	0,31	0,35	0,96
TXN	0,97	1,02	1,05
TXNRD1	0,94	1,12	1,09
GPX4	1	0,96	0,87
GSR	0,83	1,05	1,06
CAT	0,85	0,96	0,44

Tabela 7. Pobrane z bazy CCLE wartości ekspresji wybranych genów dla linii komórkowych nowotworu płuc rozróżnionych pod względem radiowrażliwości (RS – radiowrażliwe, RR – radiooporne) przedstawione w jednostkach obliczonych w odniesieniu do linii HCT116.

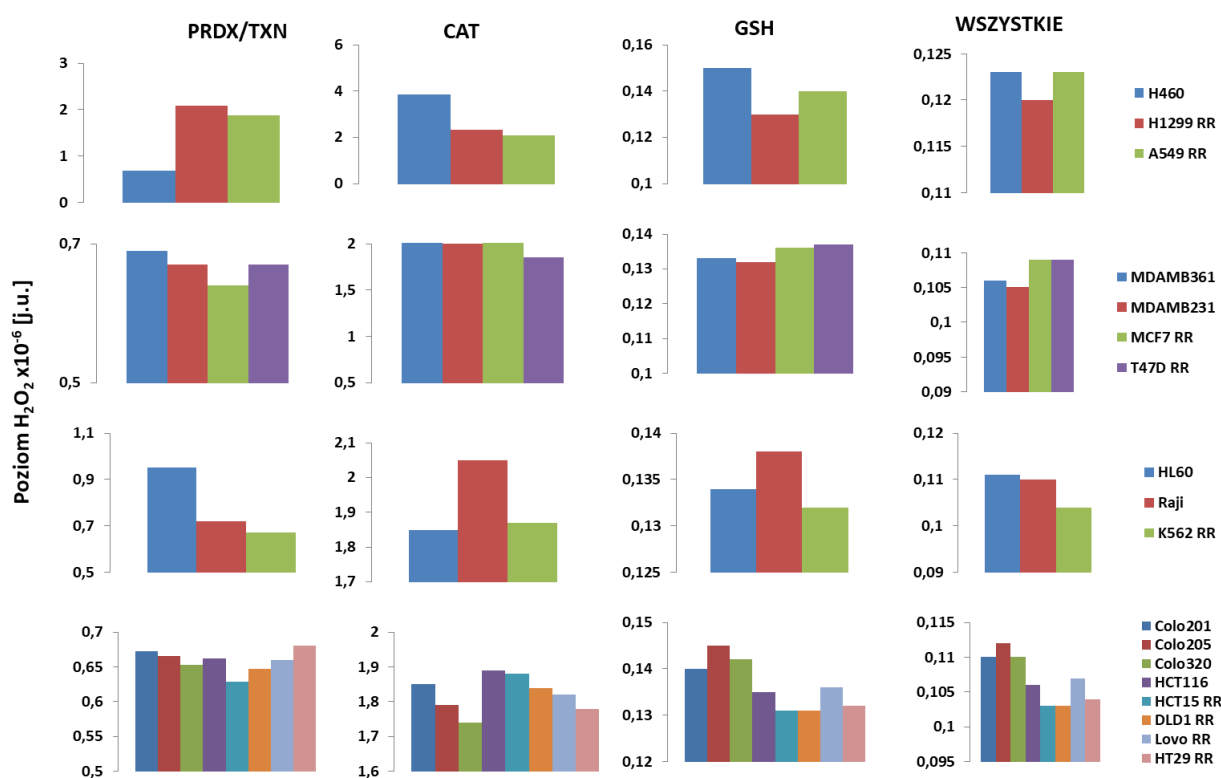
Enzym	Stosunek: Linia komórkowa/HCT116		
	K562	HL60	Raji
	RR	RS	RS
PRDX2	0,99	0,7	0,93
TXN	0,97	0,96	0,96
TXNRD1	0,92	0,95	0,91
GPX4	1,02	1	0,97
GSR	0,99	0,91	0,86
CAT	1,11	1,12	1,01

Tabela 8. Pobrane z bazy CCLE wartości ekspresji wybranych genów dla linii komórkowych nowotworu piersi rozróżnionych pod względem radiowrażliwości (RS – radiowrażliwe, RR – radiooporne) przedstawione w jednostkach obliczonych w odniesieniu do linii HCT116.

Enzym	Stosunek: Linia komórkowa/HCT116							
	Colo201	Colo205	Colo320	HCT116	Lovo	HCT15	HT29	DLD1
	RS	RS	RS	RS	RR	RR	RR	RR
PRDX2	0,99	1	1,02	1	1,01	1,06	0,98	1,03
TXN	1,02	1,03	1	1	0,99	1,02	1,02	1,02
TXNRD1	0,9	0,95	1	1	0,95	1,03	0,95	1,04
GPX4	0,96	0,93	0,95	1	0,99	1,03	1,02	1,03
GSR	0,91	0,89	0,93	1	0,88	0,96	0,85	0,98
CAT	1,03	1,07	1,11	1	1,05	1,01	1,08	1,04

Tabela 9. Pobrane z bazy CCLE wartości ekspresji wybranych genów dla linii komórkowych nowotworu piersi rozróżnionych pod względem radiowrażliwości (RS – radiowrażliwe, RR – radiooporne) przedstawione w jednostkach obliczonych w odniesieniu do linii HCT116.

Na rysunku 14 przedstawiono wyniki symulacji dla różnych linii komórkowych. Neutralizacja w różnych typach komórek przebiega inaczej. Komórki radiowrażliwe tego samego pochodzenia, np. nowotworu płuc neutralizują H_2O_2 lepiej, niż komórki radiooporne w systemie PRDX/TXN, a w systemie CAT gorzej. Z przeanalizowania wielu linii komórkowych radiowrażliwych i radioopornych, wynika, że dany typ komórek może neutralizować wydajniej H_2O_2 przez jeden z systemów neutralizacji, a gorzej przez inny, co sugerowały dane eksperymentalne i to właśnie ten system może stanowić różnicę pomiędzy komórkami radiowrażliwymi i radioopornymi, Obserwowane w modelu różnice czasami są niewielkie. Różnice w proliferacji, przeżyciu i radiooporności między komórkami mogą być wynikiem różnic w sposobach neutralizacji.



Rysunek 14. Porównanie neutralizacji H_2O_2 w różnych liniach komórkowych za pomocą symulacji komputerowych, w których zakładano wyłączanie różnych systemów neutralizacji. Komórki otrzymywały chronicznie 1×10^{-8} H_2O_2 do neutralizacji, na wykresach przedstawiony jest poziom H_2O_2 po neutralizacji w stanie ustalonym dla systemów CAT, PRDX-TXN, GSH-GPX osobno oraz dla wszystkich systemów razem. W pierwszym rzędzie porównano linie nowotworu płuc, w drugim piersi, w trzecim krwi, a w czwartym jelita grubego.

DYSKUSJA

Ścieżki regulujące reaktywne formy tlenu w różnych typach komórek

Wyniki analiz ekspresji genów kodujących enzymy produkujące RFT i RFA oraz inne enzymy uczestniczące w neutralizacji RFT w ponad 1000 ludzkich liniach komórkowych pochodzących z różnych tkanek i nowotworów z bazy danych Cancer Cell Line Encyclopedia (Ghandi et al. 2019) i danych mikromacierzowych opublikowanych przez grupę prof. Rzeszowskiej wykazały, że poziomy większości enzymów związanych z neutralizacją RFT są podobne w różnych typach komórek. W przedstawionej analizie widoczne jest wyraźne międzykomórkowe i międzytkankowe podobieństwo transkryptów dla genów kodujących enzymy zaangażowane w produkcję NO i O_2^- (niska ekspresja) lub w neutralizację H_2O_2 (wysoka ekspresja), co pokazuje że niektóre mechanizmy regulujące poziomy rodników muszą być wspólne dla wielu typów komórek.

RFT uczestniczą w wielu szlakach sygnałowych, w tym regulujących cykl komórkowy i proliferację (Grossman et al. 1998; Boonstra & Post 2004; Menon & Goswami 2007; Sarsour et al. 2009), a ich poziomy wewnątrzkomórkowe muszą być precyzyjnie kontrolowane. O_2^- i NO, które są celowo wytwarzane przez komórki i oddziałują ze sobą oraz z wieloma innymi cząsteczkami komórkowymi ogrywają kluczową rolę w regulacji komórkowego stanu redoks. Ich poziomy są regulowane głównie w oparciu o dysmutazy ponadtlenkowe, peroksyredoksyny, tioredoksyny, reduktazy tioredoksyny i glutationu oraz enzymy zaangażowane w produkcję O_2^- lub NO (Radi 2013; Hanschmann et al. 2013; Bartesaghi & Radi 2018).

Wysokie i bardzo podobne poziomy transkryptów zaobserwowano dla PRDX, TXN i TXNRD1 we wszystkich typach komórek. W przypadku ekspresji PRDX podobieństwo nie jest zaskakujące, ponieważ białka te są wysoce konserwatywne i pełnią podobne role w różnych tkankach i organizmach (Edgar et al. 2012). Peroksyredoksyny biorą udział w sygnalizacji komórkowej reaktywnych form tlenu, mogą pełnić rolę białek opiekuńczych, a także uczestniczyć w regulacji zegara dobowego (ang. *circadian clock*) (Edgar et al. 2012). PRDX występują jako dimery, które mogą tworzyć wewnątrzcząsteczkowe mostki dwusiarczkowe, które są redukowane przez tioredoksynę (TXN), która z kolei jest redukowana przez reduktazy tioredoksynowe wykorzystujące NADPH jako źródło siły redukującej (Hoyle & O'Neill 2015). Zatem PRDX wraz z TXN i TXNRD1 tworzą system

regulacyjny, w którym można oczekiwać, że wszystkie jego elementy będą wyrażane na podobnym poziomie we wszystkich typach komórek. Jednak TXN ulega nadekspresji w wielu ludzkich nowotworach, a wysokie poziomy wydają się być związane ze zmniejszoną przeżywalnością pacjentów (Powis & Montfort 2001; Raffel et al. 2003). W nowotworach z wyższym poziomem TXN obserwowano zwiększony wzrost komórek i zahamowanie apoptozy (Grogan et al. 2000; Raffel et al. 2003). Podwyższone poziomy transkryptów TXN były obserwowane na przykład w pierwotnych ludzkich nowotworach płuca i jelita grubego (Grogan et al. 2000). Kolejnymi genami o wysokiej i podobnej ekspresji we wszystkich tkankach są SOD1, który przekształca rodniki ponadtlenkowe do H_2O_2 oraz GPX4, który neutralizuje H_2O_2 . Enzymy te, z pominięciem katalazy mogą należeć do tego samego konserwatywnego systemu co PRDX i TXN, który reguluje homeostazę redoks (Edgar et al. 2012; Hoyle & O'Neill 2015). Katalaza, która wykazuje niższą i tkankowo-specyficzną ekspresję (Rysunek 2), najprawdopodobniej nie jest elementem tego samego szlaku.

Stymulacja proliferacji po ekspozycji na promieniowanie UVA

Promieniowanie UVA jest szkodliwe dla organizmów żywych, ale w małych dawkach może stymulować proliferację komórek. W pracy badano zależność między ekspozycją na różne niskie dawki promieniowania UVA, a proliferacją komórek i zmianami poziomu reaktywnych form tlenu w komórkach ludzkiego nowotworu jelita grubego (HCT116) i czerniaka (Me45) narażonych na dawki UVA porównywalne do środowiskowych. Najwyższe dawki ($30\text{--}50\text{ kJ/m}^2$) zmniejszały potencjał klonogeny, ale niektóre niższe dawki ($1\text{ i }10\text{ kJ/m}^2$) stymulowały proliferację. Efekt ten był specyficzny dla typu komórki i dawki. W obu liniach komórkowych poziomy reaktywnych form tlenu i tlenku azotu zmieniały się pod wpływem promieniowania UVA. Mechanizm stymulacji proliferacji jest także obecny w komórkach HCT116, które nie są na ogół narażone na promieniowanie UVA.

Stymulacja proliferacji komórek po promieniowaniu UVA w dawkach $3\text{--}9\text{ kJ/m}^2$ jest znana od kilkudziesięciu lat (Grossman et al. 1998; Han et al. 2011). W rozprawie pokazano, że dawki w tym zakresie, nieprzekraczające 10 kJ/m^2 , zwiększają potencjał klonogeny komórek HCT116 i Me45, i że efekt ten jest specyficzny dla dawki i typu komórki (Rysunek 4). Wzrost frakcji przeżywającej obserwowany po ekspozycji na niektóre dawki UVA odzwierciedla raczej indukcję proliferacji komórek niż spadek apoptozy, ponieważ podstawowa frakcja apoptotyczna w badanych komórkach była bardzo mała ($<6\%$), a jej

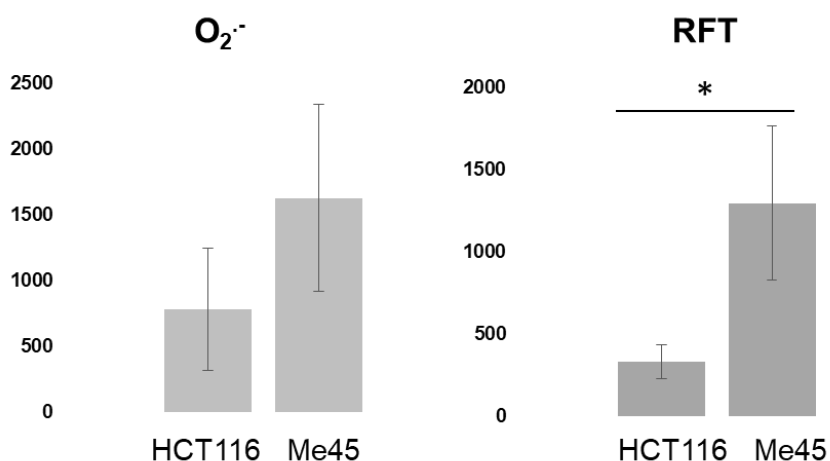
spadek nie spowodowałby wystarczająco znaczącej zmiany, aby można było wykryć ją w teście klonogennym. Wyniki te zostały opublikowane w (Ciesielska et al. 2019), gdzie pokazaliśmy, że efekt ten może być związany z wewnątrzkomórkowymi poziomami RFT i RFA (Robinson et al. 2006; Robinson et al. 2008), co potwierdza rolę wolnych rodników i stanu redoks w regulacji proliferacji (Burdon et al. 1989; Burdon 1995; Forman 2016).

Model matematyczny pozwalający na analizę mechanizmów neutralizacji i regulacji reaktywnych form tlenu

W literaturze istnieje wiele modeli związanych z neutralizacją reaktywnych form tlenu w komórkach. Modele te skupiają się przede wszystkim na neutralizacji O_2^- powstającego w mitochondriach podczas oddychania komórkowego. Komórki nie są w stanie rozróżnić źródła RFT, nie wiedzą, które RFT pochodzą z mitochondriów, a które są indukowane przez czynniki zewnętrzne (Richter 1992). Procesy neutralizacyjne podlegają kompartmentalizacji, np. katalaza nie działa w mitochondriach (Glorieux & Calderon 2017). Pomiar poziomu enzymów neutralizujących jest problematyczny, ponieważ dane, przedstawiające poziom enzymów, przedstawiają zazwyczaj całkowity poziom w komórce, nie ma rozróżnienia na mitochondria czy peroksysomy; podany poziom oznacza zazwyczaj poziom enzymów wewnątrz komórki. Taka sama sytuacja ma miejsce w przypadku RFT, nie można stwierdzić (przy pomiarze globalnym), które H_2O_2 jest wykrywane, czy jest to H_2O_2 powstające w mitochondriach w procesie oddychania komórkowego, czy H_2O_2 powiązane z peroksysomami (Schrader & Fahimi 2006).

Reaktywne formy tlenu mogą regulować wiele procesów zachodzących w komórkach. W pracy skupiłam się na różnych systemach neutralizacji RFT, które są ściśle kontrolowane w komórkach zakładając, że ich działanie zależy od poziomu enzymów neutralizujących. Podjęłam próbę zamodelowania jednej z takich regulacji. Jest to regulacja związana z neutralizacją H_2O_2 w komórkach nowotworowych przez peroksyredoksyny z tioredoksynami, peroksydazę glutationową z glutationem, a także katalazę. Wyniki pokazują, że w zależności od poziomów wyjściowych enzymów neutralizujących komórki inaczej neutralizują H_2O_2 , jedne lepiej, drugie gorzej, co z kolei może przekładać się na ich przeżycie przy wyższych stężeniach RFT, na przykład przy wyższych dawkach promieniowania (im wyższa dawka promieniowania, tym wyższa indukcja RFT). Z przedstawionych badań eksperymentalnych wynika, że komórki Me45 neutralizują H_2O_2

wolniej (Rysunek 12) dlatego już przy dawce 20kJ/m² (Rysunek 4), frakcja komórek przeżywających jest niska, natomiast w komórkach HCT116 jest ona wyższa. Z przeprowadzonych eksperymentów wynika, że poziom H₂O₂ w komórkach Me45 jest wyższy niż w komórkach HCT116 (Rysunek 15), co może potwierdzać mniej wydajną neutralizację H₂O₂ w komórkach Me45, a co za tym idzie śmierć przy niższej dawce promieniowania.



Rysunek 15. Poziomy RFT w komórkach Me45 i HCT116. Fluorescencja dla O₂⁻ zmierzona za pomocą barwnika MitoSOX oraz za pomocą DCFH-DA dla RFT.

Źródło: opracowanie własne, przekształcone z (Ciesielska et al. 2019)

Geny kodujące białka zaangażowane w systemy redoks ulegały różnej ekspresji w liniach komórkowych HCT116 i Me45; transkrypty dla tioredoksyny, peroksyredoksyny i peroksydazy glutationowej miały wyższy poziom w komórkach HCT116, podczas gdy transkrypty dla transferaz glutationowych, metalochaperonu miedzi (ATOX1) i transkryptów białka hamującego tioredoksynę (TXNIP) ulegały większej ekspresji w komórkach Me45. Szlaki neutralizacji H₂O₂ są prawdopodobnie preferencyjnie wykorzystywane przez komórki HCT116, ponieważ wykazują one wyższą ekspresję PRDX, TXN, GPX niż komórki Me45. Ze względu na to, że komórki Me45 wykazują istotnie wyższy poziom transkryptów genu ATOX1 niż komórki HCT116 wydaje się, że w komórkach Me45 może dominować neutralizacja przez ONOO⁻ oraz jego interakcja z metalami. Różnice obserwowane pomiędzy liniami HCT116 i Me45 zasugerowały, że ważne byłoby sprawdzenie za pomocą modelu matematycznego mechanizmów neutralizacji RFT w tych dwóch liniach komórkowych. Stworzony model matematyczny pozwolił na przeprowadzenie szeregu symulacji, które potwierdziły różnice pomiędzy tymi dwoma liniami komórkowymi (wykorzystanie

mechanizmów regulacji w liniach HCT116 i Me45 przedstawiono na rysunku 13).

Przeprowadzone symulacje neutralizacji H_2O_2 wykazują znaczne różnice w wydajności systemów neutralizacyjnych angażujących PRDX-TXN, GSH-GPX, CAT między komórkami HCT116 i Me45. Przedstawione systemy neutralizacji są mniej wydajne w komórkach Me45 niż w komórkach HCT116, co potwierdza różnice obserwowane w badaniach eksperymentalnych, a także potwierdza, że różnice te mogą wynikać z różnej neutralizacji RFT. W przypadku symulacji komputerowych dla komórek HCT116 i Me45, wszystkie zaimplementowane systemy neutralizacji były wydajniejsze w komórkach HCT116, co może mieć związek z ich większą wytrzymałością na wyższe dawki promieniowania UVA. Linie komórkowe HCT116 i Me45 są różnego pochodzenia tkankowego, dlatego obserwowane różnice mogą wynikać z samego pochodzenia komórek oraz ich innego działania, dlatego sprawdziłam także czy różnice w neutralizacji H_2O_2 mogą być obserwowane także w liniach o podobnym pochodzeniu. Tak jak w przypadku komórek HCT116 i Me45 różnice zaobserwowano pomiędzy różnymi liniami komórkowymi chłoniaków Hodgkina i Burkitta. W omawianym modelu neutralizacji obserwowano duże różnice pomiędzy komórkami chłoniaków, system PRDX-TXN był dużo wydajniejszy w chłoniakach Burkitta (Rysunek 13). Obserwując pozostałe systemy nie można było rozróżnić tych linii komórkowych. Dzięki większej wydajności systemu PRDX-TXN w chłoniakach Burkitta, komórki te podlegały wydajniejszej neutralizacji H_2O_2 , niż chłoniaki Hodgkina, co można zaobserwować również przy wszystkich systemach włączonych jednocześnie (Rysunek 13). Zaznaczyć należy jednak, że w przypadku symulacji dla wybranych komórek HCT116 i Me45, a także chłoniaków Hodgkina i Burkitta, najbardziej wydajnym systemem neutralizacyjnym był system związany z glutationem, jednak w przypadku tego systemu nie obserwowano znaczących różnic pomiędzy wybranymi liniami komórkowymi chłoniaków, a w przypadku komórek HCT116 i Me45 różnice były obserwowane dla każdego z wybranych systemów neutralizacji. W przedstawionym modelu nie brano pod uwagę dodatkowych interakcji pojawiających się w rzeczywistym układzie, np., glutation może reagować również z $ONOO^-$ tworząc S-nitroglutation, który może produkować NO (Balazy et al. 1998) lub peroksydaza glutationowa czy peroksyredoksyna mogą neutralizować także poza H_2O_2 , $ONOO^-$ (Skoko et al. 2019; Panday et al. 2020). Melo et al. pokazała, że systemy neutralizacji nie działają jednakowo w miejscach o różnej lokalizacji w komórkach, np. w erytrocytach katalaza ma większe znaczenie w cytoplazmie, kiedy jej aktywność jest zaburzona, PRDX i GPX są transportowane do błony komórkowej,

prawdopodobnie w celu ochrony przed peroksydacją lipidów (Melo et al. 2023). W erytrocytach najważniejsza okazała się katalaza, podczas gdy peroksyredoksyny i peroksydaza glutationowa miały mniejsze znaczenie w neutralizacji (Melo et al. 2023). Enzymy neutralizujące, których celem jest H_2O_2 , są ewolucyjnie zachowane w całym królestwie zwierząt, od gąbek po ssaki, przy czym system GPX związany z glutationem jest najmłodszą rodziną neutralizującą. CAT i PRDX są starymi rodzinami, dobrze zakonserwowanymi pomiędzy gatunkami, ich podstawowe funkcje antyoksydacyjne doprowadziły do zachowania genów w całym królestwie zwierząt (Hewitt & Degnan 2023).

W systemie PRDX-TXN oraz GSH-GPX następuję nieustanne utlenianie i redukcja. W przypadku zbyt dużej ilości H_2O_2 w systemie enzymy neutralizujące RFT, występowałyby tylko w formie utlenionej, co nie jest obserwowane w układzie rzeczywistym, dlatego w komórkach muszą istnieć mechanizmy chroniące komórkę przed nadmiernym utlenianiem. Na przykład poziom glutationu zredukowanego do utlenionego (GSH:GSSG) wynosi 100:1 (Zitka et al. 2012). W komórkach występuje głównie forma zredukowana glutationu, ale komórki nie dążą do całkowitego utlenienia enzymów i utrzymują stałą różnicę pomiędzy formą zredukowaną i utlenioną. Mechanizm pozwalający komórkom na utrzymanie takiego stałego poziomu, może mieć związek z enzymami produkującymi RFT. Enzymy te produkują nieustannie i celowo RFT, wprowadzając w komórkach dodatkowe RFT do neutralizacji. Jest to zapewne jeden z elementów utrzymania równowagi redoks. Należy zaznaczyć, że obserwowana przeze mnie stymulacja proliferacji w komórkach Me45 i HCT116 występowała po przekroczeniu pewnego progu indukcji RFT (konkretna dawka UVA), ale w wąskim zakresie dawek, co wskazuje, że ścisła kontrola mechanizmów regulacji redoks jest niezbędna do utrzymania homeostazy w komórkach.

Zmiany ekspresji genów po ekspozycji na promieniowanie jonizujące

Analizy poziomu reaktywnych form tlenu i azotu w komórkach narażonych na promieniowanie UV lub promieniowanie jonizujące wykazały, że czynniki te mogą znacząco zmienić warunki redoks i proliferację komórek (Herok et al. 2010; Ciesielska et al. 2019). Zmiany ekspresji genów zaangażowanych w homeostazę redoks zbadano również w trzech typach komórek wystawionych na działanie promieniowania jonizującego Me45, HCT116 i K562. Wyniki badań (Bil et al. 2020) nie zostały zaprezentowane w pracy jednak sugerują, że różne typy komórek podobnie jak w przypadku promieniowania UVA

wykorzystują różne szlaki redoks do radzenia sobie ze stresem oksydacyjnym wywołanym promieniowaniem jonizującym.

Ekspresja genów kodujących enzymy biorące udział w produkcji O_2^- i NO zmniejszyła się w komórkach narażonych na promieniowanie jonizujące; spadki były znamienne statystycznie. Promieniowanie jonizujące spowodowało ogólny wzrost poziomu transkryptów uczestniczących w neutralizacji rodników. We wszystkich liniach komórkowych zaobserwowano znaczny spadek ekspresji genów kodujących białka oddziałujące z tioredoksyną (TXNIP), inhibitora tioredoksyny. Ekspresja genów PRDX i TXN wzrosła po napromieniowaniu we wszystkich typach komórek, ale zaobserwowano zmiany specyficzne dla linii komórkowej w ekspresji genów CAT i GPX, co sugeruje, że mogą one w różny sposób zarządzać neutralizacją nadtlenu wodoru. Obserwacja ta jest istotna w przypadku modelu matematycznego, ponieważ w modelu założono niezmiennosc poziomów enzymów neutralizujących, a może być to istotny element wpływający na odpowiedź komórek w rzeczywistym systemie. Jednak przedstawiony model stanowi uproszczoną wersję i porównuje różne typy komórek nowotworowych jedynie w wyodrębnionym obwodzie regulacyjnym. Opisane wyżej różnice dotyczyły ekspresji na poziomie transkrypcyjnym, nie znamy zmian poziomu białek.

Regulacja neutralizacji reaktywnych form tlenu w komórkach radiowrażliwych i radioopornych

Dane przedstawione dla linii komórkowych o różnym pochodzeniu tkankowym wskazują, że systemy neutralizacji mogą różnicować komórki pomiędzy sobą w obrębie linii o tym samym pochodzeniu, a nie tylko pomiędzy liniami komórkowymi o różnym pochodzeniu tkankowym. Ze względu na istotną rolę RFT, które powstają podczas terapii antynowotworowej po promieniowaniu jonizującym, postanowiłam sprawdzić czy w systemach neutralizacji H_2O_2 można znaleźć różnice pomiędzy liniami komórkowymi, które znane są jako radiooporne i radiowrażliwe oraz wywodzą się z tej samej tkanki. W przeprowadzonych symulacjach pokazałam, że przedstawione systemy neutralizacji PRDX-TXN, CAT, GSH-GPX mogą różnicować komórki radiowrażliwe i radiooporne. Komórki radiowrażliwe lepiej neutralizują H_2O_2 niż komórki radiooporne, co może sugerować istnienie dominujących systemów neutralizacji oraz słabsze wykorzystanie innych systemów w komórkach nowotworowych. Symulacje pokazują, że w przypadku komórek

radiowrażliwych i radioopornych największy wpływ na neutralizację ma system związany z glutationem (GSH-GPX, symulacje z wyłączeniem pozostałych systemów), najlepiej usuwa H_2O_2 z systemu. Obserwując ten system, możliwe jest także rozróżnienie komórek radioopornych od radiowrażliwych. Widoczne różnice w neutralizacji H_2O_2 w komórkach radioopornych i radiowrażliwych możliwe są do zaobserwowania również w systemie PRDX-TXN, gdzie dla komórek nowotworowych piersi komórki radiooporne lepiej neutralizują H_2O_2 (niższy poziom ustalony H_2O_2 , niż w komórkach radiowrażliwych). Przy tym systemie tak wyraźna różnica jest również obserwowana w przypadku komórek nowotworowych płuc, jednak w tym przypadku komórki radiooporne wykazują gorszą neutralizację z wykorzystaniem tego systemu (Rysunek 14).

W komórkach nowotworowych płuc, krwi oraz jelita grubego wydaje się, że radiooporność jest związana z bardziej efektywnym usuwaniem H_2O_2 z systemu, jednakże w przypadku linii komórkowych nowotworu piersi sytuacja jest odwrotna, komórki radiowrażliwe lepiej neutralizują H_2O_2 . Co, ciekawe H_2O_2 jest wykorzystywany w terapii do uwrażliwiania komórek radioopornych. Dobre efekty uwrażliwiania obserwowano dla czerniaka (Fang et al. 2013) oraz dla nowotworu szyjki macicy, wątroby i piersi (Hu et al. 2021). Oznacza to, że obserwowany w symulacjach niższy poziom H_2O_2 , a zatem wydajniejsze systemy neutralizacji H_2O_2 mogą wpływać na radiooporność komórek. Mniej wydajne usuwanie H_2O_2 w liniach komórkowych nowotworu piersi może być związane z realnym wykorzystaniem w większym stopniu innego systemu neutralizacji H_2O_2 , i tak system PRDX-TXN usuwa lepiej H_2O_2 w tych komórkach, jednak może być to również związane z innymi mechanizmami aktywowanymi w tych komórkach.

W komórkach nowotworowych równowaga redoks jest zaburzona, a poziomy RFT są stale wysokie. Sugerowano, że takie podwyższone poziomy mogą skutkować aktywacją onkogenów i sygnałów onkogennych (Kumari et al. 2018). Niektóre typy komórek nowotworowych mogą wyjściowo wytwarzać wyższe poziomy RFT, co skutkuje ich zwiększoną proliferacją (Day & Suzuki 2005). Komórki nowotworowe rozwinęły systemy, dzięki którym dostosowują się do środowiska redoks poprzez aktywację szlaków antyoksydacyjnych i wzmacnianie skutecznych mechanizmów neutralizacji RFT. Zwiększony poziom antyoksydantów w komórkach może sprzyjać wzrostowi guza i przerzutom; pokazano, że nawet niewielki wzrost antyoksydantów może nasilać przerzuty czerniaka lub progresję nowotworu płuc u myszy (Sayin et al. 2014; Piskounova et al. 2015). Każdy typ komórek ma swoje własne, optymalne poziomy RFT, które pozwalają regulować

proliferaację i inne procesy. Optymalne poziomy RFT mogą być uzyskiwane poprzez dostosowanie poziomów enzymów odpowiedzialnych za produkcję lub neutralizację RFT i może to być związane z poziomami miRNA; na przykład miR-99a i miR-137, które celują w transkrypty genów kodujących enzymy produkujące RFT, takie jak NOX, są obniżane odpowiednio w gruczolakoraku (Sun et al. 2006) i nowotworze prostaty (Wu et al. 2019), a miR-212, który celuje w transkrypty SOD2, jest obniżony w nowotworze jelita grubego, powodując podwyższenie poziomów SOD2 (Meng et al. 2013). Poziom enzymów odpowiedzialnych za neutralizację H_2O_2 może być obniżony lub podwyższony przez miRNA. MiR-510 i miR-596 celują w transkrypty PRDX1, miR-510 jest podwyższony w nowotworze piersi (Guo et al. 2013), podczas gdy miR-596 jest obniżony w nowotworze żołądka (Zhang & Dai 2019). Poziomy PRDX3 są podwyższone w nowotworze prostaty i mogą być obniżane przez miR-23b (He et al. 2012). Zmiany PRDX3 obserwuje się również w rdzeniaku zarodkowym, w którym miR-383 jest obniżony (Li et al. 2013). Przedstawione różne efekty pokazują, że miRNA mogą być odpowiedzialne za stany patologiczne w komórkach poprzez wpływ na transkrypty enzymów związanych ze stanem redoks i że poziom RFT może wahać się w różnych typach komórek ze względu na różną aktywację (czasami patologiczną) enzymów związanych z neutralizacją.

Nieintuicyjne mechanizmy regulacji

Ekspozycja komórek na różne czynniki stresujące, takie jak promieniowanie jonizujące, H_2O_2 lub etopozyd prowadzi do indukcji różnej odpowiedzi komórkowej (Simone et al. 2009). W komórkach wystawionych na działanie H_2O_2 zmieniały się poziomy wielu miRNA, które celują w transkrypty enzymów odpowiedzialnych za produkcję i neutralizację RFT; jednak odpowiedź na H_2O_2 może być różna w różnych typach komórek, a miRNA mogą wzrastać lub spadać po traktowaniu H_2O_2 w zależności od dawki H_2O_2 (Simone et al. 2009). Na przykład, w komórkach ARPE-19 miR-23a, który celuje w SOD2 i TXNRD1 wzrasta po ekspozycji na H_2O_2 w stężeniach do 200 μM , ale spada przy wyższych stężeniach (Lin et al. 2011), podczas gdy w szczurzych kardiomiocytach miR-181a, który celuje w GPX1 spada dla poziomów poniżej 100 μM H_2O_2 i podwyższa się powyżej tego stężenia (Wang et al. 2014). Podobne efekty zależne od dawki zaobserwowano również dla miRNA skierowanych na transkrypty innych enzymów regulujących stan redoks, w tym NOX, NOS, CAT, GPX, GSR, PRDX, TXN i TXNRD (Wang et al. 2014; Lv et al. 2014; Carlomosti et al. 2017; Chen et al. 2020), co zostało przedstawione w tabeli 10.

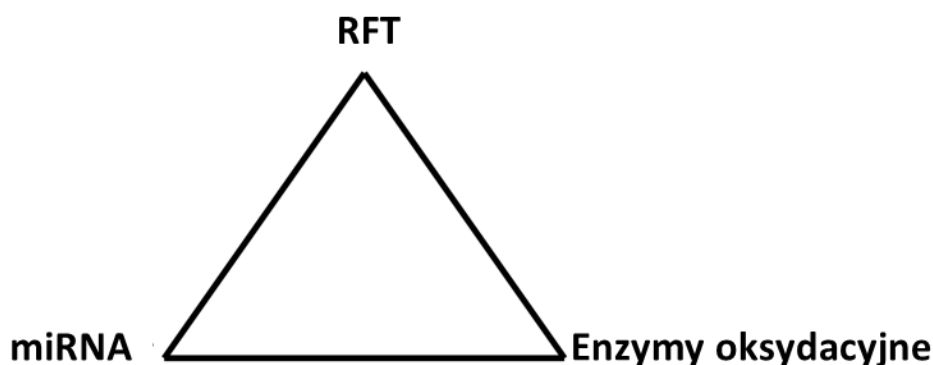
Regulacja enzymów antyoksydacyjnych ma na celu dostosowanie komórek do przetrwania w niestabilnym środowisku oksydacyjnym; jednak czasami pojawiają się pozornie paradoksalne zjawiska, w których stres oksydacyjny indukuje wzrost poziomów miRNA, których celem są geny, mające neutralizować RFT, a zatem oczekuje się, że zmniejszą poziom antyoksydantów. Tabela 10 pokazuje przykłady takich nieintuicyjnych odpowiedzi komórek na wzrost RFT przez zwiększenie poziomów miRNA, które celują w mRNA enzymów antyoksydacyjnych.

miRNA i transkrypty, w które celuje	Wpływ H₂O₂ na poziom miRNA	Zakres dawek H₂O₂ zmieniający poziom miRNA	Typ komórek	Odnosińnik
miR-17-3p ⊣ SOD2, GPX2, TXNRD2	↑ ↓	0-100 μM >200μM	APRE-19	(Tian et al. 2016)
miR-21 ⊣ SOD3	↑	0-200 μM	VSMC	(Lin et al. 2009)
miR-23a ⊣ SOD2, TXNRD1	↑ ↓	100-200 μM 300-500 μM	APRE-19	(Lin et al. 2011)
miR-24 ⊣ NOS3, SOD1, PRDX6	↑	400 μM	Komórki nabłonka soczewki ludzkiej	(Lu et al. 2018)
miR-30b ⊣ NOS3, CAT	↑	200 μM	APRE-19	(Haque et al. 2012)
miR-122 ⊣ PRDX2	↓	600μM	APRE-19	(Oltra et al. 2019)
miR-135a ⊣ TXNIP	↑	0-1mM	Kardiomioblasty szczurów	(Liu et al. 2017)
miR-146a ⊣ NOX4, NOS1, SOD2	↑	0-200 μM	Komórki nadnerczy szczura PC12	(Ji et al. 2013; Yang et al. 2018)
miR-155 ⊣ NOS3	↑	0-500 μM	VSMC	(Zhao et al. 2019)
miR-181a ⊣ GPX1	↓ ↑	0-100 μM 200-600 μM	Szczurze kardiomiocyty H9c2	(Wang et al. 2014)
miR-200c ⊣ NOS3, PRDX2	↑	400 μM	Prawidłowe ludzkie komórki wątroby LO2	(Xiao et al. 2015)
	↑	200 μM	HUVEC	(Carlomosti et al. 2017)
miR-214 ⊣ NOS3, PRDX6, GSR	↑	0-100 μM/L	Kardiomiocyty	(Lv et al. 2014)
	↑	0-600 μM/L	Mioblasty szkieletowe	(Chen et al. 2020)
miR-500a ⊣ TXNRD1	↑	0-10 μM	MCF-7	(Esposti et al. 2017)

Tabela 10. Zmiany poziomów miRNA regulujących enzymy związane ze stanem redoks indukowane przez H₂O₂.

Odpowiedź na H_2O_2 może być różna w różnych typach komórek, a miRNA mogą wzrastać lub spadać po traktowaniu H_2O_2 w zależności od dawki H_2O_2 . Podwyższone poziomy miRNA, które zmniejszają ekspresję enzymów antyoksydacyjnych, obserwowane po ekspozycji na utleniacze, są raczej sprzeczne z intuicją. Jednak H_2O_2 pełni rolę cząsteczki sygnalizacyjnej, a obserwowane zmiany mogą być elementami ustalania się poziomów H_2O_2 specyficznych i optymalnych dla danego typu komórek. Zahamowanie SOD osłabiłoby konwersję O_2^- do H_2O_2 i w ten sposób komórki mogłyby zapobiegać nadmiernemu poziomowi H_2O_2 i wzmacniać inne, zależne od O_2^- , ścieżki systemu kontroli redoks, natomiast hamowanie enzymów neutralizujących H_2O_2 wzmacniałoby związaną z nim sygnalizację.

Poziomy miRNA mogą wzrastać lub spadać po ekspozycji na H_2O_2 w zależności od stężenia H_2O_2 . Dlatego poziomy miRNA zależą od stężenia RFT w komórkach. RFT i miRNA tworzą zatem rodzaj błędnego koła lub lepiej trójkąta, w którym miRNA wpływają na poziomy RFT poprzez enzymy związane z RFT, podczas gdy RFT (H_2O_2) wpływają na poziomy miRNA; oznacza to, że miRNA i RFT są ściśle powiązane i wzajemnie na siebie wpływają. Razem tworzą system pętli sprzężenia zwrotnego, które mogą zarządzać odpowiedziami komórek na warunki środowiskowe (Rysunek 16).

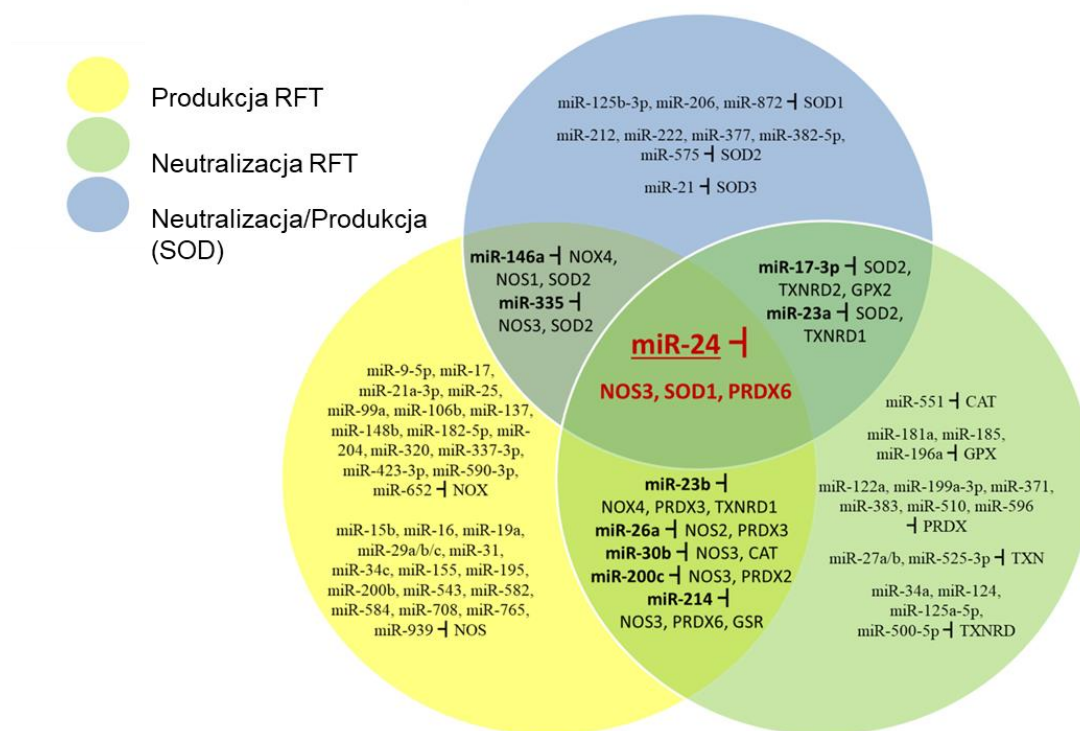


Rysunek 16. Wzajemna regulacja miRNA i RFT poprzez regulację enzymów redoks.

Źródło opracowanie własne, przekształcone z (Ciesielska et al. 2021).

Przeanalizowane dane pokazują, że odpowiedzi systemów związanych z RFT w komórkach są przynajmniej częściowo regulowane przez miRNA. Co zaskakujące, to samo miRNA może celować w mRNA dla białek, które mają przeciwne efekty. Rysunek 17 pokazuje miRNA, które celują w mRNA kodujące enzymy wytwarzające i neutralizujące

RFT. Enzymy SOD są traktowane oddzielnie, ponieważ neutralizują O_2^- , ale jednocześnie wytwarzają H_2O_2 , który jest utleniaczem. Podczas gdy większość miRNA celuje tylko w producentów RFT, neutralizatorów RFT lub SOD, niektóre celują zarówno w mRNA enzymów produkujących i neutralizujących RFT, a jedno miRNA, celuje we wszystkie trzy rodzaje enzymów związanych ze stanem redoks.



Rysunek 17. miRNA, które celują w różne części systemu kontroli redoks (enzymy produkujące RFT, neutralizujące RFT i SOD).

Źródło opracowanie własne, przekształcone z (Ciesielska et al. 2021)

MiR-17-3p może celować w transkrypty SOD2, TXNRD2 i GPX2 oraz miR-23a SOD2 i TXNRD1 wpływające na elementy konwersji i neutralizacji H_2O_2 . MiR-23b może celować w NOX4, TXNRD1 i PRDX3; miR-26a NOS2 i PRDX3; miR-30b NOS3 i CAT; miR-200c NOS3 i PRDX2; Transkrypty miR-214 NOS3, PRDX6 i GSR wpływające na etapy produkcji i neutralizacji systemu redoks. MiR-146a celuje w NOX4, NOS1 i SOD2, a miR-335 celuje w transkrypty NOS3 i SOD2, które wpływają na produkcję i konwersję anionorodnika ponadtlennkowego. Jedno miRNA (miR-24) wpływa na wszystkie trzy elementy systemu związanego z RFT, transkrypty NOS3, SOD1 i PRDX6.

Zmiany stężenia miRNA, które mogą jednocześnie obniżać ekspresję enzymów produkujących i neutralizujących RFT, są zapewne połączone z obwodami, które

specyficznie regulują śmierć i przeżycie komórek w określonych warunkach. W zależności od poziomu RFT regulacja może być zorganizowana w pętli dodatniego lub ujemnego sprzężenia zwrotnego, sugeruje to, że komórki dostosowują swoje środowisko redoks, aby osiągnąć optymalne poziomy dla określonych procesów komórkowych.

Nieintuicyjne efekty obserwowano także w komórkach radiowrażliwych i radioopornych i mogą być związane z enzymami produkującymi oraz neutralizującymi reaktywne formy tlenu. W niektórych typach komórek poziomy NOX są ujemnie skorelowane z poziomami enzymów neutralizujących RFT, takich jak CAT, SOD, GPX i TXNL1 (Im et al. 2012; Shen et al. 2020) i dodatnio skorelowane z poziomami TXNIP (który zwiększa poziom RFT poprzez hamowanie TXN) (Gu et al. 2019). W doświadczeniach przeprowadzonych na rdzeniu kręgowym myszy, w których indukowano spadek poziomu NOX4 (a następnie spadek RFT) zaobserwowano wzrost poziomu ekspresji antyoksydantów GPX3 i TXNL1 (Im et al. 2012). Podobnie nadekspresja miR-320, a następnie spadek NOX2 spowodowały podwyższenie poziomu CAT, SOD i GPX w neuronach mózgowych myszy (Shen et al. 2020). W ludzkich komórkach śródbłonna mikronaczyniowego siatkówki wzrostowi poziomu NOX4 uzyskanemu przez obniżenie poziomu miR-590-3p towarzyszył wzrost TXNIP, który jest inhibitorem tioredoksyn (Gu et al. 2019). W komórkach mózgowych szczurów inhibicji NOX4 towarzyszył wzrost poziomu GPX i SOD (Xie et al. 2020). W komórkach mięśni gładkich dróg oddechowych ekspresja MnSOD została zahamowana przez zwiększoną ekspresję NOX4 (Michaeloudes et al. 2011). W HUVEC inhibicja NOX4 zmniejszyła ekspresję eNOS i produkcję NO (Schröder et al. 2012). W VSMC nadekspresja NOX2 i zwiększona produkcja RFT prowadziły do znacznego wzrostu białka NOS, a także białka MnSOD (Bendall et al. 2007). Odwrotny efekt zaobserwowano w badaniach Gregg'a gdzie CAT i SOD uległy obniżeniu po inhibicji NOX4 (Gregg et al. 2014) oraz w pracy Jeong'a gdzie SOD i GPX uległy zmniejszeniu po inhibicji NOX4 (Jeong et al. 2018). Przedstawione przykłady pokazują skomplikowane interakcje pomiędzy enzymami, które mogą wpływać na jakość neutralizacji. NOX4 jest enzymem produkującym celowo RFT w komórkach, w przypadku komórek radiowrażliwych i radioopornych istotna jest produkcja RFT następująca po promieniowaniu, jako, że komórki nie potrafią rozróżnić RFT produkowanych przez promieniowanie od tych produkowanych wewnątrz komórki, mechanizmy mogą być podobne jak w przypadku działania NOX na enzymy neutralizujące.

SPIS TABEL

Tabela 1. Ekspresja genów w komórkach Me45 i HCT116 (dane mikromacierzowe).

*jednostki umowne otrzymane ze znormalizowanych danych mikromacierzowych

Tabela 2. Efekty komórkowe związane ze zwiększeniem poziomu miRNA, które celują w transkrypty enzymów neutralizujących H_2O_2 . miRNA w szarych wierszach wykazują odwrotny wpływ na przeżycie komórek niż te w białych wierszach.

Tabela 3. Podstawowe parametry wykorzystywane w modelu neutralizacji RFT.

Tabela 4. Dane mikromacierzowe wybranych enzymów w liniach HCT116 i Me45

Tabela 5. Wartości ekspresji wybranych genów dla linii komórkowych chłoniaków Burkitta (ST486, CA46) oraz Hodkina (L428, L1236, KMH2) pobrane z bazy CCLE przedstawione w odniesieniu do linii HCT116 traktowanej jako linia komórkowa odniesienia.

Tabela 6. Wartości ekspresji wybranych genów dla linii komórkowych nowotworu piersi rozróżnione pod względem radiowrażliwości pobrane z bazy CCLE przedstawione w odniesieniu do linii HCT116 traktowanej jako linia komórkowa odniesienia. Linie radiowrażliwe (MDAMB361, MDAMB231), linie radiooporne (MCF7, T47D).

Tabela 7. Wartości ekspresji wybranych genów dla linii komórkowych nowotworu płuc rozróżnione pod względem radiowrażliwości pobrane z bazy CCLE przedstawione w odniesieniu do linii HCT116 traktowanej jako linia komórkowa odniesienia. Linia radiowrażliwa (H460), linie radiooporne (H1299, A549).

Tabela 8. Wartości ekspresji wybranych genów dla linii komórkowych nowotworów krwi rozróżnione pod względem radiowrażliwości pobrane z bazy CCLE przedstawione w odniesieniu do linii HCT116 traktowanej jako linia komórkowa odniesienia. Linie radiowrażliwe (HL60 i Raji), linie radiooporne (K562)

Tabela 9. Wartości ekspresji wybranych genów dla linii komórkowych nowotworów jelita grubego rozróżnione pod względem radiowrażliwości pobrane z bazy CCLE przedstawione w odniesieniu do linii HCT116 traktowanej jako linia komórkowa odniesienia. Linie radiowrażliwe (Colo201, Colo205, Colo320, HCT116), linie radiooporne (Lovo, HCT15, HT29, DLD1)

Tabela 10. Zmiany poziomów miRNA regulujących enzymy związane ze stanem redoks indukowane przez H_2O_2 .

SPIS RYSUNKÓW

Rysunek 1. Produkcja i neutralizacja RFT.

Rysunek 2. Mapa termiczna ekspresji enzymów biorących udział w produkcji $O_2^{\cdot-}$, NO i H_2O_2 oraz ich neutralizacji w 1025 liniach komórkowych pochodzących z różnych tkanek.

Rysunek 3. MiRNA celujące w enzymy odpowiedzialne za produkcję (NOX i NOS) i neutralizację anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$) i tlenku azotu (NO) wraz z dysmutazą ponadtlenkową (SOD), która przekształca $O_2^{\cdot-}$ w H_2O_2 oraz odpowiedzialne za neutralizację H_2O_2 . ⊥ oznacza inhibicję.

Rysunek 4. Klonogenność komórek po ekspozycji na różne dawki promieniowania UVA. (A) komórki HCT116, (B) komórki Me45. Dane pokazują średnią i odchylenie standardowe z 3 eksperymentów. Gwiazdki oznaczają znamienność statystyczną, pomiędzy komórkami napromieniowanymi i kontrolnymi ($p < 0,05$). Pozioma, przerywana linia reprezentuje poziom kontroli.

Rysunek 5. Średnie poziomy RFT, $O_2^{\cdot-}$ i NO w komórkach HCT116 i Me45 eksponowanych na różne dawki promieniowania UVA. Wyniki przedstawiono jako krotność zmiany w napromieniowanych komórkach w porównaniu do nienapromieniowanej kontroli. Dane pokazują średnią i odchylenie standardowe z 4 eksperymentów; statystycznie istotne różnice ($p < 0,05$) oznaczono gwiazdkami.

Rysunek 6. Zmiany anionorodnika ponadtlenkowego, tlenku azotu i RFT w czasie wykrywanych odpowiednio przez MITOSox, DAF-FM i DCFH-DA w komórkach kontrolnych i napromieniowanych UVA. Każda krzywa przedstawia wyniki po ekspozycji na konkretną dawkę UVA; dane są średnimi z trzech eksperymentów, słupki błędów nie zostały pokazane dla przejrzystości.

Rysunek 7. Schemat neutralizacji RFT wykorzystywany w modelu matematycznym (model konceptualny, wyodrębnienie szlaku neutralizacji H_2O_2 z sieci powiązań).

Rysunek 8. Schemat neutralizacji H_2O_2 , implementacja w środowisku Matlab Simulink (wyjaśnienie używanych symboli powyżej).

Rysunek 9. Dynamika H_2O_2 , peroksyredoksyn i tioredoksyn w sytuacjach (A) system startuje z ograniczonej ilości H_2O_2 bez dodatkowego dopływu H_2O_2 , (B) i (C) w systemie pojawia się stały dopływ H_2O_2 w (B) 10 razy mniejszy niż w (C).

Rysunek 10. Dynamika peroksyredoksyn i tioredoksyn w układzie z równowagą z rysunku 9B.

Rysunek 11. Pojawienie się w układzie ze stanem ustalonym dodatkowej ilości H_2O_2 dostarczanej chronicznie do układu (A), pojawienie się w układzie jednorazowo dodatkowej ilości H_2O_2 (B) lub cykliczne pojawianie się H_2O_2 (C).

Rysunek 12. Neutralizacja zadanego poziomu H_2O_2 bez stałego dopływu w liniach komórkowych Me45 i HCT116.

Rysunek 13. Porównanie neutralizacji H_2O_2 w różnych liniach komórkowych za pomocą symulacji komputerowych, w których zakładano wyłączanie różnych systemów neutralizacji. Komórki otrzymywały chronicznie 1×10^{-8} H_2O_2 do neutralizacji. Na wykresach przedstawiony jest poziom H_2O_2 po neutralizacji w stanie ustalonym dla systemów CAT, PRDX-TXN, GSH-GPX osobno oraz dla wszystkich systemów razem. W pierwszym rzędzie porównano linie HCT116 i Me45, a w drugim rzędzie linie chłoniaków Hodgkina i Burkitta

Rysunek 14. Porównanie neutralizacji H_2O_2 w różnych liniach komórkowych za pomocą symulacji komputerowych, w których zakładano wyłączanie różnych systemów neutralizacji. Komórki otrzymywały chronicznie 1×10^{-8} H_2O_2 do neutralizacji, na wykresach przedstawiony jest poziom H_2O_2 po neutralizacji w stanie ustalonym dla systemów CAT, PRDX-TXN, GSH-GPX osobno oraz dla wszystkich systemów razem. W pierwszym rzędzie porównano linie nowotworu płuc, w drugim piersi, w trzecim krwi, a w czwartym jelita grubego.

Rysunek 15. Poziomy RFT w komórkach Me45 i HCT116. Fluorescencja dla $O_2^{\cdot -}$ zmierzona za pomocą barwnika MitoSOX oraz za pomocą DCFH-DA dla RFT.

Rysunek 16. Wzajemna regulacja miRNA i RFT poprzez regulację enzymów redoks.

Rysunek 17. miRNA, które celują w różne części systemu kontroli redoks (enzymy produkujące RFT, neutralizujące RFT i SOD).

BIBLIOGRAFIA

- Adamiec M, Skonieczna M. 2019. UV radiation in HCT 116 cells influences intracellular H₂O₂ and glutathione levels, antioxidant expression, and protein glutathionylation. *Acta Biochim Pol* 66(4):605–610. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31883365/>
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. 2001. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. *Biochem J* 357(3):593–615. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11463332/>
- Alemdehy MF, Haanstra JR, De Looper HWJ, Van Strien PMH, Verhagen-Oldenampsen J, Caljouw Y, Sanders MA, Hoogenboezem R, De Ru AH, Janssen GMC, et al. 2015. ICL-induced miR139-3p and miR199a-3p have opposite roles in hematopoietic cell expansion and leukemic transformation. *Blood* 125(25):3937–3948. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25778535>
- Ambarsari L, Lindawati E. Isolation, Fractionation and Characterization of Catalase from *Neurospora crassa* (InaCC F226).
- Anastasov N, Höfig I, Vasconcellos IG, Rappl K, Braselmann H, Ludyga N, Auer G, Aubele M, Atkinson MJ. 2012. Radiation resistance due to high expression of miR-21 and G2/M checkpoint arrest in breast cancer cells. *Radiat Oncol* 7(1):206. </pmc/articles/PMC3573984/>
- Andrew PJ, Mayer B. 1999. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 43(3):521–531. www.elsevier.com/locate/cardiores www.elsevier.nl/locate/cardiores
- Aon MA, Stanley BA, Sivakumaran V, Kembro JM, O'Rourke B, Paolocci N, Cortassa S. 2012. Glutathione/thioredoxin systems modulate mitochondrial H₂O₂ emission: An experimental-computational study. *J Gen Physiol* 139(6):479. </pmc/articles/PMC3362521/>
- Arnér ESJ, Holmgren A. 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 267(20):6102–6109.
- Arnold R, Shi J, Murad E, Whalen A, Sun C, Polavarapu R, Parthasarathy S, Petros J, Lambeth J. 2001. Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic oxidase Nox1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(10):5550–5555. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11331784/>
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, et al. 2000. Gene ontology: Tool for the unification of biology. *Nat Genet* 25(1):25–29. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10802651/>
- Athar A, Fullgrave A, George N, Iqbal H, Huerta L, Ali A, Snow C, Fonseca NA, Petryszak R, Papatheodorou I, et al. 2018. ArrayExpress update – from bulk to single-cell expression data. *Nucleic Acids Res* 47(D1):D711–D715. <https://academic.oup.com/nar/article/47/D1/D711/5144130>
- Augusto O, Bonini MG, Amanso AM, Linares E, Santos CCX, De Menezes SL. 2002. Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free Radic Biol Med* 32(9):841–859.
- Bachelor MA, Bowden GT. 2004. UVA-mediated activation of signaling pathways involved in skin tumor promotion and progression. *Semin Cancer Biol* 14:131–138.
- Bai J, Cederbaum AI. 2001. Mitochondrial catalase and oxidative injury. *NeuroSignals* 10(3–4):189–199.

- Bai XY, Ma Y, Ding R, Fu B, Shi S, Chen XM. 2011. miR-335 and miR-34a promote renal senescence by suppressing mitochondrial antioxidative enzymes. *J Am Soc Nephrol*. 22(7):1252–1261.
- Balazy M, Kaminski PM, Mao K, Tan J, Wolin MS. 1998. S-Nitroglutathione, a product of the reaction between peroxynitrite and glutathione that generates nitric oxide. *J Biol Chem* 273(48):32009–32015. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9822673/>
- Bartesaghi S, Radi R. 2018. Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox Biol* 14:618–625. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29154193/>
- Bartosz G. 2006. Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species. *Clin Chim Acta*. 368(1–2):53–76.
- Bendall JK, Rinze R, Adlam D, Tatham AL, De Bono J, Channon KM. 2007. Endothelial Nox2 overexpression potentiates vascular oxidative stress and hemodynamic response to angiotensin II: Studies in endothelial-targeted Nox2 transgenic mice. *Circ Res* 100(7):1016–1025. <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.RES.0000263381.83835.7b>
- Benson M, Batchelor H, Chuaiphichai S, Bailey J, Zhu H, Stuehr D, Bhattacharya S, Channon K, Crabtree M. 2013. A pivotal role for tryptophan 447 in enzymatic coupling of human endothelial nitric oxide synthase (eNOS): effects on tetrahydrobiopterin-dependent catalysis and eNOS dimerization. *J Biol Chem* 288(41):29836–29845. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23965989/>
- Bernhard E, Maity A, Muschel R, McKenna W. 1995. Effects of ionizing radiation on cell cycle progression. A review. *Radiat Environ Biophys* 34(2):79–83. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7652155/>
- Bernhard WA, Purkayastha S, Milligan JR. 2008. Which dna damage is likely to be relevant in hormetic responses? *Dose-Response* 6(2):184–195. </pmc/articles/PMC2478520/>
- Bil P, Ciesielska S, Jaksik R, Rzeszowska-Wolny J. 2020. Circuits Regulating Superoxide and Nitric Oxide Production and Neutralization in Different Cell Types: Expression of Participating Genes and Changes Induced by Ionizing Radiation. *Antioxidants* 9(8):701. <https://www.mdpi.com/2076-3921/9/8/701>
- Boonstra J, Post J. 2004. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 337(SUPPL.):1–13. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15276197/>
- Bradshaw PC. 2019. Cytoplasmic and mitochondrial NADPH-coupled Redox systems in the regulation of aging. *Nutrients* 11(3). </pmc/articles/PMC6471790/?report=abstract>
- Brown MR, Miller FJ, Li W-G, Ellingson AN, Mozena JD, Chatterjee P, Engelhardt JF, Zwacka RM, Oberley LW, Fang X, et al. 1999. Overexpression of Human Catalase Inhibits Proliferation and Promotes Apoptosis in Vascular Smooth Muscle Cells 85(6):524–533. <http://www.circresaha.org>
- Bumgarner R. 2013. Overview of dna microarrays: Types, applications, and their future. *Curr Protoc Mol Biol* 0 22(SUPPL.101):Unit. </pmc/articles/PMC4011503/>
- Burdon R. 1995. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med* 18(4):775–794. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7750801/>

- Burdon R, Gill V, Rice-Evans C. 1989. Cell proliferation and oxidative stress. *Free Radic Res Commun* 7(3–6):149–159. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2511085/>
- Busato F, Khouzai B El, Mognato M. 2022. Biological Mechanisms to Reduce Radioresistance and Increase the Efficacy of Radiotherapy: State of the Art. *Int J Mol Sci* 2022, Vol 23, Page 10211 23(18):10211. <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/18/10211/htm>
- Candas D, Li JJ. 2014. MnSOD in oxidative stress response-potential regulation via mitochondrial protein influx. *Antioxidants Redox Signal*. 20(10):1599–1617.
- Carlomosti F, D'Agostino M, Beji S, Torcinaro A, Rizzi R, Zaccagnini G, Maimone B, Di Stefano V, De Santa F, Cordisco S, et al. 2017. Oxidative Stress-Induced miR-200c Disrupts the Regulatory Loop among SIRT1, FOXO1, and eNOS. *Antioxidants Redox Signal* 27(6):328–344. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27960536>
- Chen W, Zhang Y nan, Jia Q qiong, Ji A, Shao S xia, Zhang L, Gong M, Yin Q, Huang X li. 2020. MicroRNA-214 protects L6 skeletal myoblasts against hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Free Radic Res* 54(2–3):162–172. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10715762.2020.1730828>
- Chiu J, Dawes IW. 2012. Redox control of cell proliferation. *Trends Cell Biol* 22(11):592–601. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0962892412001419>
- Cho SH, Lee CH, Ahn Y, Kim Hyunjung, Kim Hoeon, Ahn CY, Yang KS, Lee SR. 2004. Redox regulation of PTEN and protein tyrosine phosphatases in H₂O₂-mediated cell signaling. *FEBS Lett*. 560(1–3):7–13.
- Christman MF, Morgan RW, Jacobson FS, Ames BN. 1985. Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell*. 41(3):753–762.
- Ciesielska S, Bil P, Gajda K, Poterala-Hejmo A, Hudy D, Rzeszowska-Wolny J. 2019. Cell type-specific differences in redox regulation and proliferation after low UVA doses. *Bachschmid MM, editor. PLoS One* 14(1):e0205215. <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0205215>
- Ciesielska S, Slezak-Prochazka I, Bil P, Rzeszowska-Wolny J. 2021. Micro RNAs in Regulation of Cellular Redox Homeostasis. *Int J Mol Sci* 2021, Vol 22, Page 6022 22(11):6022. <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/11/6022/htm>
- Claire CJW, Miller. 2005. Simpleaffy: a BioConductor package for Affymetrix Quality Control and data analysis. *Bioinformatics* (21(18)):3683–5. <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/21/18/3683/202458>
- Cortassa S, Aon MA, Winslow RL, O'Rourke B. 2004. A Mitochondrial Oscillator Dependent on Reactive Oxygen Species. *Biophys J*. 87(3):2060–2073.
- Cortat B, Garcia C, Quinet A, Schuch A, de Lima-Bessa K, Menck C. 2013. The relative roles of DNA damage induced by UVA irradiation in human cells. *Photochem Photobiol Sci* 12(8):1483–1495. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23824260/>
- Cortez MA, Valdecanas D, Zhang X, Zhan Y, Bhardwaj V, Calin GA, Komaki R, Giri DK, Quini CC, Wolfe T, et al. 2014. Therapeutic delivery of mir-200c enhances radiosensitivity in lung cancer. *Mol Ther*. 22(8):1494–1503.

- Crabtree M, Brixey R, Batchelor H, Hale A, Channon K. 2013. Integrated redox sensor and effector functions for tetrahydrobiopterin- and glutathionylation-dependent endothelial nitric-oxide synthase uncoupling. *J Biol Chem* 288(1):561–569. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23139420/>
- Crow JP. 1997. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: Implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide - Biol Chem.* 1(2):145–157.
- Culotta V, Yang M, O'Halloran T. 2006. Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochim Biophys Acta* 1763(7):747–758. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16828895/>
- Dai J, Wei RJ, Li R, Feng JB, Yu YL, Liu PS. 2016. A study of CCND1 with epithelial ovarian cancer cell proliferation and apoptosis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 20(20):4230–4235. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27831653>
- Dai M, Wang P, Boyd AD, Kostov G. 2005. Evolving gene/transcript definitions significantly alter the interpretation of GeneChip data. *Nucleic Acid Res* 33(20):e175. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1283542/>
- Das KC, Das CK. 2000. Thioredoxin, a Singlet Oxygen Quencher and Hydroxyl Radical Scavenger: Redox Independent Functions. <http://www.idealibrary.com>
- Davies JMS, Lowry C V., Davies KJA. 1995. Transient Adaptation to Oxidative Stress in Yeast. *Arch Biochem Biophys.* 317(1):1–6.
- Davies K. 1999. The Broad Spectrum of Responses to Oxidants in Proliferating Cells: A New Paradigm for Oxidative Stress. *IUBMB Life* 48(1):41–47. <http://doi.wiley.com/10.1080/713803463>
- Day RM, Suzuki YJ. 2005. Cell Proliferation, Reactive Oxygen and Cellular Glutathione. Dose-Response 3(3):dose-response.0. <http://journals.sagepub.com/doi/10.2203/dose-response.003.03.010>
- Diao S, Zhang J, Wang H, He M, Lin MC, Chen Y, Kung H. 2010. Proteomic identification of microRNA-122a target proteins in hepatocellular carcinoma. *Proteomics* 10(20):3723–3731. <http://doi.wiley.com/10.1002/pmic.201000050>
- Didier C, Kerblat I, Drouet C, Favier A, Béani J, Richard M. 2001. Induction of thioredoxin by ultraviolet-A radiation prevents oxidative-mediated cell death in human skin fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 31(5):585–598. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11522443/>
- Dong D, Fu N, Yang P. 2016. MiR-17 Downregulation by High Glucose Stabilizes Thioredoxin-Interacting Protein and Removes Thioredoxin Inhibition on ASK1 Leading to Apoptosis. *Toxicol Sci* 150(1):84–96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26660634>
- Dong F, Dong S, Liang Y, Wang K, Qin Y, Zhao X. 2020. MiR-20b inhibits the senescence of human umbilical vein endothelial cells through regulating the Wnt/ β -catenin pathway via the TXNIP/NLRP3 axis. *Int J Mol Med* 45(3):847–857. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31922218>
- Dreyer J, Schleicher M, Tappe A, Schilling K, Kuner T, Kusumawidijaja G, Müller-Esterl W, Oess S, Kuner R. 2004. Nitric oxide synthase (NOS)-interacting protein interacts with neuronal NOS and regulates its distribution and activity. *J Neurosci.* 24(46):10454–10465.

- Edgar RS, Green EW, Zhao Y, Van Ooijen G, Olmedo M, Qin X, Xu Y, Pan M, Valekunja UK, Feeney KA, et al. 2012. Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms. *Nature* 485(7399):459–464. <https://www.nature.com/articles/nature11088>
- Epe B, Ballmaier D, Roussyn I, Briviba K, Sies H. 1996. DNA damage by peroxynitrite characterized with DNA repair enzymes. *Nucleic Acids Res* 24(21):4105. </pmc/articles/PMC146252/?report=abstract>
- Esposti DD, Aushev VN, Lee E, Cros MP, Zhu J, Herceg Z, Chen J, Hernandez-Vargas H. 2017. MiR-500a-5p regulates oxidative stress response genes in breast cancer and predicts cancer survival. *Sci Rep*. 7(1):1–10.
- Fang Y, Moore B, Bai Q, Cook K. 2013. Hydrogen Peroxide Enhances Radiation-induced Apoptosis and Inhibition of Melanoma Cell Proliferation | Request PDF. *Anticancer Res* 33(5):1799–1807. https://www.researchgate.net/publication/236639641_Hydrogen_Peroxide_Enhances_Radiation-induced_Apoptosis_and_Inhibition_of_Melanoma_Cell_Proliferation
- Feinendegen L. 1999. The role of adaptive responses following exposure to ionizing radiation. *Hum Exp Toxicol* 18(7):426–432. <http://journals.sagepub.com/doi/10.1191/096032799678840309>
- Feinendegen L, Pollycove M, Sondhaus CA. 2004. Responses to Low Doses of Ionizing Radiation in Biological Systems. *Nonlinearity Biol Toxicol Med*. 2(3):154014204905074.
- Feng C. 2012. Mechanism of nitric oxide synthase regulation: Electron transfer and interdomain interactions. *Coord Chem Rev*. 256(3–4):393–411.
- Florence TM. 1984. The production of hydroxyl radical from hydrogen peroxide. *J Inorg Biochem*. 22(4):221–230.
- Forman H. 2016. Redox signaling: An evolution from free radicals to aging. *Free Radic Biol Med* 97:398–407. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27393004/>
- Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 1(5):2315–2319. <https://www.nature.com/articles/nprot.2006.339>
- Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA. 2004. affy—analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level | Bioinformatics | Oxford Academic. *Bioinformatics* (20(3)):307–15. <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/20/3/307/185980>
- Ghandi M, Huang FW, Jané-Valbuena J, Kryukov G V., Lo CC, McDonald ER, Barretina J, Gelfand ET, Bielski CM, Li H, et al. 2019. Next-generation characterization of the Cancer Cell Line Encyclopedia. *Nature* 569(7757):503–508. </pmc/articles/PMC6697103/?report=abstract>
- Glorieux C, Calderon PB. 2017. Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol Chem* 398(10):1095–1108. <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/hsz-2017-0131/html>
- Gomes A, Fernandes E, Lima JLFC. 2005. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J Biochem Biophys Methods*. 65(2–3):45–80.
- Gregg JL, Ii RMT, Chang G, Joshi D, Zhan Y, Chen L, Maranchie JK. 2014. Molecular and Cellular Pathobiology NADPH Oxidase NOX4 Supports Renal Tumorigenesis by Promoting the Expression and Nuclear Accumulation of HIF2a. <http://cancerres.aacrjournals.org/>

Grenda A, Budzyński M, Filip A. 2013. Biogenesis of microRNAs and their role in the development and course of selected hematologic disorders. *Postepy Hig Med Dosw* 67:174–185.

https://www.academia.edu/17953831/Biogenesis_of_microRNAs_and_their_role_in_the_development_and_course_of_selected_hematologic_disorders

Grogan TM, Fenoglio-Prieser C, Zeheb R, Bellamy W, Frutiger Y, Vela E, Stemmerman G, Macdonald J, Richter L, Gallegos A, Powis G. 2000. Thioredoxin, a putative oncogene product, is overexpressed in gastric carcinoma and associated with increased proliferation and increased cell survival. *Hum Pathol* 31(4):475–481. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10821495/>

Grossman N, Schneid N, Reuveni H, Halevy S, Lubart R. 1998. 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. *Lasers Surg Med* 22(4):212–218. <https://europepmc.org/article/med/9603282>

Gu C, Draga D, Zhou C, Su T, Zou C, Gu Q, Lahm T, Zheng Z, Qiu Q. 2019. MiR-590-3p inhibits pyroptosis in diabetic retinopathy by targeting NLRP1 and inactivating the NOX4 signaling pathway. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 60(13):4215–4223. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31618425>

Guo QJ, Mills JN, Bandurraga SG, Nogueira LM, Mason NJ, Camp ER, Larue AC, Turner DP, Findlay VJ. 2013. MicroRNA-510 promotes cell and tumor growth by targeting peroxiredoxin1 in breast cancer. *Breast Cancer Res* 15(4):R70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23971998>

Ha M, Kim VN. 2014. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15(8):509–524.

Han CY, Hien TT, Lim SC, Kang KW. 2011. Role of Pin1 in UVA-induced cell proliferation and malignant transformation in epidermal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 410(1):68–74.

Hanschmann E-M, Godoy JR, Berndt C, Hudemann C, Lillig CH. 2013. Thioredoxins, Glutaredoxins, and Peroxiredoxins—Molecular Mechanisms and Health Significance: from Cofactors to Antioxidants to Redox Signaling. <https://home.liebertpub.com/ars> 19(13):1539–1605. <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2012.4599>

Hao C, Xu X, Ma J, Xia J, Dai B, Liu L, Ma Y. 2017. MicroRNA-124 regulates the radiosensitivity of non-small cell lung cancer cells by targeting TXNRD1. *Oncol Lett* 13(4):2071–2078.

Haque R, Chun E, Howell JC, Sengupta T, Chen D, Kim H. 2012. MicroRNA-30b-mediated regulation of catalase expression in human ARPE-19 cells. *PLoS One* 7(8):e42542. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22880027>

He F, Ru X, Wen T. 2020. NRF2, a transcription factor for stress response and beyond. *Int J Mol Sci* 21(13):1–23. www.mdpi.com/journal/ijms

He HC, Zhu JG, Chen X Bin, Chen SM, Han ZD, Dai QS, Ling XH, Fu X, Lin ZY, Deng YH, et al. 2012. MicroRNA-23b downregulates peroxiredoxin III in human prostate cancer. *FEBS Lett* 586(16):2451–2458. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22710126>

Henle E, Linn S. 1997. Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 272(31):19095–19098. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9235895/>

- Heo MJ, Kim TH, You JS, Blaya D, Sancho-Bru P, Kim SG. 2019. Alcohol dysregulates miR-148a in hepatocytes through FoxO1, facilitating pyroptosis via TXNIP overexpression. *Gut* 68(4):708–720. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29475852>
- Herok R, Konopacka M, Polanska J, Swierniak A, Rogolinski J, Jaksik R, Hancock R, Rzeszowska-Wolny J. 2010. Bystander Effects Induced by Medium From Irradiated Cells: Similar Transcriptome Responses in Irradiated and Bystander K562 Cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 77(1):244–252. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20394856/>
- Hewitt OH, Degnan SM. 2023. Antioxidant enzymes that target hydrogen peroxide are conserved across the animal kingdom, from sponges to mammals. *Sci Rep* 13(1):2510. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/411925728/>
- Hoyle NP, O'Neill JS. 2015. Oxidation-reduction cycles of peroxiredoxin proteins and nontranscriptional aspects of timekeeping. *Biochemistry* 54(2):184–193. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25454580/>
- Hu L, Zhang H, Wang B, Ao Q, He Z. 2020. MicroRNA-152 attenuates neuroinflammation in intracerebral hemorrhage by inhibiting thioredoxin interacting protein (TXNIP)-mediated NLRP3 inflammasome activation. *Int Immunopharmacol* 80:106141. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31982825>
- Hu R, Saito AI, Mitsuhashi T, Inoue T, Ota T, Ujihira T, Yoshida K, Sasai K. 2021. Radiosensitization using hydrogen peroxide in patients with cervical cancer. *Mol Clin Oncol* 15(1):1–7. <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mco.2021.2304/abstract>
- Hua S, Quan Y, Zhan M, Liao H, Li Y, Lu L. 2019. MiR-125b-5p inhibits cell proliferation, migration, and invasion in hepatocellular carcinoma via targeting TXNRD1. *Cancer Cell Int* 19(1):203. <https://cancerci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12935-019-0919-6>
- Huang HY, Lin YCD, Li J, Huang KY, Shrestha S, Hong HC, Tang Y, Chen YG, Jin CN, Yu Y, et al. 2020. MiRTarBase 2020: Updates to the experimentally validated microRNA-target interaction database. *Nucleic Acids Res* 48(D1):D148–D154. <https://academic.oup.com/nar/article/48/D1/D148/5606625>
- Im YB, Jee MK, Choi JI, Cho HT, Kwon OH, Kang SK. 2012. Molecular targeting of NOX4 for neuropathic pain after traumatic injury of the spinal cord. *Cell Death Dis* 3(11):e426. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23152062>
- Immenschuh S, Baumgart-Vogt E. 2005. Peroxiredoxins, oxidative stress, and cell proliferation. *Antioxidants Redox Signal* 7(5–6):768–777. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15890023>
- Institute of Medicine (US) Committee to Study the Feasibility of, and Need for ES of ARO in the F of AV. 1995. *Basic Principles of Radiation Biology* National Academies Press (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK232435/>
- Institute of Medicine (US) Committee to Study the Feasibility of and N for, ES of ARO in the F of AV. 1995. *Adverse Reproductive Outcomes in Families of Atomic Veterans: The Feasibility of Epidemiologic Studies*. *Advers Reprod Outcomes Fam At Veterans*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK232432/>
- Jadhav VS, Krause KH, Singh SK. 2014. HIV-1 Tat C modulates NOX2 and NOX4 expressions through miR-17 in a human microglial cell line. *J Neurochem* 131(6):803–815. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25146963>

- Jaksik R, Lalik A, Skonieczna M, Cieslar-Pobuda A, Student S, Rzeszowska-Wolny J. 2014. MicroRNAs and reactive oxygen species: Are they in the same regulatory circuit? *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen.* 764–765:64–71.
- Jeong BY, Lee HY, Park CG, Kang J, Yu S-L, Choi D, Han S-Y, Park MH, Cho S, Lee SY, et al. 2018. Oxidative stress caused by activation of NADPH oxidase 4 promotes contrast-induced acute kidney injury. Mukhopadhyay P, editor. *PLoS One* 13(1):e0191034. <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0191034>
- Ji G, Lv K, Chen H, Wang T, Wang Y, Zhao D, Qu L, Li Y. 2013. MiR-146a Regulates SOD2 Expression in H₂O₂ Stimulated PC12 Cells. Kahle PJ, editor. *PLoS One* 8(7):e69351. <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0069351>
- Kamat JP. 2006. Peroxynitrite: A potent oxidizing and nitrating agent. *Indian J Exp Biol.* 44(6):436–447.
- Kannouche P, Pinon-Lataillade G, Tissier A, Chevalier-Lagente O, Sarasin A, Mezzina M, Angulo J. 1998. The nuclear concentration of kin17, a mouse protein that binds to curved DNA, increases during cell proliferation and after UV irradiation. *Carcinogenesis* 19(5):781–789. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9635863/>
- Karpenko IL, Valuev-Elliston VT, Ivanova ON, Smirnova OA, Ivanov A V. 2021. Peroxiredoxins-The Underrated Actors during Virus-Induced Oxidative Stress. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 10(6). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34207367/>
- Karu T, Andreichuk T, Ryabykh T. 1993. Changes in oxidative metabolism of murine spleen following laser and superluminous diode (660–950 nm) irradiation: Effects of cellular composition and radiation parameters. *Lasers Surg Med* 13(4):453–462. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/lsm.1900130410>
- Kazula A. 2009. Wykorzystanie mikromacierzy DNA w terapii i diagnostyce. *Farm Pol - PTFarm* 103. <https://www.ptfarm.pl/wydawnictwa/czasopisma/farmacja-polska/103/-/11686>
- Kembro JM, Aon MA, Winslow RL, O'Rourke B, Cortassa S. 2013. Integrating Mitochondrial Energetics, Redox and ROS Metabolic Networks: A Two-Compartment Model. *Biophys J.* 104(2):332–343.
- Keston AS, Brandt R. 1965. The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. *Anal Biochem.* 11(1):1–5.
- Kim H-L, Park Y-S. 2010. Maintenance of cellular tetrahydrobiopterin homeostasis. *BMB Rep.* 43(9):584–592.
- Kim JS, Jeong K, Murphy JM, Rodriguez YAR, Lim STS. 2019. A quantitative method to measure low levels of ros in nonphagocytic cells by using a chemiluminescent imaging system. *Oxid Med Cell Longev.* 2019.
- Kitamoto K, Miura Y, Karnan S, Ota A, Konishi H, Hosokawa Y, Sato K. 2018. Inhibition of NADPH oxidase 2 induces apoptosis in osteosarcoma: The role of reactive oxygen species in cell proliferation. *Oncol Lett* 15(5):7955–7962. [/pmc/articles/PMC5920860/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30888860/)
- Klotz L, Pellieux C, Briviba K, Pierlot C, Aubry J, Sies H. 1999. Mitogen-activated protein kinase (p38-, JNK-, ERK-) activation pattern induced by extracellular and intracellular singlet oxygen and UVA. *Eur J Biochem* 260(3):917–922. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10103024/>

- Knoll S, Fürst K, Kowtharapu B, Schmitz U, Marquardt S, Wolkenhauer O, Martin H, Pützer BM. 2014. E2F1 induces miR-224/452 expression to drive EMT through TXNIP downregulation. *EMBO Rep* 15(12):1315–1329. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25341426>
- Ko YS, Jin H, Lee JS, Park SW, Chang KC, Kang KM, Jeong BK, Kim HJ. 2018. Radioresistant breast cancer cells exhibit increased resistance to chemotherapy and enhanced invasive properties due to cancer stem cells. *Oncol Rep* 40(6):3752–3762. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30272295/>
- Kobunai T, Watanabe T, Fukusato T. 2011. REG4, NEIL2, and BIRC5 Gene Expression Correlates with Gamma-radiation Sensitivity in Patients with Rectal Cancer Receiving Radiotherapy. *Anticancer Res* 31(12):4147 LP – 4153. <http://ar.iijournals.org/content/31/12/4147.abstract>
- Kohen R, Nyska A. 2002. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 30(6):620–650.
- Kraemer A, Barjaktarovic Z, Sarioglu H, Winkler K, Eckardt-Schupp F, Tapio S, Atkinson MJ, Moertl S. 2013. Cell Survival Following Radiation Exposure Requires miR-525-3p Mediated Suppression of ARRB1 and TXN1. Kyprianou N, editor. *PLoS One* 8(10):e77484. <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0077484>
- Krzywon A, Widel M, Fujarewicz K, Skonieczna M, Rzeszowska-Wolny J. 2018. Modulation by neighboring cells of the responses and fate of melanoma cells irradiated with UVA. *J Photochem Photobiol B Biol* 178:505–511.
- Kumari S, Badana AK, Murali Mohan G, Shailender G, Malla RR. 2018. Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. *Biomark Insights* 13. </pmc/articles/PMC5808965/?report=abstract>
- Kurutas EB. 2016. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: Current state. *Nutr J* 15(1). </pmc/articles/PMC4960740/?report=abstract>
- Lee J, Koo N, Min DB. 2004. Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 3(1):21–33.
- Lee JY, Kim MS, Lee MS, Ju JE, Chung N, Jeong YK. 2017. Digoxin enhances radiation response in radioresistant A549 cells by reducing protein phosphatase 2A. *Biosci Rep* 37(6). </pmc/articles/PMC5707360/>
- Lefemme C, Kelly W, Reynolds RJ, Schecker JA. 1995. Radiation, Cell Cycle, and Cancer We have seen the enemy, and he is us! *Los Alamos Sci* 23.
- Li G, Ho V. 1998. p53-dependent DNA repair and apoptosis respond differently to high- and low-dose ultraviolet radiation. *Br J Dermatol* 139(1):3–10. <https://europepmc.org/article/med/9764141>
- Li KKW, Pang JCS, Lau KM, Zhou L, Mao Y, Wang Y, Poon WS, Ng HK. 2013. MiR-383 is downregulated in medulloblastoma and targets peroxiredoxin 3 (PRDX3). *Brain Pathol* 23(4):413–425. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23227829>
- Li Q, Wang N, Wei H, Li C, Wu J, Yang G. 2016. miR-24-3p Regulates Progression of Gastric Mucosal Lesions and Suppresses Proliferation and Invasiveness of N87 Via

Peroxiredoxin 6. Dig Dis Sci 61(12):3486–3497.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27743162>

Li Z-N, Ge M-X, Yuan Z-F. 2020. MicroRNA-182-5p protects human lens epithelial cells against oxidative stress-induced apoptosis by inhibiting NOX4 and p38 MAPK signalling. *BMC Ophthalmol* 20(1):233.
<https://bmcophthalmol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12886-020-01489-8>

Lin H, Qian J, Castillo AC, Long B, Keyes KT, Chen G, Ye Y. 2011. Effect of miR-23 on Oxidant-induced injury in human retinal pigment epithelial cells. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 52(9):6308–6314.

Lin Y, Liu X, Cheng Y, Yang J, Huo Y, Zhang C. 2009. Involvement of MicroRNAs in hydrogen peroxide-mediated gene regulation and cellular injury response in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 284(12):7903–7913. /pmc/articles/PMC2658083/?report=abstract

Lipinski B. 2011. Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Oxid Med Cell Longev*.

Liu N, Shi YF, Diao HY, Li YX, Cui Y, Song XJ, Tian X, Li TY, Liu B. 2017. MicroRNA-135a regulates apoptosis induced by hydrogen peroxide in rat cardiomyoblast cells. *Int J Biol Sci* 13(1):13–21. /pmc/articles/PMC5264257/?report=abstract

Liu Q, Bai W, Huang F, Tang J, Lin X. 2019. Downregulation of microRNA-196a inhibits stem cell self-renewal ability and stemness in non-small-cell lung cancer through upregulating GPX3 expression. *Int J Biochem Cell Biol* 115:105571.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31352088>

Lu B, Christensen IT, Ma LW, Wang XL, Jiang LF, Wang CX, Feng L, Zhang JS, Yan QC. 2018. MiR-24-p53 pathway evoked by oxidative stress promotes lens epithelial cell apoptosis in age-related cataracts. *Mol Med Rep* 17(4):5021–5028. <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2018.8492/abstract>

Lubart R, Eichler M, Lavi R, Friedman H, Shainberg A. 2005. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. *Photomed Laser Surg* 23(1):3–9.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15782024>

Luckey TD. 2006. Radiation Hormesis: The Good, the Bad, and the Ugly. *Dose-Response* 4(3):dose-response.0. /pmc/articles/PMC2477686/

Lv G, Shao S, Dong H, Bian X, Yang X, Dong S. 2014. MicroRNA-214 protects cardiac myocytes against H₂O₂-induced injury. *J Cell Biochem* 115(1):93–101.
<http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.24636>

Lv Z, Wei J, You W, Wang R, Shang J, Xiong Y, Yang H, Yang X, Fu Z. 2017. Disruption of the c-Myc/miR-200b-3p/PRDX2 regulatory loop enhances tumor metastasis and chemotherapeutic resistance in colorectal cancer. *J Transl Med* 15(1):257.
<https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-017-1357-7>

Mägdefrau AS, Ludwig K, Weigel C, Köse N, Guerra GM, Dakhovnik A, Kosan C. 2018. DNA-Damage-Induced Hormetic Responses. In: *Sci Hormesis Heal Longev Elsevier*; p. 149–159. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128142530000139>

Makino N, Mochizuki Y, Bannai S, Sugita Y. 1994. Kinetic Studies on the Removal of Extracellular Hydrogen Peroxide by Cultured Fibroblasts. *J Biol Chem*. 269(2):1020–1025.

- Marengo B, Nitti M, Furfaro AL, Colla R, Ciucis C De, Marinari UM, Pronzato MA, Traverso N, Domenicotti C. 2016. Redox homeostasis and cellular antioxidant systems: Crucial players in cancer growth and therapy. *Oxid Med Cell Longev*. 2016.
- Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M. 2008. Glutathione peroxidase family – an evolutionary overview. *FEBS J* 275(15):3959–3970. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1742-4658.2008.06542.x>
- Di Mascio P, Bechara E, Medeiros M, Briviba K, Sies H. 1994. Singlet molecular oxygen production in the reaction of peroxynitrite with hydrogen peroxide. *FEBS Lett* 355(3):287–289. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7988691/>
- Maslennikova DA, Khokhlova A V, Researcher J, Zazhoma DA, Beloborodov EA, Saenko V V. 2017. The Influence of microRNA on Signaling Pathways Activity in Radiosensitive and Radioresistant Cancer Cell Lines after Radiation Exposure MicroRNA Dynamics and Signaling Pathways Activity in Cancer Cell Lines 9(2). <http://www.pantherdb.org/>
- Matsumoto H, Tomita M, Otsuka K, Hatashita M, Hamada N. 2012. Nitric Oxide is a Key Molecule Serving as a Bridge between Radiation-Induced Bystander and Adaptive Responses. *Curr Mol Pharmacol*. 4(2):126–134.
- Mattson MP, Calabrese EJ. 2010. Hormesis: What it is and why it matters. In: *Hormesis A Revolut Biol Toxicol Med Humana Press Inc.* p. 1–13. <https://jhu.pure.elsevier.com/en/publications/hormesis-what-it-is-and-why-it-matters-4>
- Meister A. 1988. Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem*. 263(33):17205–17208.
- Melo D, Coimbra S, Rocha S, Santos-Silva A. 2023. Inhibition of erythrocyte’s catalase, glutathione peroxidase or peroxiredoxin 2 – Impact on cytosol and membrane. *Arch Biochem Biophys*. 739:109569.
- Meloni M, Marchetti M, Garner K, Littlejohns B, Sala-Newby G, Xenophontos N, Floris I, Suleiman MS, Madeddu P, Caporali A, Emanuelli C. 2013. Local inhibition of microRNA-24 improves reparative angiogenesis and left ventricle remodeling and function in mice with myocardial infarction. *Mol Ther* 21(7):1390–1402. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23774796>
- Meng X, Wu J, Pan C, Wang H, Ying X, Zhou Y, Yu H, Zuo Y, Pan Z, Liu RY, Huang W. 2013. Genetic and Epigenetic Down-regulation of MicroRNA-212 Promotes Colorectal Tumor Metastasis via Dysregulation of MnSOD. *Gastroenterology* 145(2):426-36.e1–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23583431>
- Menon S, Goswami P. 2007. A redox cycle within the cell cycle: ring in the old with the new. *Oncogene* 26(8):1101–1109. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16924237/>
- Mercatelli N, Fittipaldi S, De Paola E, Dimauro I, Paronetto MP, Jackson MJ, Caporossi D. 2017. MiR-23-TrxR1 as a novel molecular axis in skeletal muscle differentiation. *Sci Rep*. 7(1):7219.
- Michaeloudes C, Sukkar MB, Khorasani NM, Bhavsar PK, Chung KF. 2011. TGF- β regulates Nox4, MnSOD and catalase expression, and IL-6 release in airway smooth muscle cells. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 300(2):L295. </pmc/articles/PMC3043811/?report=abstract>
- Morris SM. 2004. Enzymes of arginine metabolism. In: *J Nutr*. Vol. 134. American Institute

- of Nutrition; p. 2743S-2747S. <https://academic.oup.com/jn/article/134/10/2743S/4688468>
- Murrell GAC, Francis MJ 0, Bromley L. 1990. Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem J.* 265(3):659–665.
- Namin SM, Nofallah S, Joshi MS, Kavallieratos K, Tsoukias NM. 2013. Kinetic analysis of DAF-FM activation by NO: Toward calibration of a NO-sensitive fluorescent dye. *Nitric Oxide - Biol Chem* 28:39–46. </pmc/articles/PMC3544979/>
- Nandi A, Yan L-J, Jana CK, Das N. 2019. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2019. </pmc/articles/PMC6885225/?report=abstract>
- Napoli C, Paolisso G, Casamassimi A, Al-Omran M, Barbieri M, Sommese L, Infante T, Ignarro LJ. 2013. Effects of nitric oxide on cell proliferation: Novel insights. *J Am Coll Cardiol.* 62(2):89–95.
- Narayanan PK, Goodwin EH, Lehnert BE. 1997. α particles initiate biological production of superoxide anions and hydrogen peroxide in human cells. *Cancer Res.* 57(18):3963–3971.
- Ng CF, Schafer FQ, Buettner GR, Rodgers VGJ. 2007. The rate of cellular hydrogen peroxide removal shows dependency on GSH: Mathematical insight into in vivo H₂O₂ and GPx concentrations. *Free Radic Res* 41(11):1201. </pmc/articles/PMC2268624/>
- Nisimoto Y, Diebold BA, Constantino-Gomes D, Lambeth JD. 2014. Nox4: A Hydrogen Peroxide-Generating Oxygen Sensor. *Biochemistry* 53(31):5111. </pmc/articles/PMC4131900/>
- Oberbaum M, Cambar J. 1994. Hormesis: Dose-Dependent Reverse Effects of Low and Very Low Doses. In: *Ultra High Dilution* Springer Netherlands; p. 5–18. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-015-8342-8_2
- Ogilby PR. 2010. Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun. *Chem Soc Rev* 39(8):3181–3209. <http://pubs.rsc.org>
- Oltra M, Vidal-Gil L, Maisto R, Oltra SS, Romero FJ, Sancho-Pelluz J, Barcia JM. 2019. miR302a and 122 are deregulated in small extracellular vesicles from ARPE-19 cells cultured with H₂O₂. *Sci Rep* 9:17954. www.nature.com/scientificreports
- Ozumi K, Sudhakar V, Kim HW, Chen G-F, Kohno T, Finney L, Vogt S, McKinney RD, Ushio-Fukai M, Fukui T. 2012. Role of Copper Transport Protein Antioxidant 1 in Angiotensin II-Induced Hypertension. *Hypertension* 60(2):476–486. <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.189571>
- Pall ML. 2008. Post-radiation syndrome as a NO/ONOO- cycle, chronic fatigue syndrome-like disease. *Med Hypotheses* 71(4):537–541. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18667279>
- Panday S, Talreja R, Kavdia M. 2020. The role of glutathione and glutathione peroxidase in regulating cellular level of reactive oxygen and nitrogen species. *Microvasc Res.* 131:104010.
- Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. 2015. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J Clin Biochem.* 30(1):11–26.
- Piskounova E, Agathocleous M, Murphy MM, Hu Z, Huddleston SE, Zhao Z, Leitch AM, Johnson TM, DeBerardinis RJ, Morrison SJ. 2015. Oxidative stress inhibits distant metastasis

by human melanoma cells. *Nature* 527(7577):186–191.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26466563/>

Podralska M, Ciesielska S, Kluiver J, van den Berg A, Dzikiewicz-Krawczyk A, Slezak-Prochazka I. 2020. Non-coding RNAs in cancer radiosensitivity: MicroRNAs and lncRNAs as regulators of radiation-induced signaling pathways. *Cancers (Basel)* 12(6):1–27.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32585857/>

Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM. 1992. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 267(34):24173–24176.

Powis G, Montfort WR. 2001. Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 30:421–55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11441809>

Poynton RA, Hampton MB. 2014. Peroxiredoxins as biomarkers of oxidative stress. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 1840(2):906–912.

Puppo A, Halliwell B. 1988. Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron Is haemoglobin a biological Fenton reagent? *Biochem J.* 249:185–190.

Radi R. 2013. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *J Biol Chem* 288(37):26464–26472. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23861390/>

Radi R, Cassina A, Hodara R, Quijano C, Castro L. 2002. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic Biol Med.* 33(11):1451–64.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12446202>

Raffel J, Bhattacharyya AK, Gallegos A, Cui H, Einspahr JG, Alberts DS, Powis G. 2003. Increased expression of thioredoxin-1 in human colorectal cancer is associated with decreased patient survival. *J Lab Clin Med.* 142(1):46–51.

Ravanat J, Douki T, Cadet J. 2001. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J Photochem Photobiol B* 63(1–3):88–102.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11684456/>

Richter C. 1992. Reactive oxygen and DNA damage in mitochondria. *Mutat Res* 275(3–6):249–255. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1383767/>

Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. 2015. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies | *Nucleic Acids Research* | Oxford Academic. *Nucleic Acid Res* 43(7):e47.
<https://academic.oup.com/nar/article/43/7/e47/2414268>

Robinson K, Janes M, M, Pehar M, Monette J, Ross M, Hagen T, Murphy M, Beckman J. 2006. Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(41):15038–15043. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17015830/>

Robinson KM, Janes MS, Beckman JS. 2008. The selective detection of mitochondrial superoxide by live cell imaging. *Nat Protoc* 3(6):941–947.
<https://www.nature.com/articles/nprot.2008.56>

Rusyn I, Asakura S, Pachkowski B, Bradford BU, Denissenko MF, Peters JM, Holland SM, Reddy JK, Cunningham ML, Swenberg JA. 2004. Expression of Base Excision DNA Repair Genes Is a Sensitive Biomarker for in Vivo Detection of Chemical-induced Chronic Oxidative Stress: Identification of the Molecular Source of Radicals Responsible for DNA Damage by Peroxisome Proliferators. *Cancer Res.* 64(3):1050–1057.

- Rzeszowska-Wolny J, Herok R, Widel M, Hancock R. 2009. X-irradiation and bystander effects induce similar changes of transcript profiles in most functional pathways in human melanoma cells. *DNA Repair (Amst)*. 8(6):732–738.
- Sahu N, Stephan JP, Cruz D Dela, Merchant M, Haley B, Bourgon R, Classon M, Settleman J. 2016. Functional screening implicates miR-371-3p and peroxiredoxin 6 in reversible tolerance to cancer drugs. *Nat Commun* 7:12351. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27484502>
- Sarsour EH, Kumar MG, Chaudhuri L, Kalen AL, Goswami PC. 2009. Redox control of the cell cycle in health and disease. *Antioxidants Redox Signal* 11(12):2985–3011. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19505186>
- Satomi A, Murakami S, Hashimoto T, Ishida K, Matsuki M, Sonoda M. 1995. Significance of superoxide dismutase (SOD) in human colorectal cancer tissue: correlation with malignant intensity. *J Gastroenterol* 30(2):177–182. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7773347/>
- Sayin VI, Ibrahim MX, Larsson E, Nilsson JA, Lindahl P, Bergo MO. 2014. Cancer: Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice. *Sci Transl Med* 6(221). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24477002/>
- Schrader M, Fahimi HD. 2006. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1763(12):1755–1766. www.elsevier.com/locate/bbamcr
- Schröder K, Zhang M, Benkhoff S, Mieth A, Pliquett R, Kosowski J, Kruse C, Luedike P, Michaelis UR, Weissmann N, et al. 2012. Nox4 Is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase. *Circ Res* 110(9):1217–1225. <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.112.267054>
- Schumacher B. 2009. Transcription-blocking DNA damage in aging: A mechanism for hormesis. *BioEssays* 31(12):1347–1356. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19921662/>
- Shelly CL. 2009. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 30(1–2):42–59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2008.05.005>
- Shen W, Lu Y, Hu J, Le H, Yu Wei, Xu W, Yu Wangfang, Zheng J. 2020. Mechanism of miR-320 in Regulating Biological Characteristics of Ischemic Cerebral Neuron by Mediating Nox2/ROS Pathway. *J Mol Neurosci* 70(3):449–457. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31768944>
- Shintani M, Okazaki A, Masuda T, Kawada M, Ishizuka M, Doki Y, Weinstein IB, Imoto M. 2002. Overexpression of cyclin DI contributes to malignant properties of esophageal tumor cells by increasing VEGF production and decreasing Fas expression. *Anticancer Res*. 22(2A):639–647. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12014632>
- Simone NL, Soule BP, Ly D, Saleh AD, Savage JE, DeGraff W, Cook J, Harris CC, Gius D, Mitchell JB. 2009. Ionizing Radiation-Induced Oxidative Stress Alters miRNA Expression. Blagosklonny M V., editor. *PLoS One* 4(7):e6377. <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0006377>
- Skoko JJ, Attaran S, Neumann CA. 2019. Signals Getting Crossed in the Entanglement of Redox and Phosphorylation Pathways: Phosphorylation of Peroxiredoxin Proteins Sparks Cell Signaling. *Antioxidants* 2019, Vol 8, Page 29 8(2):29. <https://www.mdpi.com/2076-3921/8/2/29/htm>
- Skonieczna M, Hejmo T, Poterala-Hejmo A, Cieslar-Pobuda A, Buldak RJ. 2017. NADPH

Oxidases: Insights into Selected Functions and Mechanisms of Action in Cancer and Stem Cells. *Oxid Med Cell Longev* 2017;9420539. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28626501>

Sluyter R, Halliday G. 2000. Enhanced tumor growth in UV-irradiated skin is associated with an influx of inflammatory cells into the epidermis. *Carcinogenesis* 21(10):1801–1807. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11023536/>

Storey JD, Tibshirani R. 2003. Statistical significance for genomewide studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(16):9440–9445. <https://www.pnas.org/content/100/16/9440>

Sue GR, Ho ZC, Kim K. 2005. Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med*. 38(12):1543–1552.

Sun J, Steenbergen C, Murphy E. 2006. S-nitrosylation: NO-related redox signaling to protect against oxidative stress. *Antioxidants Redox Signal* 8(9–10):1693–1705. </pmc/articles/PMC2443861/?report=abstract>

Szabó C. 1996. The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Shock* 6(2):79–88. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8856840/>

Szumiel I. 2012. Hormeza popromienna: autofagia i inne mechanizmy komórkowe. *PTJ*. 55:2012.

Thannickal VJ, Fanburg BL. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 279(6 23-6).

The Gene Ontology Consortium. 2019. The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic Acids Res* 47:D330–D338. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6323945/>

Thiel H. 1986. Low power laser therapy — an introduction and a review of some biological effects. *J Can Chiropr Assoc* 30(3):133. </pmc/articles/PMC2484304/?report=abstract>

Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS, Flores-Santana W, Switzer CH, Donzelli S, Hussain P, Vecoli C, Paolucci N, Ambs S, et al. 2008. The chemical biology of nitric oxide: Implications in cellular signaling. *Free Radic Biol Med* 45(1):18–31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18439435>

Tian B, Maidana DE, Dib B, Miller JB, Bouzika P, Miller JW, Vavvas DG, Lin H. 2016. miR-17-3p Exacerbates Oxidative Damage in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. Ablonczy Z, editor. *PLoS One* 11(8):e0160887. <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0160887>

Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Valle NR Del, Huang P. 2008. Redox regulation of cell survival. *Antioxidants Redox Signal* 10(8):1343–1374. </pmc/articles/PMC2932530/?report=abstract>

Ubezio P, Civoli F. 1994. Flow cytometric detection of hydrogen peroxide production induced by doxorubicin in cancer cells. *Free Radic Biol Med* 16(4):509–516. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8005536/>

Vasquez-Vivar J, Martasek P, Whitsett J, Joseph J, Kalyanaraman B. 2002. The ratio between tetrahydrobiopterin and oxidized tetrahydrobiopterin analogues controls superoxide release from endothelial nitric oxide synthase: An EPR spin trapping study. *Biochem J*. 362(3):733–

- Villalobo A. 2006. Nitric oxide and cell proliferation. *FEBS J.* 273(11):2329–2344.
- Virág L, Szabó E, Gergely P, Szabó C. 2003. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett* 140–141:113–24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12676457>
- Vo DT, Karanam NK, Ding L, Saha D, Yordy JS, Giri U, Heymach J V., Story MD. 2019. miR-125a-5p Functions as Tumor Suppressor microRNA And Is a Marker of Locoregional Recurrence And Poor prognosis in Head And Neck Cancer. *Neoplasia (United States)*. 21(9):849–862.
- Wang L, Huang H, Fan Y, Kong B, Hu H, Hu K, Guo J, Mei Y, Liu W-L. 2014. Effects of downregulation of microRNA-181a on H₂O₂-induced H9c2 cell apoptosis via the mitochondrial apoptotic pathway. *Oxid Med Cell Longev* 2014:960362. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24683439>
- Wang X, Liu JZ, Hu JX, Wu H, Li YL, Chen HL, Bai H, Hai CX. 2011. ROS-activated p38 MAPK/ERK-Akt cascade plays a central role in palmitic acid-stimulated hepatocyte proliferation. *Free Radic Biol Med* 51(2):539–551. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21620957/>
- Wei AC, Aon MA, O'Rourke B, Winslow RL, Cortassa S. 2011. Mitochondrial energetics, pH regulation, and ion dynamics: A computational-experimental approach. *Biophys J* 100(12):2894–2903. <http://citeseer.ist.psu.edu/1230.html>
- WHO. 2006. Exposure to Artificial UV Radiation and Skin Cancer.
- Wiseman H, Halliwell B. 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 313 (Pt 1(Pt 1):17–29. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8546679/>
- Wu Q, Zheng B, Weng G, Yang H, Ren Y, Weng X, Zhang S, Zhu W. 2019. Downregulated NOX4 underlies a novel inhibitory role of microRNA-137 in prostate cancer. *J Cell Biochem* 120(6):10215–10227. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcb.28306>
- Xiao Y, Yan W, Lu L, Wang Y, Lu W, Cao Y, Cai W. 2015. p38/p53/miR-200a-3p feedback loop promotes oxidative stress-mediated liver cell death. *Cell Cycle* 14(10):1548–1558. </pmc/articles/PMC4615042/?report=abstract>
- Xie J, Hong E, Ding B, Jiang W, Zheng S, Xie Z, Tian D, Chen Y. 2020. Inhibition of NOX4/ROS Suppresses Neuronal and Blood-Brain Barrier Injury by Attenuating Oxidative Stress After Intracerebral Hemorrhage. *Front Cell Neurosci* 14:578060. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2020.578060/full>
- Xu Y, Fang F, Zhang J, Josson S, Clair WHS, Clair DKS. 2010. Mir-17* suppresses tumorigenicity of prostate cancer by inhibiting mitochondrial antioxidant enzymes. *PLoS One* 5(12):e14356. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21203553>
- Xu Y, Zhang J, Fan L, He X. 2018. miR-423-5p suppresses high-glucose-induced podocyte injury by targeting Nox4. *Biochem Biophys Res Commun* 505(2):339–345. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30245133>
- Xu Z, Zhang Y, Ding J, Hu W, Tan C, Wang M, Tang J, Xu Y. 2018. miR-17-3p Downregulates Mitochondrial Antioxidant Enzymes and Enhances the Radiosensitivity of

Prostate Cancer Cells. *Mol Ther - Nucleic Acids*. 13:64–77.

Yan GR, Xu SH, Tan ZL, Liu L, He QY. 2011. Global identification of miR-373-regulated genes in breast cancer by quantitative proteomics. *Proteomics* 11(5):912–920. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21271679>

Yang X, Mao X, Ding X, Guan F, Jia Y, Luo L, Li B, Tan H, Cao C. 2018. MiR-146a down-regulation alleviates H₂O₂-induced cytotoxicity of PC12 cells by regulating MCL1/JAK/STAT pathway. *Cell Biol Toxicol* 34(6):479–489. <http://link.springer.com/10.1007/s10565-018-9424-2>

Yasuda M, Ohzeki Y, Shimizu S, Naito S, Ohtsuru A, Yamamoto T, Kuroiwa Y. 1998. Stimulation of in vitro angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with ets-1 in endothelial cells. *Life Sci*. 64(4):249–258.

Zhang C, Wang H, Liu X, Hu Y, Ding L, Zhang X, Sun Q, Li Y. 2019. Oncogenic microRNA-411 promotes lung carcinogenesis by directly targeting suppressor genes SPRY4 and TXNIP. *Oncogene*. 38(11):1892–1904.

Zhang J, Xing D, Gao X. 2008. Low-power laser irradiation activates Src tyrosine kinase through reactive oxygen species-mediated signaling pathway. *J Cell Physiol* 217(2):518–528. <http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.21529>

Zhang X, Liu X, Li Y, Lai J, Zhang N, Ming J, Ma X, Ji Q, Xing Y. 2017. Downregulation of microRNA-155 ameliorates high glucose-induced endothelial injury by inhibiting NF- κ B activation and promoting HO-1 and NO production. *Biomed Pharmacother*. 88:1227–1234.

Zhang Z, Dai DQ. 2019. MicroRNA-596 acts as a tumor suppressor in gastric cancer and is upregulated by promoter demethylation. *World J Gastroenterol*. 25(10):1224–1237.

Zhao L, Ouyang Y, Bai Y, Gong J, Liao H. 2019. miR-155-5p inhibits the viability of vascular smooth muscle cell via targeting FOS and ZIC3 to promote aneurysm formation. *Eur J Pharmacol* 853:145–152. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299919301918>

Zhouen Z, Side Y, Weizhen L, Wenfeng W, Yizun J, Nianyun L. 1998. Mechanism of Reaction of Nitrogen Dioxide Radical With Hydroxycinnamic Acid Derivatives: A Pulse Radiolysis Study. *Free Rad Res*. 29:13–16.

Zhu G, Zhou L, Liu H, Shan Y, Zhang X. 2018. MicroRNA-224 promotes pancreatic cancer cell proliferation and migration by targeting the TXNIP-mediated HIF1 α pathway. *Cell Physiol Biochem* 48(4):1735–1746. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30078003>

Zhu HJ, Wang DG, Yan J, Xu J. 2015. Up-regulation of microRNA-135a protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by decreasing txnip expression in diabetic mice. *Am J Transl Res*. 7(12):2661–2671.

Zitka O, Skalickova S, Gumulec J, Masarik M, Adam V, Hubalek J, Trnkova L, Kruseova J, Eckschlager T, Kizek R. 2012. Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncol Lett* 4(6):1247. [/pmc/articles/PMC3506742/](http://pmc/articles/PMC3506742/)

Zungu IL, Hawkins Evans D, Abrahamse H. 2009. Mitochondrial responses of normal and injured human skin fibroblasts following low level laser irradiation - An in vitro study. *Photochem Photobiol*. 85(4):987–996.