

## Komentarz do cyklu prac

Według danych Krajowego Rejestru Nowotworów rak piersi jest najczęściej diagnozowaną chorobą nowotworową i drugą nowotworową przyczyną śmierci wśród kobiet w Polsce. Obecnie standardem leczenia wczesnego raka piersi jest chirurgiczny zabieg oszczędzający (z ang. breast conserving therapy, BCT) z uzupełniającą radioterapią (ang. external beam radiation therapy, EBRT), która zmniejsza ryzyko powstania wznowy miejscowej. Jedną z nowych strategii leczenia jest zastosowanie radioterapii śródoperacyjnej (z ang. intraoperative radiotherapy, IORT), która pozwala na precyzyjne dostarczenie terapeutycznej dawki promieniowania jonizującego do łoża po usuniętym guzie, w trakcie zabiegu oszczędzającego. Leczenie chirurgiczne może wpływać na proces tworzenia przerzutów oraz powstania wznowy w miejscu zmiany pierwotnej, choć mechanizmy leżące u podstaw tych procesów nie są w pełni poznane. Zdanych literaturowych wynika, że płyny pooperacyjne (ang. wound fluids, WF) zebrane po leczeniu chirurgicznym chorych na nowotwór piersi, w warunkach *in vitro* wzbudzają wzrost linii komórkowych nowotworu piersi, stymulując proliferację, wzrost, inwazyjność oraz wpływając na ich profil proteomiczny. Wykazano, że w zależności od pochodzenia płynu, (od pacjentek leczonych standardowym zabiegiem oszczędzającym lub z wykorzystaniem techniki IORT) odpowiedź komórek nowotworowych może się znacząco różnić. Jedną z cech guzów nowotworowych jest ich heterogenna budowa. Coraz większą uwagę przywiązuje się do populacji nowotworowych komórek macierzystych (ang. breast cancer stem cells; BCSC). Mają one cechy zbliżone do komórek macierzystych prawidłowych jak nieograniczona zdolność do samoodnowy, czy nieograniczony potencjał proliferacyjny. Liczne badania *in vivo* oraz *in vitro* wskazują, że populacja nowotworowych komórek macierzystych raka piersi odgrywa kluczową rolę w procesie wznowy, powstawania przerzutów oraz rozwoju radio- i chemiooporności. BCSC są identyfikowane na podstawie występowania markerów powierzchniowych CD44+ i CD24- oraz analizie aktywności enzymu dehydrogenazy aldehydowej 1 (ALDH 1). W nowotworach piersi zidentyfikowano liczne cząsteczki małych, niekodujących RNA – mikroRNA (miRNA), których ekspresja ma istotne znaczenie w rozwoju nowotworu. MiRNA regulują szereg procesów komórkowych, między innymi poprzez wpływ na ekspresję onkogenów, genów supresorowych, genów odpowiedzialnych za przejście epitelialno-mezenchymalne (ang. epithelial-mesenchymal transition, EMT) i innych kluczowych dla prawidłowego funkcjonowania komórki. Odgrywają więc istotną rolę w inicjacji procesu kancerogenezy, powstawania przerzutów, lekooporności oraz indukcji i odpowiedzi na odczyn zapalny. Celem głównym rozprawy doktorskiej było określenie wpływu płynu pooperacyjnego, zebranego z łoża po usuniętym guzie piersi przy jednoczesnym zastosowaniu techniki IORT na: 1) populację komórek nowotworowych ludzkiego raka piersi *in vitro* fenotypie macierzystym CD44+/CD24- w ustalonych liniach komórkowych raka piersi 2) poziom ekspresji wybranych miRNA w ustalonych liniach komórkowych raka piersi. Zuwagi na fakt, że komórki nowotworowe cechuje nieograniczony potencjał proliferacyjny, postanowiono określić wpływ rzeczonych płynów na proces apoptozy w warunkach *in vitro*. Do badań wykorzystano płyny pooperacyjne zebrane od 44 pacjentek leczonych chirurgicznie w Wielkopolskim Centrum Onkologii w Poznaniu. Średnia wieku wynosiła 58 lat, przy czym zakres wieku wynosił 38-76 lat. Pierwsza grupa pacjentek (22) została poddana leczeniu chirurgicznemu z wykorzystaniem techniki radioterapii śródoperacyjnej z zastosowaniem dawki 10 Gy na łożę po usuniętym guzie. Drugą grupę stanowiły pacjentki (22) leczone standardowym zabiegiem oszczędzającym. Siedem dni po operacji każda pacjentka była poddana badaniu ultrasonograficznemu. W przypadku, gdy w łożu po usuniętym guzie znajdował się płyn, był on pobierany za pomocą aspiracji igłowej. Ze względu na zróżnicowany profil molekularny wykorzystano następujące linie nowotworowe ludzkiego raka piersi: MDA-MB-231 (ER/PR-; HER2/Neu-), MDA-MB-468 (ER/PR-; HER2/Neu), BT-20 (ER/PR-; HER2/Neu-), BT-549 (ER/PR-; HER2/Neu-), SK-BR-3 (ER/PR-; HER2/Neu+), BT-474 (ER/PR+; HER2/Neu+), MCF-7 (ER/PR+; HER2/Neu-) and T47D (ER/PR+; HER2/Neu), które reprezentują podstawowe podtypy molekularne nowotworów piersi. Linie komórkowe pochodzą z American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA). W trakcie eksperymentu do medium hodowlanego dodano płyn pooperacyjny w stężeniu 10% zebrany od

grupy pacjentek po radioterapii śródoperacyjnej (RT-WF) lub bez napromieniania śródoperacyjnego (WF). W takim wzbogaconym medium komórki były hodowane przez 4 dni. Grupy kontrolne były hodowane w standardowym medium hodowlanym zgodnie z zaleceniami producenta. Publikacja nr 1 Zaleska K., Suchorska W.M., Przybyła A., Murawa D. Effect of surgical wound fluids after intraoperative electron radiotherapy on the cancer stem cell phenotype in a panel of human breast cancer cell lines. *Oncol Lett.* 2016 Nov; 12(5): 3707–3714.

40 Celem pracy było określenie wpływu płynu pooperacyjnego po zastosowaniu techniki IORT na fenotyp macierzysty CD44+/CD24- badanych linii komórkowych ludzkiego raka piersi. Po czterech dniach hodowania w medium wzbogaconym płynami pooperacyjnymi (RT-WF lub WF), komórki znakowano przeciwciałami anti-CD44 oraz anti-CD24 z zastosowaniem odpowiednich kontroli izotypowych i analizowano za pomocą cytometru przepływowego FACS Aria (BD Bioscience). Wykorzystując zestaw ALDEFLUOR™ Kit (Stemcell Technologies) dokonano oznaczenia aktywności ALDH1. Uzyskane wyniki wykazują wpływ płynów pooperacyjnych na populację komórek o fenotypie macierzystym CD44+/CD24-. Linie BT-549 i MDA-MB-468 inkubowane 4 dni 10% RT-WF wykazały zmniejszoną populację komórek o fenotypie macierzystym w porównaniu do grupy kontrolnej. Ponadto odwrotny skutek, tzn. wzrost populacji komórek o fenotypie macierzystym powodował płyn po standardowym leczeniu chirurgicznym. Należy podkreślić, że linia MDA-MB-231 reprezentująca podobnie jak BT-549 oraz MDA-MB-468 nowotwory piersi potrójnie ujemne (ang. triple-negative breast cancer) nie wykazała istotnych różnic w populacji BCSC. Zatem w obrębie jednego podtypu molekularnego widoczne są różnorodne odpowiedzi biologiczne. W przypadku linii typu luminalnego MCF-7 oba płyny spowodowały spadek wielkości populacji BCSC, podczas gdy komórki SK-BR-3 z nadekspresją receptora HER2, wykazały efekt stymulujący w porównaniu z kontrolami. Wysoka aktywność ALDH1 także uznawana jest za marker macierzystości w raku piersi. Zasadniczo, płyny pooperacyjne stymulowały wzrost aktywności ALDH1 w porównaniu z kontrolami, przy czym indukcja ta była niższa w przypadku płynów pochodzących po radioterapii śródoperacyjnej. Badania wskazały, że oba markery macierzystości w nowotworach piersi w warunkach *in vitro* są niezależnymi od siebie markerami. Dodatkowo ekspresja CD44+/CD24- i aktywność ALDH1 zależą od podtypów molekularnych badanych linii komórkowych. Najnowsze badania Li i wsp. potwierdzają powyższe także na modelu *in vivo*. Publikacja nr 2 Zaleska K., Przybyła A., Kulcenty K., Wichtowski M., Mackiewicz A., Suchorska W., Murawa D. Wound fluids affect miR-21, miR-155 and miR-221 expression in breast cancer cell lines, and this effect is partially abrogated by intraoperative radiation therapy treatment. *Oncol Lett.* 2017 Oct; 14(4): 4029–4036. Celem pracy było określenie wpływu płynów pooperacyjnych po radioterapii śródoperacyjnej na poziom ekspresji wybranych miRNA. Na podstawie danych literaturowych

41 wytypowano miR-21, miR-155 oraz miR-221, których podwyższony poziom ekspresji obserwowano w nowotworach piersi. Wytypowane miRNA regulują szereg procesów komórkowych wpływając na inwazyjność, przerzutowanie, migrację, wzrost, proliferację oraz apoptozę. Wybrane linie nowotworowe BT-549, MDA-MB-468, SK-BR-3 oraz MCF-7, hodowane były przez 4 dni z płynami pooperacyjnymi jak opisano wyżej. Następnie wyizolowano całkowite RNA komórkowe (zawierające również frakcję miRNA) z wykorzystaniem TRIzol reagent (Sigma Aldrich) i przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji przy użyciu Taq-Man Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific). Analizę ekspresji wybranych miRNA prowadzono z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych zestawów starterów i sond molekularnych TaqMan MicroRNA Assay Kit (ThermoFisher Scientific). Relatywny poziom ekspresji miR-21, miR-155 oraz miR-221 obliczono z zastosowaniem metody porównania różnic wartości Cq  $\Delta\Delta Cq$ , która opiera się na wyznaczeniu względnej różnicy poziomów ekspresji między próbą badaną, a próbą referencyjną. Jako wewnętrzną kontrolę reakcji użyto miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control (1.6x10<sup>8</sup> kopii/ $\mu$ l). Ekspresja wybranych miRNA została oznaczona dla czterech różnych linii ludzkiego raka piersi prezentujących trzy podtypy molekularne pod względem obecności receptorów progesteronowych, estrogenowych i statusu HER2. W linii podtypu bazalno/mezenchymalnego BT-549 nie zaobserwowano różnic w poziomie ekspresji miR-21 oraz miR-221. Pod wpływem płynów pooperacyjnych zaobserwowano spadek ekspresji miR-155 powiązanego z migracją i inwazyjnością. Linia SK-BR-3 cechująca się nadekspresją receptorów HER2

wykazała istotny wzrost ekspresji trzech badanych miRNA, przy czym należy podkreślić, że płyny pooperacyjne pochodzące ze standardowego leczenia chirurgicznego wykazywały wyższy poziom stymulacji ekspresji w porównaniu z płynami po zabiegu IORT. Linia bazalna/epitelialna MDA-MB-231 oraz luminalna MCF-7 wykazały obniżony poziom ekspresji badanych miRNA zarówno w wyniku stymulacji RT-WF jak i WF. Wyniki powyższej pracy wykazują wpływ płynów pooperacyjnych na poziom ekspresji miR-21, miR-155 i miR-221 powiązanych z inwazyjnością, przerzutowaniem, migracją, wzrostem i proliferacją oraz apoptozą. Zmiany ekspresji są powiązane z podtypem molekularnym badanych linii komórkowych

Publikacja nr 3Kulenty K.I.,Piotrowski I.,Zaleska K.,Murawa D.,Suchorska W.M. K Wound fluids collected from patients after IORT treatment activates extrinsic apoptotic pathway in MCF7 breast cancer cell line. Ginekol Pol.2018;89(4):175-182.

## Celem

publikacji było określenie wpływu płynu pooperacyjnego po zastosowaniu IORT na aktywację procesu apoptozy w linii komórkowej MCF-7. Po czterodniowej inkubacji komórek w medium wzbogaconym płynami wykonano izolację całkowitego RNA, reakcję odwrotnej transkrypcji, a następnie przy użyciu zestawu RealTime UPL Probes Master (Roche) zbadano poziom ekspresji genów będących markerami aktywacji szlaku wewnętrznego i zewnętrznego apoptozy. W celu wyznaczenia względnego poziomu ekspresji badanego genu wykorzystano metodę porównania różnic wartości Cq ( $\Delta\Delta Cq$ ). Normalizację ekspresji badanych genów obliczono za pomocą metody  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ . Przeprowadzono analizę ekspresji siedmiu genów związanych z aktywacją szlaku zewnętrznego apoptozy: TNF, TRAIL, TNFRSF10A, TNFRSF10B, FADD, CASP8, CASP10 oraz szlaku wewnętrznego apoptozy: BCL2, APAF-1, CASP9, CASP3, CASP6, CASP7, DIABLO. Ekspresja genów zaangażowanych w zewnętrzny szlak apoptyczny była znacznie podwyższona w grupie komórek inkubowanych z płynami po IORT w porównaniu do grupy kontrolnej oraz WF. Nie zaobserwowano znaczących zmian w ekspresji genów zaangażowanych w szlak wewnętrzny, z wyjątkiem CASP9. Wyniki powyższej pracy wskazują, że płyny pooperacyjne po zastosowaniu techniki IORT mogą indukować apoptozę komórek nowotworowych poprzez aktywację szlaku zewnętrznego apoptozy. Cykl prac wykazuje wpływ płynów pooperacyjnych po radioterapii śródoperacyjnej na zmiany populacji komórek nowotworowych o fenotypie macierzystym, zmianę ekspresji miR-21, miR-155, miR-221 oraz aktywację zewnętrznego szlaku apoptozy w komórkach nowotworowych ludzkiego raka piersi w warunkach in vitro. W porównaniu do płynów pochodzących ze standardowego leczenia chirurgicznego, ich działanie może powodować obniżenie proliferacji, inwazyjności oraz zdolności przerzutowania komórek raka piersi in vitro. Należy podkreślić, że zmiany te są zależne od typu molekularnego badanej linii komórkowej.

Omówione wyniki wspierają hipotezę o interwencji chirurgicznej jako czynnika wywołującym szereg reakcji promujących proces tworzenia przerzutów oraz powstania wznowy miejscowej. Poznanie biologicznej odpowiedzi na zastosowaną radioterapię śródoperacyjną przyczyni się do skutecznego planowania terapii oraz zrozumienia mechanizmów powstawania wznowy i przerzutów