

lic. Julia Wojtkowicz¹,

lic. Zuzanna Senkowska¹,

mgr inż. Karolina Niewinna²,

prof. dr hab. Urszula Lewandowska²,

dr n. med. Katarzyna Owczarek^{2✉}

¹Student Oddziału Nauk Biomedycznych Wydziału Lekarskiego, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

²Zakład Biochemii, Katedra Biochemii i Chemii, Wydział Lekarski Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

https://doi.org/10.18388/pb.2017_617

✉ autor korespondujący: katarzyna.owczarek@umed.lodz.pl

Słowa kluczowe: LC3, p62, Beclin-1, rak jelita grubego, polifenole

Wykaz skrótów: 3-MA – 3-metyloadenina; BECN1 – gen kodujący Beclin-1; BEZ-235 – daktolizyb; BNIP3 – ang. *Bcl-2 interacting protein 3*; CMA – autofagia zależna od białek opiekuńczych (chaperonów); CRM1 – białko eksportyny-1; DIO – diosmina; RJG – rak jelita grubego; ZDQ-0620 – pochodna 4-aminochinazolinu

STRESZCZENIE

W ostatnich latach coraz większą uwagę w onkologii zwraca się na procesy komórkowe modulujące przebieg nowotworów, w tym na autofagię. Współczesne badania wskazują dwoistą rolę autofagii w patogenezie raka jelita grubego – w początkowej fazie nowotworzenia pełni funkcję protekcyjną, eliminując uszkodzone organele i białka, natomiast w późniejszych stadiach wspiera przeżycie komórek nowotworowych. Regulacja autofagii odbywa się głównie poprzez szlaki PI3K/Akt/mTOR, AMPK/mTOR oraz kompleks Beclin-1/PI3K. Istotne znaczenie diagnostyczne i prognostyczne pełnią także białka autofagiczne, takie jak LC3, p62/SQSTM1 i Beclin-1. Ze względu na wpływ autofagii na skuteczność chemioterapii i terapii celowanych, coraz większe zainteresowanie budzi możliwość jej farmakologicznej modulacji. Szczególnie obiecujące są naturalne związki, takie jak polifenole, które wpływają wielokierunkowo na ten proces. Celem niniejszej pracy jest kompleksowa analiza molekularnych mechanizmów regulujących autofagię oraz jej znaczenia jako potencjalnego celu terapeutycznego w raku jelita grubego.

WSTĘP

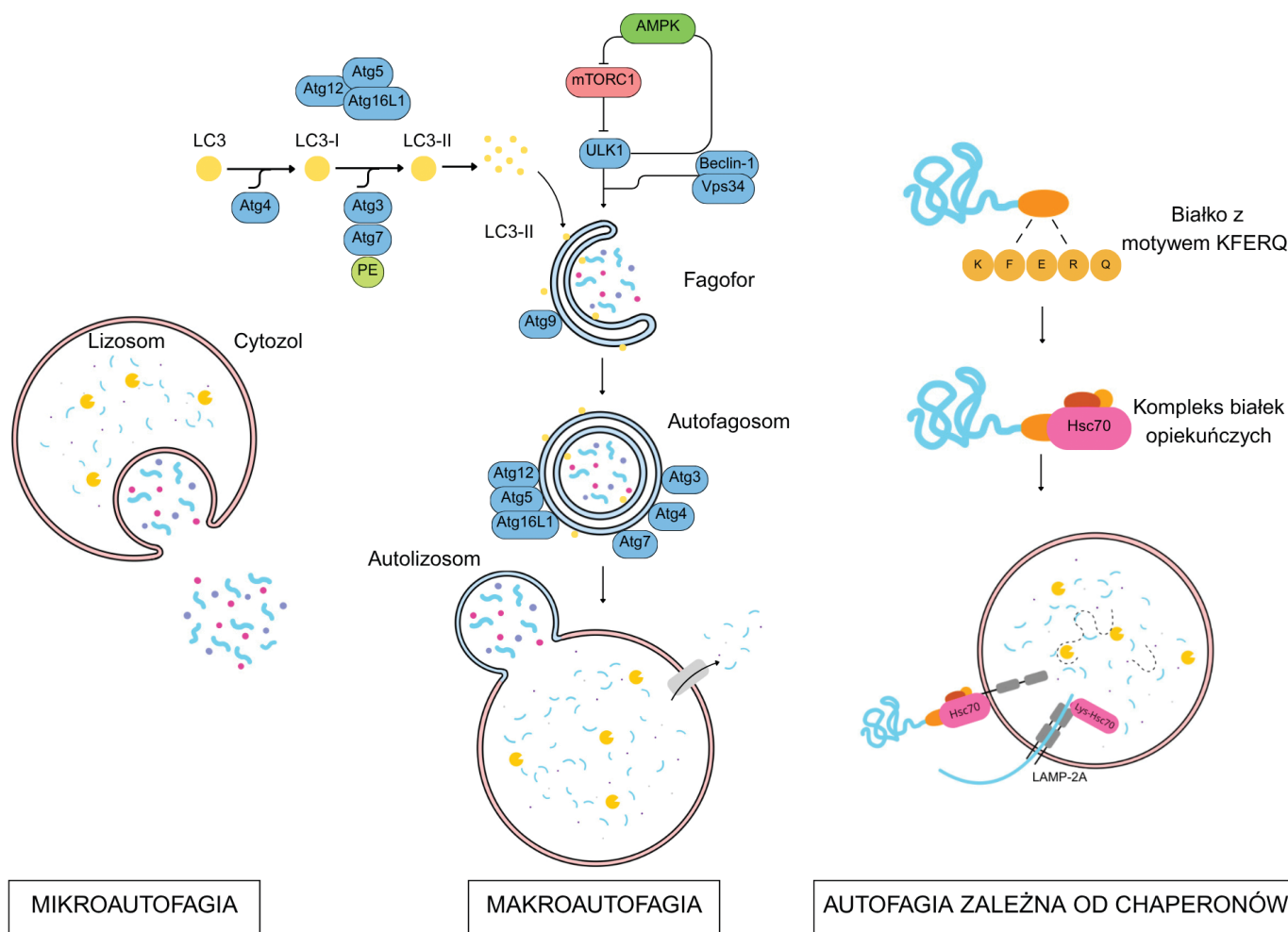
Rak jelita grubego (RJG) to jedno z najpoważniejszych wyzwań współczesnej onkologii. Według bazy danych GLOBOCAN, RJG jest trzecim najczęściej diagnozowanym nowotworem u mężczyzn (10,4% nowo-rozpoznanych przypadków zachorowań) oraz trzecią najczęstszą przyczyną zgonów z powodu nowotworów w tej grupie (śmiertelność 9,2%). Z kolei u kobiet jest także trzecim najczęściej diagnozowanym nowotworem (8,9% nowo-rozpoznanych przypadków zachorowań) oraz trzecią najczęstszą przyczyną zgonów z powodu nowotworów (śmiertelność 9,4%) [1].

RJG jest powszechnie uważany za chorobę cywilizacyjną ze względu na silny związek z czynnikami odnoszącymi się do stylu życia oraz czynnikami środowiskowymi typowymi dla krajów wysoko rozwiniętych [2]. Szczególnie istotne są: otyłość, palenie tytoniu, spożywanie alkoholu oraz wysoko przetworzonej żywności [3]. Czynniki te, tak charakterystyczne dla obecnego społeczeństwa, stanowią istotny problem zdrowia publicznego na skalę globalną. Rosnąca wiedza biomedyczna uwidacznia potrzebę głębszego zrozumienia mechanizmów molekularnych rozwoju RJG, co umożliwi opracowanie skuteczniejszych terapii.

Jednym z procesów wewnątrzkomórkowych wzbudzających coraz większe zainteresowanie naukowców jest autofagia, czyli mechanizm degradacji i recyklingu, który odgrywa istotną rolę w utrzymaniu homeostazy komórek. W kontekście RJG jej znaczenie jest niejednoznaczne. Może zarówno hamować rozwój nowotworu jak i sprzyjać jego progresji, szczególnie w późniejszych stadiach. Jednak dokładne mechanizmy regulujące autofagię w RJG wciąż wymagają wyjaśnienia.

Obecne metody leczenia RJG, pomimo rozwoju, który został w tym zakresie dokonany, są nadal ograniczone, dlatego kluczowe jest poszukiwanie nowych celów terapeutycznych. Pozwoli to na poprawę kompleksowej opieki nad pacjentami.

Na tej podstawie sformułowano następującą hipotezę badawczą: Autofagia w RJG pełni dwoistą rolę – we wczesnych stadiach nowotworu działa protekcyjnie, ograniczając rozwój choroby poprzez eliminację uszkodzonych struktur komórkowych, natomiast w późniejszych etapach wspiera przeżycie komórek nowotworowych, umożliwiając im adaptację do niekorzystnych warunków mikrośrodowiska, co sprzyja progresji i oporności na leczenie. Analiza ta może przyczynić się do opracowania innowacyjnych strategii terapeutycznych.



Rycina 1. Schematyczny przegląd etapów i czynników modulujących mikro-, makro- oraz zależną od chaperonów autofagię. Mikroautofagia polega na bezpośrednim wpuklaniu błony lizosomalnej i przeniesieniu składników cytoplazmatycznych do wnętrza lizosomu. W makroautofagii proces inicjowany jest przez kompleks ULK1 (aktywowany przez AMPK i hamowany przez mTORC1). Dochodzi do formowania fagoforu i dojrzewania autofagosomu z udziałem białek Atg. Następnie autofagosomy łączą się z lizosomami w celu degradacji ich zawartości. W autofagii zależnej od chaperonów selektywne białka z motywem KFERQ są rozpoznawane przez Hsc70 i translokowane do lizosomu przez LAMP-2A, przy udziale lizosomalnego Hsc70 (lys-Hsc70).

ZNACZENIE AUTOFAGII W RJG I JEJ CHARAKTERYSTYKA

W warunkach fizjologicznych, autofagia pełni funkcję supresorową, czyli ochronną. Polega na transporcie makrocząsteczek i organelli z cytoplazmy do lizosomu, gdzie ulegają one degradacji i mogą zostać ponownie wykorzystane. Proces ten dostarcza komórce dodatkowej energii, szczególnie w warunkach stresu oksydacyjnego, infekcji lub niedoboru substancji odżywczych [4]. Autofagia stanowi zatem rodzaj bariery dla progresji nowotworu, zapobiegając akumulacji uszkodzonych organelli i nieprawidłowych białek, co chroni komórki przed inicjacją procesu nowotworowego.

Zależność między autofagią a funkcjonowaniem jelit jest złożona, ponieważ proces ten odgrywa kluczową rolę w różnych aspektach ich fizjologii – wspiera integralność nabłonka, reguluje procesy metaboliczne, kontroluje szlaki zapalne oraz uczestniczy w mechanizmach obronnych organizmu [5].

Autofagia odgrywa również istotną rolę w patogenezie RJG, przy czym jej znaczenie jest dynamiczne i zależne od

stadium choroby. W początkowej fazie kancerogenezy działa supresorowo, przeciwdziałając niestabilności genomowej i transformacji nowotworowej. Natomiast w zaawansowanym stadium nowotworu, autofagia może zostać wykorzystana przez komórki nowotworowe do adaptacji do niekorzystnych warunków mikrośrodowiskowych, takich jak niedotlenienie czy niedobór składników odżywczych. W takich warunkach autofagia sprzyja przetrwaniu komórek nowotworowych, co może prowadzić do przyspieszenia wzrostu guza oraz zwiększonej oporności na leczenie przeciwnowotworowe, w tym chemioterapię [6]. Zmienione komórki inicjują wtedy proces autofagii jako odpowiedź na stres komórkowy bądź zwiększone zapotrzebowanie energetyczne, wynikające z ich intensywnej proliferacji.

W zależności od mechanizmu dostarczania materiału do lizosomu, wyróżnia się trzy główne typy autofagii: mikroautofagię, makroautofagię oraz autofagię zależną od białek opiekuńczych (CMA, ang. *chaperone-mediated autophagy*) (Ryc. 1). Każda z tych form może modulować dynamikę procesów nowotworowych, wpływając na przebieg i progresję choroby [4].

Mikroautofagia odnosi się do bezpośredniego przenoszenia materiału przeznaczonego do degradacji do wnętrza lizosomów za sprawą deformacji błony lizosomalnej (wpuklenie lub pączkowanie), czyli bez udziału autofagosomu [7,8].

Makroautofagia jest najpowszechniejszą formą autofagii [7,8]. Polega na otaczaniu uszkodzonych składników cytoplazmy dwuwarstwową błoną, co prowadzi do powstania *de novo* pęcherzyków cytozolowych zwanych autofagosomami. Struktury te są zdolne do sekwestracji materiału przeznaczonego do degradacji, a następnie łączą się z lizosomami celem degradacji przy udziale hydrolaz lizosomalnych [7,8].

Na początkowym etapie dochodzi do utworzenia fagoforu – struktury inicjującej proces. Jego formowanie jest aktywowane przez kompleks białek inicjujących autofagię, w skład którego wchodzi kinazy ULK1 (ang. *Unc-51-like kinase 1*) i ULK2 (ang. *Unc-51-like kinase 2*), będące homologami kinazy UNC-51 [8]. Istotną rolę odgrywają również białka związane z autofagią (Atg, ang. *autophagy related genes*), w szczególności Atg9 – integralne białko błonowe, odpowiedzialne za transport składników lipidowych niezbędnych do budowy błony autofagosomu. Atg9, przemieszczając się między aparatem Golgiego, późnymi endosomami i innymi strukturami błonowymi, dostarcza fosfolipidy niezbędne do rozwoju autofagosomu [4].

W kolejnym etapie następuje elongacja fagoforu, który przybiera kształt zamkniętego pęcherzyka – autofagosomu – otaczającego fragmenty cytoplazmy lub uszkodzone organella [8]. Proces ten jest wspomagany przez kompleks Atg12-Atg5-Atg16L, który odpowiada za zakrzywienie fagoforu, a także przez kompleks kinazy 3-fosfatydilinozytolu klasy III (PI3K-III), białko Beclin-1, VPS34 – katalityczną podjednostkę PI3K klasy III [7]. W elongacji uczestniczą również inne białka związane z autofagią, takie jak: Atg3, Atg4, Atg7 oraz białko łańcucha lekkiego związanego z mikrotubulami (LC3) należące do rodziny Atg8 [4,7].

Po utworzeniu autofagosomu, dochodzi do modyfikacji białka LC3, które zostaje odcięte od błony przez proteazę Atg4 [9], tworząc formę LC3-I. Następnie LC3-I wiąże się z fosfatydiloetanoloaminą (PE) przy udziale Atg3 i Atg4 oraz kompleksu Atg12-Atg5-Atg16L, tworząc aktywną formę LC3-II [9]. Białko LC3-II uczestniczy w selekcji materiału przeznaczonego do degradacji, łącząc się z białkiem p62/SQSTM1 (ang. *sequestosome 1*), które rozpoznaje agregaty białkowe i kieruje je do rozkładu [4].

Następnie dochodzi do połączenia się autofagosomu z lizosomem tworząc autofagolizosom. Ostatecznie, zawartość autofagolizosomu jest degradowana, a produkty rozkładu transportowane są z powrotem do cytoplazmy w celu ich ponownego wykorzystania przez komórke [8].

Z kolei **CMA** jest specyficznym mechanizmem degradacji, który wykorzystuje białka opiekuńcze (chaperony) do selektywnego rozpoznawania i translokowania określonych białek przez błonę lizosomalną. Proces ten rozpoczyna

się od identyfikacji przez białko szoku cieplnego HSC70 substratów zawierających specyficzną sekwencję pentapeptydową KFERQ [9]. Po rozpoznaniu, kompleks białko-chaperon wiąże się z receptorem błony lizosomalnej (LAMP-2A), co inicjuje translokację białka do wnętrza lizosomu, gdzie ulega ono degradacji enzymatycznej [9,10].

Szybkość i skuteczność CMA jest regulowana przez poziom LAMP-2A w błonie lizosomu. Ponadto, zarówno HSC70, jak i LAMP-2A są zaangażowane w selektywną autofagię, w której chaperony kierują ubikwitynowane organella i kompleksy białkowe do degradacji, nie tylko w ramach CMA, lecz również przez mechanizmy makroautofagii [8].

MOLEKULARNE MECHANIZMY AUTOFAGII W KOMÓRKACH RJG

W komórkach nowotworowych zaburzenia w szlakach sygnalizacyjnych mogą prowadzić do nieprawidłowej regulacji autofagii. Może to sprzyjać wzrostowi i rozprzestrzenianiu się nowotworu.

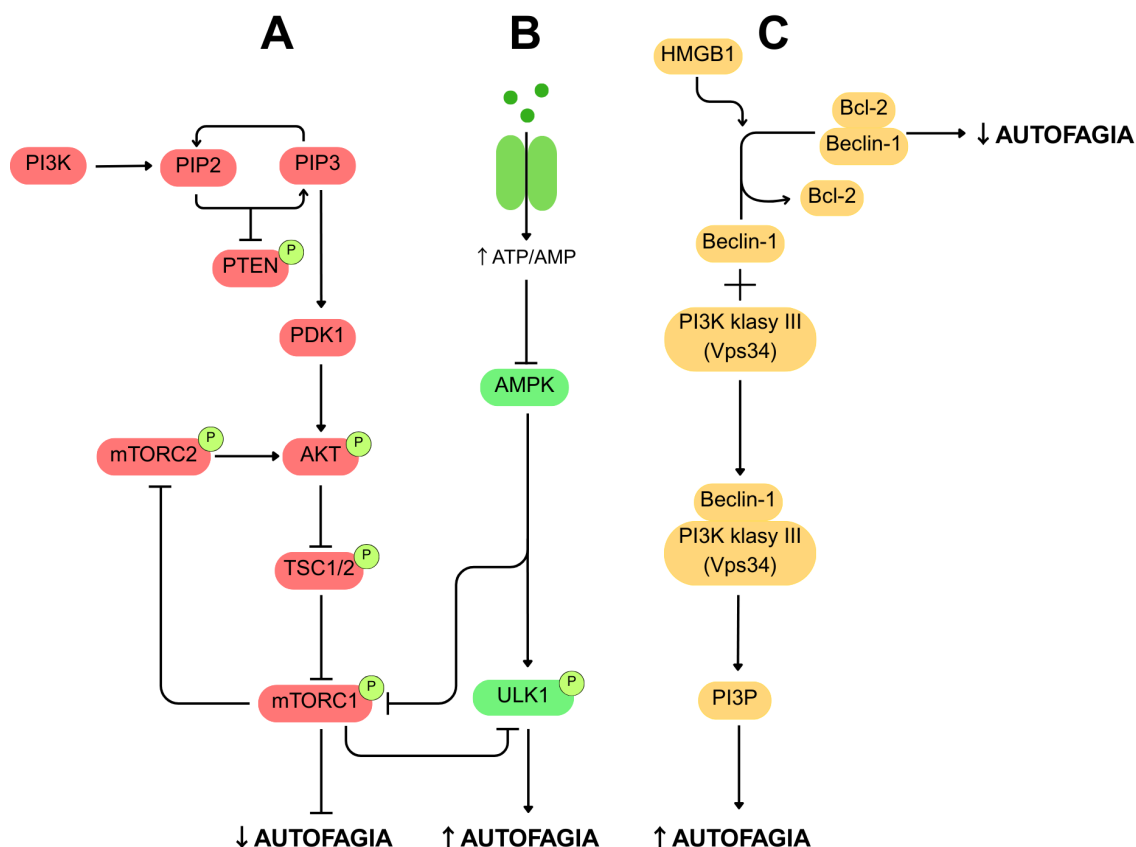
SZLAK PI3K/AKT/MTOR – JAKO GŁÓWNY INHIBITOR AUTOFAGII

Szlak sygnałowy PI3K/Akt/mTOR jest kluczowym regulatorem wzrostu, przeżycia i proliferacji komórek [11]. Jego aktywacja hamuje autofagię, co może prowadzić do niekontrolowanego wzrostu komórek nowotworowych. Niezwykle istotna jest tu funkcja wewnątrzkomórkowego PI3K [12]. Kolejnym regulatorem jest ssaczy cel rapamycyny (mTOR), który tworzy dwa kompleksy: mTORC1 – hamujący autofagię oraz mTORC2, o mniej poznanej funkcji [13].

Aktywacja szlaku PI3K/Akt/mTOR rozpoczyna się od sygnałów z receptorów takich jak: receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (HER2), insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF), receptor epidermalnego czynnika wzrostu (EGFR) oraz receptor czynnika wzrostu fibroblastów (FGFR) [11]. Receptory te nie wiążą bezpośrednio PI3K, ale mogą inicjować ten szlak pośrednio przez fosforylację receptorowych kinaz tyrozynowych (RTK) lub przez sygnalizację za pośrednictwem receptorów sprzężonych z białkiem G (GPCR) [14].

Proces ten może zostać zahamowany przez homolog fosfatazy i tensyny (PTEN) czyli inhibitor PI3K, który usuwając grupy fosforanowe z fosfatydilinozytolotrifosforanu (PIP3) zapobiega dalszej aktywacji szlaku PI3K/Akt/mTOR. Jeśli jednak PTEN utraci swoją funkcję, wówczas PI3K-I ciągle aktywowany zwiększa produkcję PIP3, co prowadzi do aktywacji kinazy Akt przez kinazę białkową zależną od 3-fosfoinozytolu 1 oraz 2 (PDK1 i PDK2). Akt następnie aktywuje szlak mTORC1, który hamuje autofagię przez inaktywację kompleksu ULK1/2 [11,12].

Szlak PI3K/Akt/mTOR jest często nadaktywny w komórkach nowotworowych, co hamuje autofagię i wspiera ich przeżycie (Ryc. 2A). Dlatego naukowcy skupiają się na poszukiwaniu skutecznych inhibitorów PI3K oraz mTOR [14-16] jako potencjalnych strategii terapeutycznych. Przy-



Rycina 2. Najważniejsze szlaki sygnałowe zaangażowane w proces autofagii: PI3K/Akt/mTOR jako inhibitor autofagii (A), AMPK/mTOR jako aktywator autofagii (B) oraz Beclin-1/PI3K-III w inicjacji autofagii (C).

kładem może być wyżej wspomniany *PTEN* – gen, którego mutacje są często obserwowane w nowotworach, prowadząc do nadmiernej aktywacji szlaku PI3K/Akt/mTOR [11]. Innym inhibitorem tego szlaku jest pochodna 4-aminochinazoliny (ZDQ-0620), wykazująca potencjał w hamowaniu proliferacji, migracji oraz inwazji komórek nowotworowych jelita. Dodatkowo związek ten indukuje apoptozę wpływając na zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G0/G1 [17]. Również rapamycyna, inhibitor kinazy mTOR jest intensywnie badana jako możliwa opcja terapeutyczna w leczeniu RJG [14,18].

SZLAK AMPK/MTOR – JAKO AKTYWATOR AUTOFAGII

Szlak AMPK/mTOR reguluje autofagię w sposób przeciwny do PI3K/Akt/mTOR. Podczas gdy aktywacja mTOR hamuje autofagię, kinaza białkowa aktywowana adenozynomonofosforanem (AMPK) działa jako jej aktywator. Zaburzenia w równowadze między aktywnością AMPK a mTOR leżą u podstaw wielu schorzeń, takich jak choroby zapalne jelit, nowotwory, choroby sercowo-naczyniowe, neurodegeneracyjne, otyłość czy cukrzyca [19].

AMPK może aktywować autofagię na dwa sposoby. Bezpośrednio przez fosforylację i aktywację kompleksu ULK1, który inicjuje autofagię. Pośrednio zaś przez hamowanie mTORC1, który w normalnych warunkach blokuje aktywność ULK1 i cały proces autofagii (Ryc. 2B) [20].

W warunkach sytości, przy wysokim poziomie ATP, aktywowany zostaje szlak PI3K/Akt, co prowadzi do aktywacji mTORC1 hamującego autofagię. Dzieje się tak przez fosforylację kinazy ULK1 w pozycji seryny 757, co blokuje jej interakcję z AMPK i uniemożliwia tworzenie fagoforu [21].

W sytuacjach niedoboru energii (niskie stężenie ATP) lub stresu metabolicznego, aktywacja AMPK prowadzi do zahamowania mTORC1 [22]. Jednocześnie AMPK fosforyluje kinazę ULK1 w pozycji seryny 317 i 777, co aktywuje ten kompleks i inicjuje autofagię przez rekrutację białek Atg do miejsca tworzenia fagoforu [21]. Warto dodać, że najnowsze badania sugerują, iż w pewnych warunkach AMPK może nawet wzmacniać działanie hamujące ULK1 przez mTORC1, co wskazuje na złożoną regulację autofagii [20].

Dysregulacja szlaku AMPK/mTOR wynikająca z zaburzeń między procesami katabolicznymi a anabolicznymi może prowadzić do licznych nieprawidłowości molekularnych. W komórkach nowotworowych hiperaktywny mTORC1 upośledza usuwanie uszkodzonych organelli, co skutkuje akumulacją reaktywnych form tlenu (ROS) i uszkodzeń DNA [21]. Z kolei długotrwała aktywacja AMPK, np. w warunkach hipoksji, może wspierać przeżycie komórek nowotworowych poprzez hamowanie mTORC1 [23].

W związku z tym, badania koncentrują się na modulacji kluczowych dla tego szlaku elementów. Obiecującymi przykładami mogą być ewerolimus – inhibitor mTORC1

stosowany w raku piersi i nerek [4], metformina - lek przeciwcukrzycowy, który aktywuje AMPK i pośrednio hamuje mTORC1 indukując autofagię zależną od ULK1 [19,23], czy rapamycyna - bezpośredni inhibitor mTORC1, badany także w kontekście RJG [19].

KOMPLEKS BECLIN-1/PI3K-III - KLUCZ DO INICJACJI AUTOFAGII

Istotnym elementem molekularnej regulacji autofagii jest kompleks Beclin-1/PI3K-III (Ryc. 2C). Kompleks ten odpowiada za transport błonowy oraz formowanie autofagosomu, a więc za bardzo wczesny etap tego procesu [24]. Beclin-1 to białko wielofunkcyjne, którego zarówno nadekspresja jak i niedobór może prowadzić do niekorzystnego rokowania w przypadku RJG [25].

Beclin-1 oddziałuje z różnymi białkami regulatorowymi - m.in. z antyapoptotycznymi Bcl-2 i Bcl-XL, które hamują autofagię przez wiązanie się z domeną BH3 Beclin-1. Natomiast białka proapoptotyczne, mogą zakłócać to wiązanie, prowadząc do uwolnienia Bcl-2 i aktywacji autofagii [24]. Ponadto, dysocjację kompleksu Beclin-1/Bcl-2 może promować białko HMGB1 (ang. *High-Mobility Group Box 1*) poprzez aktywację szlaku ERK/AMPK. Skutkiem tego jest właśnie powstanie kompleksu Beclin-1/PI3K-III i zapoczątkowanie autofagii [26].

Badania przeprowadzone przez Yanga i współpracowników potwierdziły, że w RJG aktywność Beclin-1 jest ściśle związana z interakcją z białkiem Bcl-2. Badacze udowodnili, że związek spiroindolina 6d może osłabiać tę interakcję, uwalniając Beclin-1 i aktywując autofagię w odpowiedzi na stres komórkowy. Dodatkowo, związek ten indukuje apoptozę poprzez aktywację kaspazy-3 [27]. Inne badania wykazały, że zastosowanie antrachinonu w połączeniu z oksaliplatyną (OXA) powoduje zahamowanie szlaku PI3K/Akt/mTOR. Objawia się to obniżeniem ekspresji PI3K, fosforylowanego Akt oraz mTOR, a także wzrostem ekspresji markerów autofagii, takich jak LC3B i Beclin-1, co wskazuje na aktywację procesu autofagii [13].

W zależności od warunków panujących w komórce, Beclin-1 może działać jako przełącznik między autofagią a apoptozą [28]. Po utworzeniu kompleksu z VPS34 - głównym enzymem kompleksu PI3K-III - Beclin-1 inicjuje syntezę fosforanu 3-fosfatydyloinozytolu (PI3P), który rekrutuje białka Atg do miejsca formowania fagoforu, umożliwiając prawidłowy przebieg autofagii [28,29].

Aktywacja kompleksu Beclin-1/PI3K-III jest kontrolowana przez kluczowe szlaki sygnałowe, takie jak mTOR i AMPK. W warunkach odpowiedniej dostępności do składników odżywczych, aktywowany mTOR hamuje autofagię przez fosforylację ULK1, co obniża aktywność Beclin-1. Z kolei w warunkach stresu komórkowego lub niedoboru energii aktywowany AMPK promuje proces autofagii przez zwiększenie poziomu Beclin-1 i aktywację kompleksu Beclin-1/VPS34 [29].

Beclin-1 wpływa również na regulację ferroptozy, czyli formę śmierci komórkowej zależnej od metabolizmu żelaza

i peroksydacji lipidów [29]. Co więcej, wysoki poziom Beclin-1 może zwiększać oporność komórek nowotworowych na chemioterapię, gdyż autofagia działa wówczas jako mechanizm ochronny. Z tego względu modulacja aktywności Beclin-1 stanowi potencjalną strategią terapeutyczną - zarówno w kierunku aktywacji jak i hamowania autofagii, w zależności od kontekstu biologicznego [29].

MARKERY AUTOFAGII I ICH ZNACZENIE DIAGNOSTYCZNE

Monitorowanie i diagnozowanie autofagii wymaga analizy specyficznych markerów białkowych, które odzwierciedlają aktywność szlaków sygnałowych oraz dynamikę tego procesu w komórkach. W kontekście RJG, do najistotniejszych markerów zalicza się: LC3, p62/SQSTM1 oraz Beclin-1. Ich ekspresja i funkcja są ściśle związane z dynamiką procesu autofagii zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych (Ryc. 3).

LC3 - WSKAŹNIK DOJRZEWANIA AUTOFAGOSOMÓW

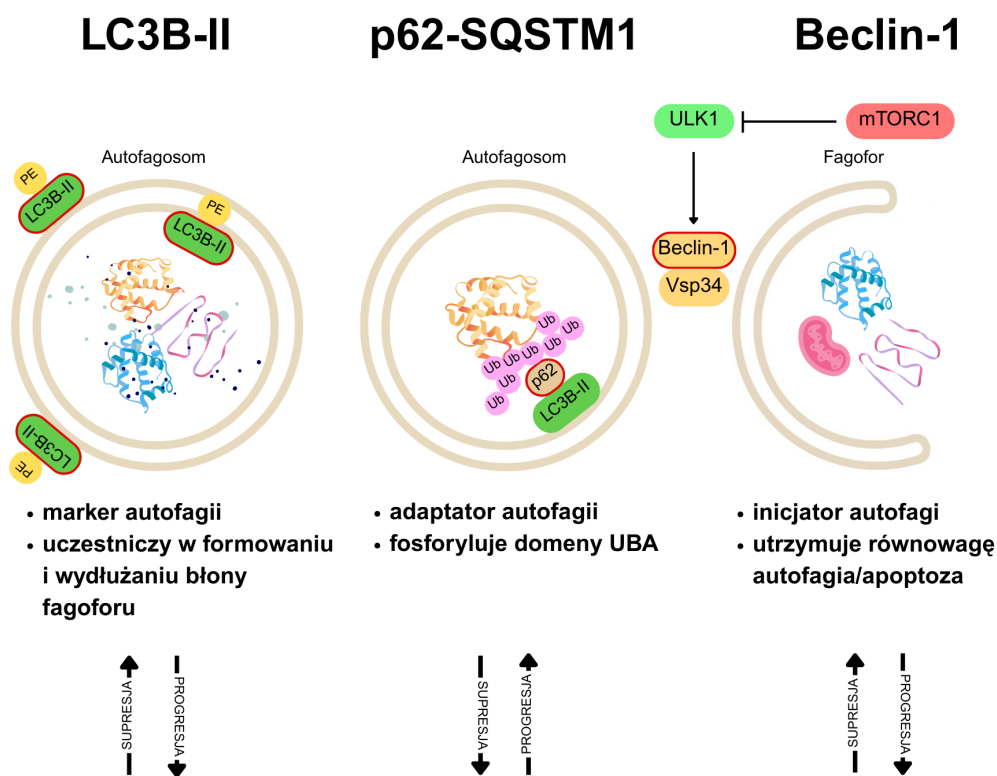
Białko LC3B w szczególności jego forma LC3B-II związana z błoną autofagosomu, stanowi marker dojrzewania autofagosomów i tym samym aktywności autofagii. Konwersja cytoplazmatycznej formy LC3B-I do LC3B-II jest szeroko stosowana jako wskaźnik autofagii [7,8].

W kontekście RJG, nadmierna ekspresja LC3B-II jest obserwowana w bardziej zaawansowanych stadiach choroby w porównaniu do zdrowych komórek jelita [30,31]. Co ważne, niski poziom LC3 koreluje z lepszym rokowaniem, szczególnie u pacjentów, z zaawansowanymi postaciami nowotworu [30]. W badaniach Guo i wsp. zauważono, że nasilenie autofagii związane ze zwiększoną ekspresją LC3B-II może poprawić skuteczność leczenia, np. przez zwiększenie wrażliwości na cetuksymab w komórkach Caco-2 [32]. Metaanaliza 10 badań pacjentów z RJG potwierdziła, że podwyższona ekspresja LC3B jest związana z wyższym stopniem zaawansowania RJG, choć nie wpływa na wielkość guza [33].

P62/SQSTM1 - ADAPTATOR AUTOFAGII I WSKAŹNIK JEJ ZABURZEŃ

Białko p62/SQSTM1 pełni funkcję adaptatora, wiążąc ubikwitynowane substraty i kierując je do autofagosomów. Ekspresja p62/SQSTM1 wykazuje odwrotną zależność względem aktywności autofagii - aktywna autofagia skutkuje degradacją p62/SQSTM1, natomiast jej inhibicja skutkuje akumulacją tego białka [33].

Pomimo, że p62/SQSTM1 nie jest wystarczająco specyficznym markerem autofagii, jego oznaczanie w połączeniu z innymi biomarkerami, takimi jak LC3B czy XBP1 (ang. *X-box binding protein 1*), może stanowić cenne narzędzie diagnostyczne w ocenie aktywności autofagii w RJG [33]. W badaniach klinicznych wykazano zróżnicowaną ekspresję p62/SQSTM1 - w tkankach nowotworowych była o 48,55% niższa w porównaniu z tkankami prawidłowymi, jednak różnica ta nie osiągnęła istotności statystycznej. Brak istotności statystycznej wynikał z ograniczonej liczebności próby oraz dużej zmienności poziomów ekspresji wśród pa-



Rycina 3. Schemat przedstawia omawiane w pracy markery autofagii, ich lokalizację i pełnione funkcje oraz uwzględnia różnice w ich ekspresji.

cientów. Dodatkowo ekspresja p62/SQSTM1 nie wykazała istotnych powiązań z parametrami kliniczno-patologicznymi, takimi jak płeć, lokalizacja, rodzaj guza czy stadium rozwoju choroby [33]. Z kolei w innym badaniu obserwowano wzrost poziomu ekspresji p62/SQSTM1 w komórkach RJG w porównaniu do tkanek prawidłowych [34].

To zróżnicowanie może odzwierciedlać adaptacyjny charakter autofagii w zależności od etapu rozwoju nowotworu, warunków mikrośrodowiska (niedotlenienie, stres oksydacyjny) oraz rodzaju terapii.

Dodatkowo, wzrastająca średnia ekspresja p62/SQSTM1 wraz z postępem choroby może wskazywać na związek między akumulacją tego białka a progresją nowotworu [34]. W komórkach HT-29 zaobserwowano zmniejszoną akumulację p62/SQSTM1, co może sugerować defektywną autofagię, sprzyjającą tworzeniu mikrośrodowiska wspierającego wzrostowi nowotworu [35]. Z kolei inne badania powiązały wzrost ekspresji p62/SQSTM1, z opornością na chemioterapię [36].

Na poziomie molekularnym funkcja p62/SQSTM1 zależy m. in. na fosforylacji domeny UBA (ang. *ubiquitin-associated domain*) przez kinazę ULK1, co zwiększa jego powinowactwo do ubikwitynowanych białek [36,37]. W związku z tym, p62/SQSTM1 jako marker funkcjonalnie związany z autofagią, może stanowić element wspomagający w diagnostyce i ocenie dynamiki autofagii, zwłaszcza gdy analizowany jest równocześnie, w szerszym panelu biomarkerów.

BECLIN-1 – CENTRALNY REGULATOR AUTOFAGII

Beclin-1, kodowana przez gen *BECN1* (*Atg6*), to jedno z najważniejszych białek uczestniczących w inicjacji autofagii. Aktywność Beclin-1 jest regulowana przez liczne mechanizmy sygnalizacyjne. W warunkach niedoboru składników odżywczych, kinazy JNK1 i ERK1/2 fosforylują Beclin-1, powodując rozpad kompleksu Beclin-1/Bcl-2 i zapoczątkowanie autofagii [28]. Przemieszczanie się Beclin-1 między jądrem a cytoplazmą zachodzi z udziałem białka eksportyny-1 (CRM1), co dodatkowo podlega regulacji przez stres komórkowy [38].

Beclin-1 oddziałuje również z innymi białkami modulującymi autofagię, takimi jak: Ambra1, Bif-1, UVRAG oraz HMGB1. Interakcje te wpływają na stabilność kompleksu Beclin-1/VPS34 oraz jego zdolność do aktywacji autofagii [39]. Co istotne, Beclin-1 może pełnić funkcję przełącznika między autofagią a apoptozą, a jej aktywność jest istotnym elementem odpowiedzi komórek nowotworowych na stres oraz leczenie [28,29].

W odniesieniu do RJG, ekspresja Beclin-1 jest najczęściej podwyższona, choć u części pacjentów obserwuje się jej obniżenie. Niska ekspresja tego białka prowadzi do zahamowania ekspresji LC3, zaburzenia autofagii i akumulacji toksycznych produktów, co może promować rozwój nowotworu [40]. Z kolei, nadekspresja Beclin-1 może hamować proliferację komórek nowotworowych przez aktywację autofagii i apoptozy, choć w niektórych przypadkach może również sprzyjać oporności na leczenie [27,29].

Podsumowując, markery takie jak LC3B, p62/SQSTM1 i Beclin-1 odgrywają ważną rolę w monitorowaniu aktywności autofagii i mogą stanowić wartościowe narzędzia diagnostyczne oraz prognostyczne w RJG. Ich ekspresja nie tylko odzwierciedla dynamikę procesów autofagii, ale również potencjalnie wpływa na skuteczność terapii przeciwnowotworowej. Ze względu na złożoną i kontekstowo zależną rolę autofagii w nowotworach, interpretacja markerów wymaga uwzględnienia całościowego obrazu biologicznego, w tym aktywności szlaków PI3K/Akt/mTOR, AMPK/mTOR, a także interakcji z białkami Bcl-2 czy HMGB1. Dalsze badania są niezbędne, aby ustalić, czy modulacja tych markerów może być skutecznie wykorzystana w strategiach terapeutycznych u pacjentów z RJG.

AUTOFAGIA JAKO MECHANIZM ADAPTACYJNY W RJG

W zaawansowanych stadiach RJG autofagia pełni funkcję strategii przystosowawczej umożliwiającej komórkom nowotworowym przetrwanie w ekstremalnych warunkach mikrośrodowiska guza. W warunkach stresu, takich jak niedotlenienie czy niedobór składników odżywczych, proces ten pozwala komórkom nowotworowym utrzymać homeostazę metaboliczną poprzez wewnętrzny recykling organelli i białek niezbędnych do produkcji energii i podtrzymywania podstawowych funkcji życiowych [41,42].

Niedotlenienie tkanek guza wynikające z nadmiernej proliferacji komórek oraz niewydolności unaczynienia, prowadzi do aktywacji mechanizmów adaptacyjnych komórek nowotworowych [43]. W warunkach niskiej dostępności do tlenu aktywowany jest czynnik HIF-1 α (ang. *hypoxia-inducible factor 1 α*), który zwiększa ekspresję genów *BNIP3* (ang. *Bcl-2 interacting protein 3*) oraz *BNIP3L*. Produkty tych genów, przez interakcję z Beclin-1, inicjują autofagię. W efekcie dochodzi do degradacji p62/SQSTM1 oraz wzrostu liczby autofagosomów zawierających LC3A. Wyciszenie HIF-1 α skutkuje spadkiem ekspresji zarówno *BNIP3* i *BNIP3L*, jak i *Atg5* oraz obniżeniem liczby autofagosomów [50]. Dodatkowo, hipoksja hamuje aktywność szlaku mTOR, co także sprzyja stabilizacji HIF-1 α , a jednocześnie aktywuje czynnik transkrypcyjny ATF4 (ang. *activating transcription factor 4*), który promuje ekspresję LC3B i *Atg5* [44].

Autofagia wpływa także na skuteczność terapii onkologicznych. Jej regulacja może warunkować odpowiedź komórek nowotworowych na immuno-, radio- oraz chemioterapię. W przypadku RJG, immunoterapia wykazuje ograniczoną skuteczność, szczególnie widoczną u pacjentów z wysoką niestabilnością mikrosatelitarną [43].

Badania z wykorzystaniem radioterapii pokazują, że zahamowanie autofagii (np. przez chlorochinę blokującą fuzję autofagosomów z lizosomami) zwiększa wrażliwość komórek HCT-116 na promieniowanie oraz nasila apoptozę. Dodatkowo, ekspozycja komórek HT-29 i HCT116 na naświetlanie diodami aktywuje fotoreceptor Opsin 3, czego efektem jest wzrost poziomu LC3 i Beclin-1 oraz inicjacja formowania autofagosomów. [45].

W chemioterapii zaobserwowano, że niektóre leki mogą modulować autofagię, co decyduje o przeżywalności komórek. W jednym z badań wykazano, że abemacyklib (inhibitor kinaz zależnych od cyklin – CDK4/6) oraz celekoksyb (inhibitor COX-2) stosowane osobno bądź łącznie, zwiększają ekspresję genów i białek proautofagicznych (*Atg5*, p62/SQSTM1, LC3, *BECN1*), a jednocześnie obniżają ekspresję antyapoptotycznego białka Bcl-2 oraz aktywują kaspazę-3, prowadząc do śmierci komórek RJG i zahamowania ich migracji [46].

Podobne działanie wykazuje kabozantynib – inhibitor receptorowych kinaz tyrozynowych, takich jak VEGFR2 czy MET (ang. *mesenchymal epithelial transition*). Indukuje on autofagię w liniach komórkowych HCT-116 oraz HT-29 wpływając na zahamowanie szlaku PI3K/Akt/mTOR i wzrost ekspresji markerów autofagii, takich jak *Atg3*, LC3, Beclin-1 [47].

Autofagia może działać także ochronnie na komórki nowotworowe, ograniczając skuteczność terapii. W komórkach HT-29 opornych na cisplatynę dopiero zastosowanie apigeniny – flawonoidu roślinnego – doprowadziło do jednoczesnej indukcji autofagii jak i apoptozy, poprawiając skuteczność terapii [35]. Na tej podstawie badacze uznali, że apigenina może wspomagać leczenie RJG. Co więcej, bakteria *Fusobacterium nucleatum*, obecna w mikrośrodowisku guza, może zwiększać oporność na 5-fluorouracyl (5-FU) aktywując autofagię oraz podwyższając poziom białek antyapoptotycznych, takich jak BIRC3. Badania te przeprowadzono w warunkach *in vitro* na liniach HCT-116 i HT-29 [48].

WPŁYW AUTOFAGII NA SKUTECZNOŚĆ LECZENIA RJG

AUTOFAGIA A CHEMIOTERAPIA

Ograniczone możliwości terapeutyczne, zwłaszcza w zaawansowanych stadiach RJG, a także poważne działania niepożądane związane z chemioterapią sprawiają, że pacjenci, szczególnie ci z niekorzystnym rokowaniem, mają ograniczony dostęp do skutecznych metod leczenia, co przekłada się na zwiększoną śmiertelność [49].

Wykazano, że klasyczne chemioterapeutyki, takie jak 5-FU, OXA oraz irinotekan, mogą aktywować autofagię w komórkach RJG, co paradoksalnie osłabia ich działanie przeciwnowotworowe [50-52]. Ustalono, że autofagia w RJG sprzyja oporności na leczenie przeciwnowotworowe, ale stanowi także potencjalny cel terapeutyczny. Zastosowanie inhibitorów autofagii, takich jak 3-metyloadenina (3-MA) lub chlorochina, prowadzi do zwiększenia skuteczności leczenia [45]. Chemioterapia promuje również apoptozę, aktywując gen supresorowego *TP53* (p53) [53].

Badania wykazały, że kombinacja 5-FU z OXA skutecznie hamuje proliferację komórek HCT-116 i HT-29, indukuje ich apoptozę oraz przyspiesza proces starzenia komórkowego, co czyni ten schemat leczenia wysoce efektywnym [50]. Zwrócono również uwagę, że zahamowanie autofagii, nie równocześnie z chemioterapią, lecz w momencie jej

aktywacji – może znacząco ograniczyć wzrost nowotworu oraz zdolność komórek do klonowania.

Dodatkowo, długotrwała ekspozycja komórek HCT-116, HT-29, SW-480 i SW-620 na OXA prowadziła do zahamowania ich proliferacji w sposób zależny od zastosowanego stężenia leku. W komórkach opornych na OXA, zaobserwowano nadekspresję fosforylowanych form AMPK i mTOR, przy jednoczesnym spadku poziomu LC3B oraz wzroście aktywności enzymów glikolitycznych, takich jak GLUT1, co sprzyjało przeżywalności komórek. Natomiast zahamowanie AMPK aktywowało autofagię poprzez inaktywację szlaku Akt/mTOR, jednocześnie redukując aktywność glikolityczną, co zwiększało wrażliwość komórek na chemioterapię [51].

Kolejnym lekiem stosowanym w RJG jest irinotekan, pochodna kamptotecyny i inhibitor topoizomazy I (Topo 1). Jego mechanizm działania polega na tworzeniu kompleksu Topo I-irinotekan-SN-38-DNA, prowadzącego do odwracalnego przecięcia jednoniciowego DNA (ssDNA). Jeśli taki kompleks powstanie w miejscu widełek replikacyjnych, dochodzi do nieodwracalnego zatrzymania replikacji, co skutkuje śmiercią komórki nowotworowej [52].

Podsumowując, badania sugerują, że precyzyjne i kontrolowane hamowanie wczesnych etapów autofagii, może znacząco ograniczyć proliferację komórek nowotworowych przyczyniając się do zwiększenia skuteczności leczenia RJG [50].

AUTOFAGIA A TERAPIE CELOWANE

Procesy autofagiczne w komórkach RJG wpływają również na skuteczność terapii celowanych. Liczne badania wykazały, że receptor naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) oraz receptor dla naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) stanowią istotne cele terapeutyczne w pacjentów z RJG [54-56]. Oba te szlaki sygnałowe odgrywają kluczową rolę w progresji nowotworu poprzez regulację proliferacji komórkowej, angiogenezy oraz tworzenia przerzutów [57-59].

Szlak sygnałowy EGFR może modulować autofagię w komórkach RJG na dwa przeciwstawne sposoby. Z jednej strony, aktywacja szlaku PI3K/Akt (jako część kaskady sygnałowej EGFR) tłumi autofagię poprzez aktywację mTOR, czyli głównego inhibitora wspomnianego procesu. Z drugiej strony szlak RAS, również indukowany przez EGFR, może promować autofagię, co sprzyja rozwojowi oporności na terapie przeciwnowotworowe [57-58]. Jednym z mechanizmów oporności nowotworów z mutacją EGFR na inhibitory kinazy tyrozynowej (EGFR-TKI) jest fosforylacja Beclin-1 przez EGFR, co prowadzi do jego homodimeryzacji i zahamowania autofagii [57].

Stosowanie cetuksymabu – przeciwciała skierowanego przeciw EGFR – poprawia przeżywalność pacjentów zarówno jako monoterapia, jak i w połączeniu z chemioterapią. Szczególnie skuteczne okazało się skojarzenie cetuksymabu z irinotekaniem, które podwaja wskaźnik odpowiedzi na leczenie. Niestety skuteczność terapii z zastosowaniem

cetuksymabu ogranicza się do pacjentów z prawidłowym (dzikim) genem *RAS*; obecność mutacji *KRAS* wiąże się z opornością na inhibitory EGFR [59,60].

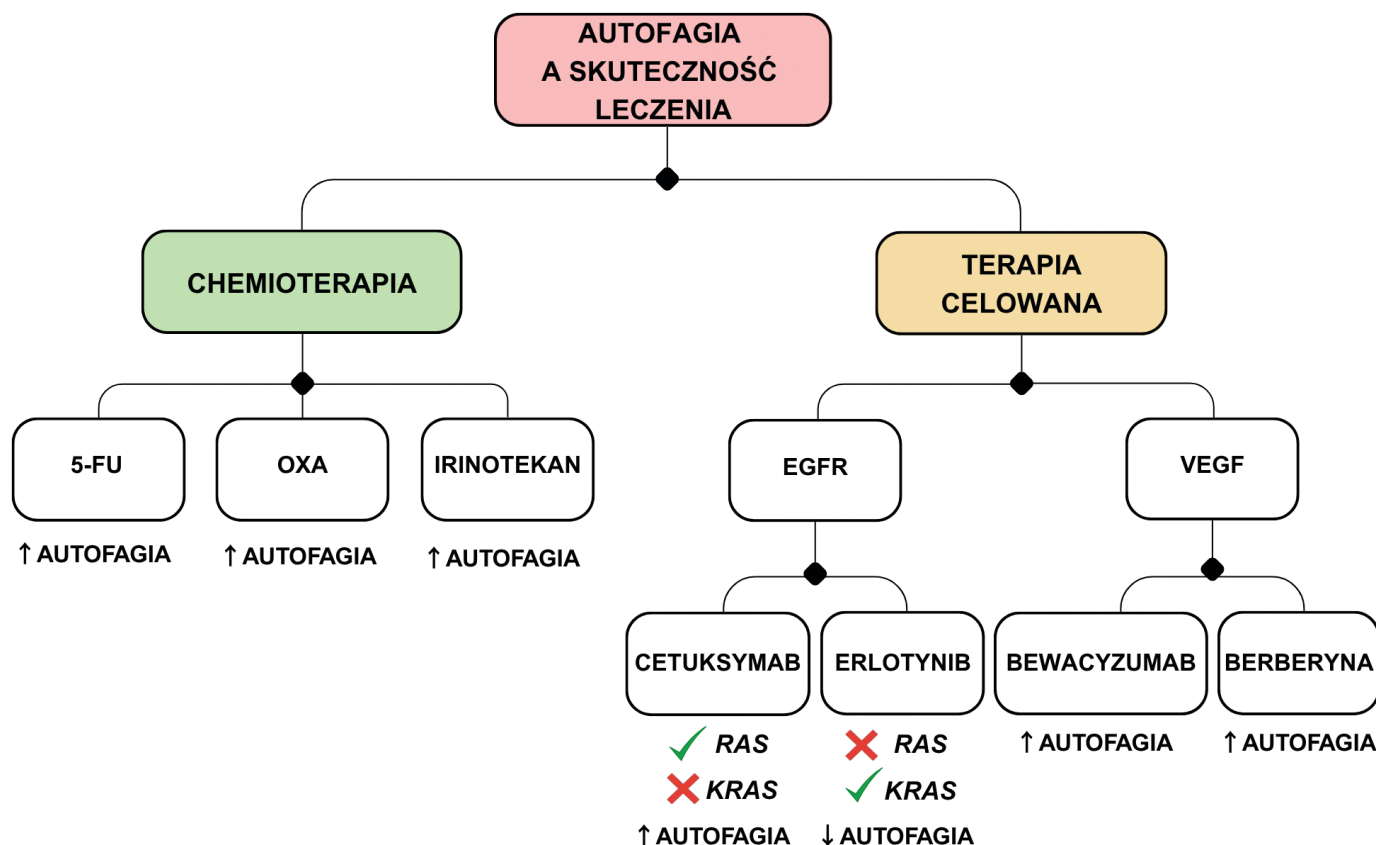
W innym badaniu wykazano, że leczenie erlotynibem (EGFR-TKI) znacząco obniża ekspresję kluczowych białek autofagii w komórkach z mutacją *KRAS* w porównaniu do komórek z dzikim typem *KRAS* (*KRAS*^{wt}) [54]. Ekspresja takich białek jak Atg5, Beclin-1, LC3A i ULK1 była znacznie niższa w komórkach *KRAS*^{mut} niż w *KRAS*^{wt} po leczeniu erlotynibem. Dodatkowo, analiza danych klinicznych wykazała dodatnią korelację między ekspresją genu *KRAS*, a genami związanymi z autofagią (m.in. *MAP1LC3B*, *ATG5*, *ATG10*, *ATG13* i *Atg14*), co sugeruje, że supresja autofagii przez erlotynib może mieć istotny wpływ na odpowiedź terapeutyczną w RJG.

Nadekspresja EGFR w komórkach RJG również sprzyja aktywacji autofagii, co może prowadzić do oporności na 5-FU. W komórkach HT-29 opornych na 5-FU, zaobserwowano spadek syntezy białka p62/SQSTM1 oraz wzrost stosunku LC3-II/LC3-I w porównaniu do komórek wrażliwych na 5-FU. Wyciszenie EGFR odwróciło te zmiany, co potwierdza, że EGFR indukuje autofagię i tym samym oporność na chemioterapię [61].

Szczególnie interesującym aspektem w terapii RJG jest łączenie inhibitorów autofagii i apoptozy w terapii celowanej. W komórkach HT-29 wykazano, że bewacyzumab (inhibitor VEGF) hamuje ich żywotność (IC₅₀=22,5 mg/mL) i stymuluje autofagię, co potwierdzono wzrostem ekspresji LC3-II oraz Beclin-1 [62]. Dodatkowo zauważono, że bewacyzumab w połączeniu z chlorochiną znacząco hamował wzrost guza u myszy, a autofagia została skutecznie zablokowana, co zwiększyło apoptozę indukowaną przez bewacyzumab.

Z kolei, berberyna podawana w postaci liponiosomów (LipoNio.BR) wykazała korzystne działanie przeciwnowotworowe w szczurzym modelu RJG indukowanym dimetylohydrazyną [55]. Leczenie LipoNio.BR powodowało znaczące obniżenie ekspresji VEGF, co wskazuje na skuteczne hamowanie procesów angiogenezy. Równocześnie odnotowano zwiększoną syntezę białek autofagii (Atg5 oraz LC3) oraz spadek poziomu mTOR. Terapia LipoNio.BR wpływała również na wzrost ekspresji genów związanych z apoptozą, takich jak kaspaza-3, p53 i Bax, przy jednoczesnym obniżeniu poziomu Bcl-2. Ta modulacja wskazuje na synergistyczny efekt działania: tłumienie angiogenezy i stymulację autofagii.

Dalsze badania z zastosowaniem daktolizybu (BEZ-235), inhibitora szlaku PI3K/Akt/mTOR oraz diosminy (DIO) na komórkach HCT-116, potwierdziły skuteczność tej terapii skojarzonej [56]. Leczenie za pomocą BEZ-235 lub DIO osobno prowadziło do obniżenia poziomu fosforylowanego Akt (p-Akt) odpowiednio o 37% i 34%, natomiast połączenie tych dwóch związków w terapii skojarzonej powodowało jeszcze efektywniejsze zahamowanie p-Akt na poziomie 62–65%. Tak silna inhibicja aktywności Akt skutkowała indukacją apoptozy, co potwierdzone zostało wzrostem aktywności kaspazy-3. Równocześnie zaobserwowano spadek ekspresji VEGF. W zakresie autofagii wykazano, że BEZ-235



Rycina 4. Rola autofagii w oporności na chemioterapię i terapię celowaną z uwzględnieniem wrażliwości komórek.

obniża poziom LC3B i LC3-II, natomiast DIO powoduje ich wzrost, co wskazuje na złożoność terapii zależnie od zastosowanego schematu leczenia.

Wpływ autofagii na skuteczność chemioterapii i terapii celowanej z uwzględnieniem wrażliwości komórek podsumowuje rycina 4.

POTENCJALNE ZASTOSOWANIE POLIFENOLI JAKO UZUPEŁNIENIE TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

Obiecujący potencjał w regulacji autofagii w RJG wykazują również naturalne związki, w tym polifenole roślinne. Dowody epidemiologiczne, przedkliniczne i kliniczne wskazują, że polifenole mogą wywierać cytotoksyczny wpływ na komórki RJG oraz zwiększać ich wrażliwość na chemo- i radioterapię [63,64].

Prozdrowotne właściwości polifenoli wynikają głównie z ich działania przeciwutleniającego, przeciwzapalnego i przeciwnowotworowego. Coraz więcej badań podkreśla możliwość wpływu polifenoli na regulację autofagii poprzez modulację kluczowych szlaków sygnałowych, takich jak PI3K/Akt/mTOR oraz DAPK (ang. *Death-Associated Protein Kinases*) [65-67].

Jednym z najlepiej przebadanych polifenoli jest galusan epigallokatechiny (EGCG), którego wzrastające stężenie powoduje wzrost ekspresji białek autofagii, takich jak: LC3B-II, Beclin-1 oraz Atg5 w różnych typach nowotworów, w tym w raku piersi, chłoniaku, raku jamy ustnej, czy glejaku

wielopostaciowym [63,64,68,69]. Z kolei kurkumina indukuje powstawanie autofagosomów przez konwersję LC3-I do LC3-II oraz może indukować apoptozę, m.in. wpływając na zahamowanie ekspresji antyapoptotycznego białka Bcl-2 [70].

Procyjanidyna B2, flawonoid wyizolowany z pestek winogron, wykazuje działanie autofagiczne w komórkach RJG linii LoVo, poprzez zależną od wzrastającego stężenia tego związku indukcję ekspresji Beclin-1, LC3-II i Atg5 [71]. Co istotne, zastosowanie inhibitora 3-MA osłabiło ten efekt, co sugeruje, że autofagia może wzmacniać apoptozę. Procyjanidyna B2 aktywuje również szlak PI3K/Akt, prowadząc do programowanej śmierci komórki. Podobny mechanizm działania wykazano dla oridoniny, stosowanej w komórkach linii DLD-1 [72].

Apigenina, kolejny polifenol o udokumentowanych właściwościach przeciwnowotworowych, hamuje szlak PI3K/Akt/mTOR, czego rezultatem jest aktywacja autofagii i apoptozy w komórkach HT-29 opornych na cisplatynę. Efektem działania tego flawonoidu jest wzrost ekspresji Beclin-1 i LC3-II przy jednoczesnym obniżeniu poziomu p62/SQSTM1 [35].

Resweratrol również wykazuje silne działanie proautofagiczne i proapoptotyczne w komórkach RJG [73]. Zwiększa ekspresję Beclin-1 i LC3-II, jednocześnie aktywując syntezę białka Bax oraz hamując Bcl-2. Interesujące jest to, że zastosowanie inhibitora 3-MA odwracało efekt apoptotyczny

Tabela 1. Wybrane związki bioaktywne wpływające na szlaki autofagii *in vitro*.

Czynnik/związek	Linia komórkowa	Mechanizm działania	Inne efekty	Ref.
Antrachinon z oksaliplatyną (OXA) (10–160 µg/mL)	HCT116	PI3K/Akt/mTOR ↓ LC3B ↑ Beclin-1 ↑		13
Pochodna 4-aminochinalozyny (ZDQ-0620) (0.125–4 µM)	HCT116 SW-480 MCF-7 MDA-MB-231	PI3K/Akt/mTOR ↓	Prolifерacja ↓ Migracja i inwazyjność ↓ Bcl-2 ↓ BAX ↑ Kaspaza-3 ↑ Kaspaza-9 ↑ G ₀ /G ₁ ↓	17
Kwas oleanolowy (10–200 µM)	SW-480 HCT116 (komórki hodowane w warunkach hipoksji)	AMPK ↑ mTOR ↓ Beclin-1 ↑ LC3B-II ↑ p-ULK1 ↑	Kaspaza-3 ↑ Kaspaza-8 ↑ Kaspaza-9 ↑ Bcl-2 ↓ BAX ↑	23
Związek spiroindoliny (5–15 µM)	HCT116 HT29 SW-480	Beclin-1/Bcl-2 ↓ LC3B-II ↑ LC3 ↑ Rozszczepienie HDAC6 → blokowanie przepływu autofagii	Bcl-2 ↓ BAX ↑ Kaspaza-3 ↑ Prolifерacja ↓ Uwalnianie cytochromu c PARP ↑ (poli(ADP-ryboza) polimeraza 1)	27
Cetuksymab (50–200 µg/mL)	Caco-2	LC3 ↑ p62/SQSTM1 ↓	4E-BP1 ↑ Prolifерacja ↓	32
Apigenina (15–60 M)	HT-29 (komórki odporne na cisplatynę)	Beclin-1 ↑ LC3-II ↑ p62/SQSTM1 ↓ PI3K/Akt/mTOR ↓	BAX ↑ Bcl-2 ↓ Prolifерacja ↓ Zmiany morfologiczne komórek (kondensacja jądra komórkowego, obkurczenie błony komórkowej)	35
EGCG i GTE (ekstrakt z zielonej herbaty) (0.1–10000 µM)	GBM15 GBM16 GBM17 A172	LC3B-II ↑	Kaspaza-3 ↑ ROS ↑ Prolifерacja ↓	69
Procyjanidyny B2 z pestek winogron (25–200 µM)	HT29 LoVo	PI3K/Akt/mTOR ↓ LC3-II ↑ Atg5 ↑ Beclin-1 ↑	Prolifерacja ↓ Kaspaza-3 ↑ Bcl-2 ↓ BAX ↑	71
Oridonina (10–20 M)	DLD-1	AMPK ↑ mTOR ↑ ULK1 ↓ Beclin-1 ↑ LC3B-II ↑ p62/SQSTM1 ↓	Kaspaza-3 ↑ PARP ↑ Prolifерacja ↓	72
Resweratrol (25–200 M)	SW-480 LoVo	SIRT1 ↑ FOXQ1 ↓ Beclin-1 ↑ LC3-II ↑ p62/SQSTM1 ↓	Bcl-2 ↓ BAX ↑ Prolifерacja ↓ Klonogenność ↓	73
Skórka orzeszków ziemnych (frakcje octanu etylu – AHE i frakcja metanolowa – AHE-2) (10–80 µg/mL)	HCT15 SW-480 A375 B16F10 CCD966SK	LC3B-II ↑	p53 ↑ Kaspaza 3 ↑ Kaspaza 9 ↑ PARP-1 ↑ Cytotoksyczność ↑ Prolifерacja ↓ Migracja ↓ Selektywność wobec komórek RJG ↑	74
Mały interferujący RNA (siRNA)	SW-620 HCT116	Beclin-1 mRNA ↓ Beclin-1 białko ↓	Apoptoza ↑ Prolifерacja ↓	75

Legenda: ↑ aktywacja; ↓ inhibicja

wywołany przez resweratrol, wskazując na ścisłą zależność między aktywacją autofagii, a indukcją śmierci komórki.

Dodatkową zaletą niektórych polifenoli może być ich potencjalny ochronny wpływ na komórki prawidłowe nabłonka jelita. Na przykład ekstrakty ze skórek orzeszków ziemnych wykazują zdolność hamowania proliferacji komórek nowotworowych w RJG, przy jednoczesnym braku toksyczności wobec zdrowych fibroblastów [74]. W badaniach *in vitro* ekstrakty te były cytotoksyczne wobec komórek SW-480 i HCT-15, a ponadto ograniczały ich migrację, co może świadczyć o potencjalnym działaniu przeciwrzutowym.

Przykłady związków wpływających na szlaki autofagii omówione w niniejszej pracy zostały zebrane w tabeli 1.

ZNACZENIE NIEKODUJĄCYCH RNA W MODULACJI AUTOFAGII

Niekodujące RNA (ncRNA) to zróżnicowana klasa transkryptów RNA, które nie ulegają translacji do białek, lecz pełnią liczne funkcje w komórkach [76].

Ze względu na długość oraz pełnione funkcje biologiczne, ncRNA można podzielić na dwie zasadnicze grupy. Pierwszą tworzą cząsteczki pełniące podstawowe funkcje komórkowe, takie jak rybosomalne RNA (rRNA), transportujące RNA (tRNA), małe jądrowe RNA (snRNA) i małe jąderkowe RNA (snoRNA). Drugą grupę stanowią ncRNA o charakterze regulatorowym. Wśród nich wyróżnia się małe niekodujące RNA (ang. *small ncRNA*, <200 nukleotydów), do których należą m. in. mikroRNA (miRNA) oraz długie niekodujące RNA (lncRNA), których długość przekracza 200 nukleotydów [77]. Szczególnym przypadkiem ncRNA jest kolistne RNA (circRNA), wyjątkowo stabilne, o długości najczęściej 100–4000 nukleotydów, pozbawione wolnych końców 5' i 3', co chroni je przed degradacją i stanowi ich główną cechę charakterystyczną. circRNA często działają jako „gąbki” dla miRNA regulując w ten sposób ekspresję genów na poziomie posttranskrypcyjnym [78].

Zdolność niektórych ncRNA do regulacji wielu zaburzonych szlaków sygnałowych w RJG sprawia, że są one obiecującymi kandydatami terapeutycznymi.

Wśród licznych regulatorów szlaków molekularnych zaangażowanych w rozwój RJG, szczególne znaczenie przypisuje się lncRNA oraz miRNA modulujących proces autofagii na różnych etapach. Przykładem jest RAMS11 (ang. *RNA associated with metastasis-11*), które oprócz wpływu na proliferację, migrację i przejście nabłonkowo-mezenchymalne (EMT), indukuje również autofagię i apoptozę poprzez regulację kluczowych białek sygnalizacyjnych, takich jak AMPK, AKT i mTOR, co przekłada się na autofagię zależną od mTOR oraz progresję nowotworu [79].

Analizy danych z bazy TCGA (ang. *The Cancer Genome Atlas*) pozwoliły wyodrębnić panele lncRNA związane z autofagią – takie jak LINC00909, MIR210HG czy LINC01063 – które wykazują istotne znaczenie prognostyczne i mogą wspomagać klasyczne systemy oceny ryzyka. Modele predykcyjne oparte na poziomie ich ekspresji cechują się wyso-

ką skutecznością w prognozowaniu rokowania pacjentów z RJG [80]. Wśród tych cząsteczek szczególnie wyróżnia się EGOT (ang. *eosinophil granule ontogeny transcript*), którego ekspresja jest znacząco podwyższona w tkankach RJG. Wysoki poziom EGOT koreluje z krótszym pięcioletnim przeżyciem, a jego nadekspresja prowadzi do zahamowania autofagii (spadek ekspresji Beclin-1, LC3B, wzrost p62/SQSTM1), wzrostu proliferacji i inwazyjności komórek nowotworowych oraz zmniejszenia apoptozy (obniżenie BAX, wzrost Bcl-2). W modelu *in vivo* wyciszenie EGOT skutkuje istotnym zahamowaniem wzrostu guza, co wskazuje na potencjał terapeutyczny tej cząsteczki [81]. Podobne właściwości wykazuje NEAT1 (ang. *nuclear paraspeckle assembly transcript 1*), lncRNA o udokumentowanym działaniu onkogenym. Badania na modelach ludzkich oraz mysich wykazały, że NEAT1 działa jako „gąbka” dla miR-138, modulując ekspresję transportera glutaminy SLC38A1. Wyciszenie NEAT1 skutkuje zahamowaniem proliferacji i inwazji komórek nowotworowych, jednocześnie aktywując autofagię, i spowalniając wzrost guza *in vivo* [82].

Coraz więcej dowodów wskazuje na kluczową rolę miRNA w regulacji autofagii w RJG. Na przykład miR-449a – którego poziom w surowicy i tkankach nowotworowych jest obniżony, koreluje ze zwiększoną proliferacją i migracją komórek [83]. Funkcjonalnie miR-449a kontroluje autofagię poprzez regulację ekspresji białek takich jak Beclin-1 oraz p62/SQSTM1. Podobnie, miR-142-3p w warunkach *in vitro* hamuje ekspresję TP53INP2 (ang. *tumor protein p53 inducible nuclear protein 2*), co prowadzi do ograniczenia aktywności autofagicznej (spadek LC3B-II), wzrostu proliferacji i zahamowania apoptozy [84]. Z kolei miR-1276, którego ekspresję potwierdzono zarówno u pacjentów, jak i w modelach komórkowych, reguluje poziom LC3B-II oraz p62/SQSTM1, wpływając na aktywację szlaków autofagii a także apoptozy [85]. Interesującym mechanizmem jest też interakcja pomiędzy lncRNA KCNQ10T1 a miR-34a. KCNQ10T1 działa jak „gąbka” dla miR-34a, co prowadzi do deregulacji ATG4B, nasilając autofagię i wspierając oporność komórek na OXA [86].

Na uwagę zasługują również circRNA, które dzięki swojej zamkniętej strukturze wykazują większą stabilność niż cząsteczki liniowe [77]. Przykładowo circUBAP2 (ang. *circular RNA ubiquitin-associated protein 2*) promuje rozwój RJG poprzez aktywację pro-przeżyciową autofagii – obniża poziom miR-582-5p prowadząc do nadekspresji FOXO1 i uruchomienia szlaków autofagicznych sprzyjających progresji guza [87]. Z kolei circCUL2 wykazuje działanie przeciwnowotworowe – jego nadekspresja prowadzi do zahamowania wzrostu i inwazji komórek nowotworowych poprzez modulację szlaku miR-208a-3p/PPP6C. Efektem tej regulacji jest zwiększona ekspresja markera autofagii LC3B-II przy jednoczesnym spadku poziomu p62/SQSTM1, co wskazuje na aktywację procesu autofagii. Równocześnie obserwuje się nasilony sygnał proapoptotyczny – objawiający się wzrostem ekspresji BAX oraz spadkiem Bcl-2, co sugeruje współistniejącą aktywację apoptozy [88].

Wszystkie te dane wskazują, że niekodujące RNA, takie jak lncRNA, miRNA czy circRNA, odgrywają kluczową rolę w regulacji autofagii oraz innych procesów istotnych dla

Tabela 2. Wybrane ncRNA i ich wpływ na modulację autofagii.

ncRNA lncRNA	Model	Wpływ na autofagię	Inne efekty	Ref.
RAMS11	<i>In vitro</i>	LC3B ↑ p62/SQSTM1 ↓ Beclin-1 ↑ AMPK ↑ AKT ↓ mTOR ↓	Proliferacja ↑ Migracja ↑ EMT ↑ Bcl-2 ↓ Bcl-XL ↓	79
EGOT	Pacjenci <i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	LC3B ↓ Beclin1 ↓ p62/SQSTM1 ↑	Proliferacja ↑ Inwazja ↑ BAX ↓ Bcl-2 ↑	81
NEAT1	Pacjenci <i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	LC3B-II ↑ p62/SQSTM1 ↓	Proliferacja ↓ Inwazja ↓ Apoptoza ↑ (po knockdown)	82
miRNA				
miR-449a	Pacjenci <i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	Beclin1 ↓ p62/SQSTM1 ↑	Proliferacja ↓ Klonogenność ↓ Migracja ↓ Inwazja ↓	83
miR-142-3p	<i>In vitro</i>	TP53INP2 ↓ LC3B-II ↓	Proliferacja ↑ Apoptoza ↓	84
miR-1276	Pacjenci <i>In vitro</i>	LC3B-II ↑ p62/SQSTM1 ↓	Apoptoza ↓	85
KCNQ10T1	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	ATG4B ↑ (poprzez miR-34a sponging)	Oporność na OXA Proliferacja ↑	86
circRNA				
circUBAP2	<i>In vitro</i>	miR-582-5p ↓ LC3B-II ↑ Beclin-1 ↑ FOXO ↑	Migracja ↑ Inwazja ↑	87
circCUL2	<i>In vitro</i>	LC3B-II ↑ p62/SQSTM1 ↓	BAX ↑ Bcl-2 ↓	88

Legenda: ↑ aktywacja; ↓ inhibicja

progresji RJG. Co istotne, wiele z nich – np. NEAT1, EGOT, miR-142-3p czy circUBAP2 – wpływa nie tylko na autofagię, ale również na proliferację, inwazję, migrację czy oporność komórek nowotworowych.

Zdolność ncRNA do precyzyjnego modulowania konkretnych szlaków molekularnych sprawia, że stanowią one atrakcyjny cel badań translacyjnych i mogą stanowić podstawę dla nowych strategii terapeutycznych. Szczególnie interesujące wydaje się wykorzystanie lncRNA i miRNA jako biomarkerów prognostycznych oraz predykcyjnych, a także potencjalnych punktów uchwytu dla terapii celowanych. Dalsze badania nad mechanizmami działania ncRNA oraz ich roli w regulacji autofagii mogą przyczynić się do opracowania bardziej skutecznych i spersonalizowanych metod leczenia pacjentów z RJG.

Omówione powyżej przykłady ncRNA biorące udział w modulacji autofagii zostały zebrane w tabeli 2.

PODSUMOWANIE I PERSPEKTYWY

Precyzyjna regulacja autofagii stanowi jedno z kluczowych wyzwań w skutecznym ograniczeniu progresji raka

jelita grubego. Wyniki przeprowadzonych analiz i przeglądu literatury potwierdzają, że autofagia pełni dwoistą rolę w RJG – jest procesem złożonym, regulowanym przez liczne i wzajemnie oddziałujące szlaki sygnałowe oraz czynniki molekularne. Ta hipoteza znalazła potwierdzenie w badaniach molekularnych dotyczących szlaków PI3K/mTOR, AMPK/mTOR oraz kompleksu Beclin-1/PI3K-III, a także w analizie markerów autofagii takich jak LC3, p62/SQSTM1 i Beclin-1.

Złożona rola autofagii w RJG podkreśla konieczność spersonalizowanego podejścia terapeutycznego, uwzględniającego stopień zaawansowania choroby i specyfikę biologiczną guza. Wczesna faza choroby może wymagać strategii wzmacniających autofagię, aby eliminować potencjalne komórki nowotworowe, podczas gdy w fazie zaawansowanej celowe hamowanie autofagii może zwiększać skuteczność terapii RJG i ograniczać oporność komórek nowotworowych na leczenie.

Szczególnie obiecujące wydają się badania nad naturalnymi związkami, takimi jak polifenole, które mogą modulować autofagię w sposób zależny od kontekstu biologicznego. Ich zastosowanie może stanowić element terapii

wspomagających, zwiększając skuteczność chemioterapii i terapii celowanych, przy jednoczesnym ograniczeniu działań niepożądanych.

Podsumowując praca podkreśla znaczenie autofagii jako dynamicznego procesu, który wymaga dalszych badań eksperymentalnych i klinicznych. Tylko precyzyjne zrozumienie jej mechanizmów pozwoli skutecznie wykorzystać regulację autofagii jako innowacyjne narzędzie w walce z RJG.

PIŚMIENNICTWO

- Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, Jemal A (2024) Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 74: 229-263
- Akimoto N, Ugai T, Zhong R, Hamada T, Fujiyoshi K, Giannakis M, Wu K, Cao Y, Ng K, Ogino S (2021) Rising incidence of early-onset colorectal cancer - a call to action. *Nat Rev Clin Oncol* 18: 230-243
- Stoffel EM, Murphy CC (2020) Epidemiology and Mechanisms of the Increasing Incidence of Colon and Rectal Cancers in Young Adults. *Gastroenterology* 158: 341-353
- Dereń-Wagemann I, Kielbiński M, Kuliczowski K (2013) Autofagia - proces o dwóch obliczach. *Acta Haematologica Polonica* 44: 383-391
- Foerster EG, Mukherjee T, Cabral-Fernandes L, Rocha JDB, Girardin SE, Philpott DJ (2022) How autophagy controls the intestinal epithelial barrier. *Autophagy* 18: 86-103
- Koustas E, Sarantis P, Theoharis S, Saetta AA, Chatziandreu I, Kyriakopoulou G, Giannopoulou I, Michelli M, Schizas D, Papavassiliou AG, Karamouzis MV (2019) Autophagy-related Proteins as a Prognostic Factor of Patients With Colorectal Cancer. *Am J Clin Oncol* 42: 767-776
- Debnath J, Gammoh N, Ryan KM (2023) Autophagy and autophagy-related pathways in cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 24: 560-575
- Parzych KR, Klionsky DJ (2014) An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal* 20: 460-73
- Yun CW, Jeon J, Go G, Lee JH, Lee SH (2020) The Dual Role of Autophagy in Cancer Development and a Therapeutic Strategy for Cancer by Targeting Autophagy. *Int J Mol Sci* 22: 179
- Li B, Ming H, Qin S, Zhou L, Huang Z, Jin P, Peng L, Luo M, Zhang T, Wang K, Liu R, Liou YC, Nice EC, Jiang J, Huang C (2024) HSPA8 Activates Wnt/ β -Catenin Signaling to Facilitate BRAF V600E Colorectal Cancer Progression by CMA-Mediated CAV1 Degradation. *Adv Sci (Weinh)* 11: e2306535
- Leiphrakpam PD, Are C (2024) PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway as a Target for Colorectal Cancer Treatment. *Int J Mol Sci* 25: 3178
- Stefani C, Miricescu D, Stanescu-Spinu II, Nica RI, Greabu M, Totan AR, Jinga M (2021) Growth Factors, PI3K/AKT/mTOR and MAPK Signaling Pathways in Colorectal Cancer Pathogenesis: Where Are We Now? *Int J Mol Sci* 22: 10260
- Li Y, Yan W, Qin Y, Zhang L, Xiao S (2024) The Anthraquinone Derivative C2 Enhances Oxaliplatin-Induced Cell Death and Triggers Autophagy via the PI3K/AKT/mTOR Pathway. *Int J Mol Sci* 25, 6468
- Zhong J, Ding S, Zhang X, Di W, Wang X, Zhang H, Chen Y, Zhang Y, Hu Y (2023) To Investigate the Occurrence and Development of Colorectal Cancer Based on the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway. *Front Biosci (Landmark Ed)* 28: 37
- Subbiah V, Coleman N, Piha-Paul SA, Tsimberidou AM, Janku F, Rodon J, Pant S, Dumbrava EE, Fu S, Hong DS, Zhang S, Sun M, Jiang Y, Roszik J, Song J, Yuan Y, Meric-Bernstam F, Naing A (2024) Phase I Study of mTORC1/2 Inhibitor Sapanisertib (CB-228/TAK-228) in Combination with Metformin in Patients with mTOR/AKT/PI3K Pathway Alterations and Advanced Solid Malignancies. *Cancer Res Commun* 4: 378-387
- Coleman N, Stephen B, Fu S, Karp D, Subbiah V, Ahnert JR, Piha-Paul SA, Wright J, Fessahaye SN, Ouyang F, Yilmaz B, Meric-Bernstam F, Naing A (2024) Phase I study of sapanisertib (CB-228/TAK-228/MLN0128) in combination with ziv-aflibercept in patients with advanced solid tumors. *Cancer Med* 13: e6877
- Qin X, Liu M, Xu C, Xing B, Xu X, Wu Y, Ding H, Zhao Q (2022) ZDQ-0620, a Novel Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitor, Inhibits Colorectal Carcinoma Cell Proliferation and Suppresses Angiogenesis by Attenuating PI3K/AKT/mTOR Pathway. *Front Oncol* 12: 848952
- O'Donnell JS, Massi D, Teng MWL, Mandala M (2018) PI3K-AKT-mTOR inhibition in cancer immunotherapy, redux. *Semin Cancer Biol* 48: 91-103
- Kocot A, Wróblewska B (2022) Zaburzona autofagia jako czynnik etiologiczny zróżnicowanych jednostek chorobowych. *Lekarz Wojskowy* 100: 12-18
- Kim DH (2024) Contrasting views on the role of AMPK in autophagy. *Bioessays* 46: e2300211
- Alers S, Löffler AS, Wesselborg S, Stork B (2012) Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol* 32: 2-11
- Wang S, Li H, Yuan M, Fan H, Cai Z (2022) Role of AMPK in autophagy. *Front Physiol* 13: 1015500
- Hu C, Cao Y, Li P, Tang X, Yang M, Gu S, Xiong K, Li T, Xiao T (2021) Oleonic Acid Induces Autophagy and Apoptosis via the AMPK-mTOR Signaling Pathway in Colon Cancer. *J Oncol* 2021: 8281718
- Funderburk SF, Wang QJ, Yue Z (2010) The Beclin 1-VPS34 complex--at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends Cell Biol* 20: 355-62
- Li JX, Yan Q, Liu N, Zheng WJ, Hu M, Yu ZM, Zhou YD, Wang XW, Liang FX, Chen R (2020) The Prognostic Value of Autophagy-Related Markers Bcl-1 and LC-3 in Colorectal Cancers: A Systematic Review and Meta-analysis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2020: 8475840
- Niu L, Yang W, Duan L, Wang X, Li Y, Xu C, Liu C, Zhang Y, Zhou W, Liu J, Zhao Q, Han Y, Hong L, Fan D (2020) Biological functions and theranostic potential of HMGB family members in human cancers. *Ther Adv Med Oncol* 12: 1758835920970850
- Yang D, He L, Ma S, Li S, Zhang Y, Hu C, Huang J, Xu Z, Tang D, Chen Z (2023) Pharmacological Targeting of Bcl-2 Induces Caspase 3-Mediated Cleavage of HDAC6 and Regulates the Autophagy Process in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 24: 6662
- Xu T, Jiang L, Wang Z (2018) The progression of HMGB1-induced autophagy in cancer biology. *Onco Targets Ther* 12: 365-377
- Cao Z, Tian K, Ran Y, Zhou H, Zhou L, Ding Y, Tang X (2024) Beclin-1: a therapeutic target at the intersection of autophagy, immunotherapy, and cancer treatment. *Front Immunol* 15: 1506426
- Ye X, Zheng S, Huang X, Yan Q (2023) Effects of electroacupuncture at Baihui and Dazhui on perioperative neurocognitive impairment and S100- β , LC3-II, Beclin-1 in patients with colon cancer. *Am J Transl Res* 15: 4237-4245
- Sakanashi F, Shintani M, Tsuneyoshi M, Ohsaki H, Kamoshida S (2019) Apoptosis, necroptosis and autophagy in colorectal cancer: Associations with tumor aggressiveness and p53 status. *Pathol Res Pract* 215: 152425
- Guo GF, Wang YX, Zhang YJ, Chen XX, Lu JB, Wang HH, Jiang C, Qiu HQ, Xia LP (2019) Predictive and prognostic implications of 4E-BP1, Beclin-1, and LC3 for cetuximab treatment combined with chemotherapy in advanced colorectal cancer with wild-type KRAS: Analysis from real-world data. *World J Gastroenterol* 25: 1840-1853
- Zarafshani M, Mahmoodzadeh H, Soleimani V, Moosavi MA, Rahmati M (2024) Expression and Clinical Significance of IRE1-XBP1s, p62, and Caspase-3 in Colorectal Cancer Patients. *Iran J Med Sci* 49: 10-21
- Lei C, Zhao B, Liu L, Zeng X, Yu Z, Wang X (2020) Expression and clinical significance of p62 protein in colon cancer. *Medicine (Baltimore)* 99: e18791
- Chen X, Xu H, Yu X, Wang X, Zhu X, Xu X (2019) Apigenin inhibits in vitro and in vivo tumorigenesis in cisplatin-resistant colon cancer cells by inducing autophagy, programmed cell death and targeting m-TOR/PI3K/Akt signalling pathway. *J BUON* 24: 488-493

36. Wang L, Howell MEA, Sparks-Wallace A, Hawkins C, Nicksic CA, Kohne C, Hall KH, Moorman JP, Yao ZQ, Ning S (2019) p62-mediated Selective autophagy endows virus-transformed cells with insusceptibility to DNA damage under oxidative stress. *PLoS Pathog* 15: e1007541
37. Emanuele S, Lauricella M, D'Anneo A, Carlisi D, De Blasio A, Di Liberto D, Giuliano M (2020) p62: Friend or Foe? Evidences for *OncoJanus* and *NeuroJanus* Roles. *Int J Mol Sci* 21: 5029
38. Pan Y, Zhao Z, Li J, Li J, Luo Y, Li W, You W, Zhang Y, Li Z, Yang J, Xiao ZJ, Wang Y (2022) Nuclear Beclin 1 Destabilizes Retinoblastoma Protein to Promote Cell Cycle Progression and Colorectal Cancer Growth. *Cancers (Basel)* 14: 4735
39. Ye J, Zhang J, Zhu Y, Wang L, Jiang X, Liu B, He, G (2023) Targeting autophagy and beyond: Deconvoluting the complexity of Beclin-1 from biological function to cancer therapy. *Acta Pharm Sin B* 13: 4688–4714
40. Chen Z, Li Y, Zhang C, Yi H, Wu C, Wang J, Liu Y, Tan J, Wen J (2013) Downregulation of Beclin 1 and impairment of autophagy in a small population of colorectal cancer. *Dig Dis Sci* 58: 2887-94
41. Qureshi-Baig K, Kuhn D, Viry E, Pozdeev VI, Schmitz M, Rodriguez F, Ullmann P, Koncina E, Nurmik M, Frasilho S, Nazarov PV, Zuegel N, Boulmont M, Karapetyan J, Antunes L, Val D, Mittelbronn M, Janji B, Haan S, Letellier E (2020) Hypoxia-induced autophagy drives colorectal cancer initiation and progression by activating the PRKC/PKC-EZR (ezrin) pathway. *Autophagy* 16: 1436-1452
42. Shabkhizan R, Haiaty S, Moslehian MS, Bazmani A, Sadeghsoltani F, Saghaei Bagheri H, Rahbarghazi R, Sakhinia E (2023) The Beneficial and Adverse Effects of Autophagic Response to Caloric Restriction and Fasting. *Adv Nutr* 14: 1211-1225
43. Mahgoub E, Taneera J, Sulaiman N, Saber-Ayad M (2022) The role of autophagy in colorectal cancer: Impact on pathogenesis and implications in therapy. *Front Med (Lausanne)* 9: 959348
44. Lei Y, Zhang E, Bai L, Li Y (2022) Autophagy in Cancer Immunotherapy. *Cells* 11: 2996
45. Zhang B, Liu L (2021) Autophagy is a double-edged sword in the therapy of colorectal cancer. *Oncol Lett* 21: 378
46. Alian DME, Helmy MW, Haroun M, Moussa N (2024) Modulation of autophagy and apoptosis can contribute to the anticancer effect of Abemaciclib/Celecoxib combination in colon cancer cells. *Med Oncol* 41: 43
47. Scott AJ, Arcaroli JJ, Bagby SM, Yahn R, Huber KM, Serkova NJ, Nguyen A, Kim J, Thorburn A, Vogel J, Quackenbush KS, Capasso A, Schreiber A, Blatchford P, Klauck PJ, Pitts TM, Eckhardt SG, Messersmith WA (2018) Cabozantinib Exhibits Potent Antitumor Activity in Colorectal Cancer Patient-Derived Tumor Xenograft Models via Autophagy and Signaling Mechanisms. *Mol Cancer Ther* 17: 2112-2122
48. Zhang S, Yang Y, Weng W, Guo B, Cai G, Ma Y, Cai S (2019) *Fusobacterium nucleatum* promotes chemoresistance to 5-fluorouracil by upregulation of BIRC3 expression in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 38: 14
49. Qiang L, Li H, Wang Z, Wan L, Jiang G (2022) Deconvoluting the complexity of autophagy in colorectal cancer: From crucial pathways to targeted therapies. *Front Oncol* 12: 2022
50. Baldasso-Zanon A, Silva AO, Franco N, Picon RV, Lenz G, Lopez PLDC, Filippi-Chiela EC (2024) The rational modulation of autophagy sensitizes colorectal cancer cells to 5-fluorouracil and oxaliplatin. *J Cell Biochem* 125: e30517
51. Park SY, Chung YS, Park SY, Kim SH (2022) Role of AMPK in Regulation of Oxaliplatin-Resistant Human Colorectal Cancer. *Biomedicines* 10: 2690
52. Kciuk M, Marciniak B, Kontek R (2020) Irinotecan-Still an Important Player in Cancer Chemotherapy: A Comprehensive Overview. *Int J Mol Sci* 21: 4919
53. Blondy S, David V, Verdier M, Mathonnet M, Perraud A, Christou N (2020) 5-Fluorouracil resistance mechanisms in colorectal cancer: From classical pathways to promising processes. *Cancer Sci* 111: 3142-3154
54. Siegman A, Shaykevich A, Chae D, Silverman I, Goel S, Maitra R (2024) Erlotinib Treatment in Colorectal Cancer Suppresses Autophagy Based on *KRAS* Mutation. *Curr Issues Mol Biol* 46: 7530-7547
55. Ibrahim D, Khater SI, Abdelfattah-Hassan A, Alqahtani LS, Metwally AS, Bazeed SM, Elgamal A, Sheraiba NI, Hussein EM, Ali Alasmay F, Salem GA, Ali M, Mahfouz H (2023) Prospects of new targeted nanotherapy combining liponiosomes with berberine to combat colorectal cancer development: An in vivo experimental model. *Int J Pharm* 647: 123511
56. Helmy MW, Ghoneim AI, Katary MA, Elmahdy RK (2020) The synergistic anti-proliferative effect of the combination of diosmin and BEZ-235 (dactolisib) on the HCT-116 colorectal cancer cell line occurs through inhibition of the PI3K/Akt/mTOR/NF- κ B axis. *Mol Biol Rep* 47: 2217-2230
57. Kwon Y, Kim M, Jung HS, Kim Y, Jeoung D (2019) Targeting Autophagy for Overcoming Resistance to Anti-EGFR Treatments. *Cancers (Basel)* 11: 1374
58. Manzoor S, Muhammad JS, Maghazachi AA, Hamid Q (2022) Autophagy: A Versatile Player in the Progression of Colorectal Cancer and Drug Resistance. *Front Oncol* 12: 924290
59. Kasi PM, Aftable MG, Herting C, Lukanowski M, Jin Z (2023) Anti-EGFR Antibodies in the Management of Advanced Colorectal Cancer. *Oncologist* 28: 1034-1048
60. Doleschal B, Petzer A, Rumpold H (2022) Current concepts of anti-EGFR targeting in metastatic colorectal cancer. *Front Oncol* 12: 1048166
61. Gu XY, Jiang Y, Li MQ, Han P, Liu YL, Cui BB (2020) Over-expression of EGFR regulated by RARA contributes to 5-FU resistance in colon cancer. *Aging (Albany NY)* 12: 156-177
62. Zhao Z, Xia G, Li N, Su R, Chen X, Zhong L (2018) Autophagy Inhibition Promotes Bevacizumab-induced Apoptosis and Proliferation Inhibition in Colorectal Cancer Cells. *J Cancer* 9: 3407-3416
63. Tsai CY, Chen CY, Chiou YH, Shyu HW, Lin KH, Chou MC, Huang MH, Wang YF (2017) Epigallocatechin-3-Gallate Suppresses Human Herpesvirus 8 Replication and Induces ROS Leading to Apoptosis and Autophagy in Primary Effusion Lymphoma Cells. *Int J Mol Sci* 19: 16
64. Wei R, Mao L, Xu P, Zheng X, Hackman RM, Mackenzie GG, Wang Y (2018) Suppressing glucose metabolism with epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces breast cancer cell growth in preclinical models. *Food Funct* 9: 5682-5696
65. Liu H, Lou J, Liu Y, Liu Z, Xie J, Sun J, Pan H, Han W (2022) Intestinal epithelial cell autophagy deficiency suppresses inflammation-associated colon tumorigenesis. *Mol Ther Nucleic Acids* 28: 35-46
66. Zhang C, Liang R, Gan X, Yang X, Chen L, Jian J (2019) MicroRNA-384-5p/Beclin-1 As Potential Indicators For Epigallocatechin Gallate Against Cardiomyocytes Ischemia Reperfusion Injury By Inhibiting Autophagy Via PI3K/Akt Pathway. *Drug Des Devel Ther* 13: 3607-3623
67. Xuan F, Jian J (2016) Epigallocatechin gallate exerts protective effects against myocardial ischemia/reperfusion injury through the PI3K/Akt pathway-mediated inhibition of apoptosis and the restoration of the autophagic flux. *Int J Mol Med* 38: 328-36
68. Irimie AI, Braicu C, Zanoaga O, Pileczki V, Gherman C, Berindan-Neagoe I, Campian RS (2015) Epigallocatechin-3-gallate suppresses cell proliferation and promotes apoptosis and autophagy in oral cancer SSC-4 cells. *Onco Targets Ther* 8: 461-70
69. Grube S, Ewald C, Kögler C, Lawson McLean A, Kalff R, Walter J (2018) Achievable Central Nervous System Concentrations of the Green Tea Catechin EGCG Induce Stress in Glioblastoma Cells in Vitro. *Nutr Cancer* 70: 1145-1158
70. Kiruthiga C, Devi KP, Nabavi SM, Bishayee A (2020) Autophagy: A Potential Therapeutic Target of Polyphenols in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel)* 12: 562
71. Zhang R, Yu Q, Lu W, Shen J, Zhou D, Wang Y, Gao S, Wang Z (2019) Grape seed procyanidin B2 promotes the autophagy and apoptosis in colorectal cancer cells via regulating PI3K/Akt signaling pathway. *Onco Targets Ther* 12: 4109-4118
72. Bu H, Liu D, Zhang G, Chen L, Song Z (2020) AMPK/mTOR/ULK1 Axis-Mediated Pathway Participates in Apoptosis and Autophagy Induction by Oridonin in Colon Cancer DLD-1 Cells. *Onco Targets Ther* 13: 8533-8545

73. Zhou M, Niu H, Cui D, Huang G, Li J, Tian H, Xu X, Liang F, Chen R (2024) Resveratrol triggers autophagy-related apoptosis to inhibit the progression of colorectal cancer via inhibition of FOXQ1. *Phytother Res* 38: 3218-3239
74. Tsai CH, Huang HC, Lin KJ, Liu JM, Chen GL, Yeh YH, Lu TL, Lin HW, Lu MT, Chu PC (2024) Inhibition of Autophagy Aggravates *Ara-chis hypogaea* L. Skin Extracts-Induced Apoptosis in Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 25: 1345
75. Liu L, Zhao WM, Yang XH, Sun ZQ, Jin HZ, Lei C, Jin B, Wang HJ (2017) Effect of inhibiting Beclin-1 expression on autophagy, proliferation and apoptosis in colorectal cancer. *Oncol Lett* 14: 4319-4324
76. Chen L, He M, Zhang M, Sun Q, Zeng S, Zhao H, Yang H, Liu M, Ren S, Meng X, Xu H (2021) The Role of non-coding RNAs in colorectal cancer, with a focus on its autophagy. *Pharmacol Ther* 226: 107868
77. Lei B, Tian Z, Fan W, Ni B (2019) Circular RNA: a novel biomarker and therapeutic target for human cancers. *Int J Med Sci* 16: 292-301
78. Żurawska A (2022) Rola kolistych RNA w stwardnieniu rozsianym i innych schorzeniach neuroimmunologicznych. *Postepy Biochem* 68: 288-299
79. Islam Khan MZ, Law HKW (2021) RAMS11 promotes CRC through mTOR-dependent inhibition of autophagy, suppression of apoptosis, and promotion of epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Cell Int* 21: 321
80. Cheng L, Han T, Zhang Z, Yi P, Zhang C, Zhang S, Peng W (2021) Identification and Validation of Six Autophagy-related Long Non-coding RNAs as Prognostic Signature in Colorectal Cancer. *Int J Med Sci* 18: 88-98
81. Liu Y, Zhang B, Cao WB, Wang HY, Niu L, Zhang GZ (2020) Study on Clinical Significance of LncRNA EGOT Expression in Colon Cancer and Its Effect on Autophagy of Colon Cancer Cells. *Cancer Manag Res* 12: 13501-13512
82. Wang S, Du H, Sun P (2021) Long Noncoding RNA *NEAT1* Contributes to the Tumorigenesis of Colorectal Cancer Through Regulating *SLC38A1* Expression by Sponging miR-138. *Cancer Biother Radiopharm* 36: 793-802
83. Lan SH, Lin SC, Wang WC, Yang YC, Lee JC, Lin PW, Chu ML, Lan KY, Zucchini R, Liu HS, Wu SY (2021) Autophagy Upregulates miR-449a Expression to Suppress Progression of Colorectal Cancer. *Front Oncol* 11: 738144
84. Zheng J, Cheng C, Xu J, Gao P, Wang J, Chen L (2022) miR-142-3p Regulates Tumor Cell Autophagy and Promotes Colon Cancer Progression by Targeting TP53INP2. *Chemotherapy* 67: 57-66
85. Wang C, Shi Z, Hong Z, Pan J, Chen Z, Qiu C, Zhuang H, Zheng X (2020) MicroRNA-1276 Promotes Colon Cancer Cell Proliferation by Negatively Regulating LACTB. *Cancer Manag Res* 12: 12185-12195
86. Li Y, Li C, Li D, Yang L, Jin J, Zhang B (2019) lncRNA *KCNQ1OT1* enhances the chemoresistance of oxaliplatin in colon cancer by targeting the miR-34a/ATG4B pathway. *Oncotargets Ther* 12: 2649-2660
87. Chen F, Guo L, Di J, Li M, Dong D, Pei D (2021) Circular RNA ubiquitin-associated protein 2 enhances autophagy and promotes colorectal cancer progression and metastasis via miR-582-5p/FOXO1 signaling. *J Genet Genomics* 48: 1091-1103
88. Yang BL, Liu GQ, Li P, Li XH (2022) Circular RNA *CUL2* regulates the development of colorectal cancer by modulating apoptosis and autophagy via miR-208a-3p/PPP6C. *Aging (Albany NY)* 14: 497-508

The dual role of autophagy in colorectal cancer

Julia Wojtkowicz¹, Zuzanna Senkowska¹, Karolina Niewinna², Urszula Lewandowska², Katarzyna Owczarek^{2✉}

¹Student of the Department of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Medical University of Lodz

²Department of Biochemistry, Institute of Biochemistry and Chemistry, Faculty of Medicine, Medical University of Lodz

✉corresponding author: katarzyna.owczarek@umed.lodz.pl

Key words: LC3, p62, Beclin-1, colorectal cancer, bioactive compounds

ABSTRACT

In recent years, increasing attention has been devoted to cellular processes that modulate tumor progression, particularly autophagy. Current studies indicate a dual role of autophagy in the pathogenesis of colorectal cancer. In the early stages, autophagy serves a protective function by degrading damaged organelles and proteins, whereas in advanced stages, it promotes cancer cell survival. The regulation of autophagy primarily involves the PI3K/Akt/mTOR and AMPK/mTOR signalling pathways, as well as the Beclin-1/PI3K complex. Autophagy-related proteins such as LC3, p62/SQSTM1, and Beclin-1 hold significant diagnostic and prognostic value. Given the impact of autophagy on the efficacy of chemotherapy and targeted therapies, pharmacological modulation of this process has garnered increasing interest. Natural compounds, particularly polyphenols, demonstrate promising multitargeted effects on autophagy. This review comprehensively analyses the molecular mechanisms underlying autophagy in colorectal cancer and evaluates its potential as a therapeutic target.

