

## Streszczenie

### **Wpływ pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzących z mezenchymalnych komórek macierzystych na zahamowanie aktywności biologicznej nowotworowych komórek macierzystych raka jajnika**

Rak jajnika jest jednym z siedmiu najczęściej występujących nowotworów u kobiet na świecie. Ze względu na brak objawów w początkowych etapach choroby, pacjentki otrzymują diagnozę w zaawansowanym stadium, często z przerzutami do innych narządów. Przy przerzutowaniu raka jajnika najczęściej dochodzi do gromadzenia się płynu puchlinowego w jamie otrzewnej. Wybór metody terapeutycznej jest uzależniony od kilku czynników, m.in. od typu histologicznego nowotworu, jego zaawansowania i stanu klinicznego pacjentki. Powszechnie stosowaną metodą jest chemioterapia oparta na lekach cytostatycznych na bazie platyny lub jej pochodnych z następowym chirurgicznym usunięciem guza. Niepowodzenia terapii są związane z obecnością w mikrośrodowisku nowotworu rzadkiej populacji nowotworowych komórek macierzystych (z ang. Cancer Stem Cells, CSCs), która jest oporna na powszechnie stosowane leki chemioterapeutyczne i radioterapię. Dlatego istnieje pilna potrzeba opracowania modeli komórkowych umożliwiających badania nad biologią CSCs oraz zidentyfikowanie czynników biologicznych lub farmakologicznych, które mogą zahamować aktywność biologiczną CSCs.

Mezenchymalne komórki macierzyste (z ang. Mesenchymal Stem Cells, MSCs) reprezentują heterogenną populację komórek multipotencjalnych, które rezydują w większości tkanek ludzkich i odpowiadają za utrzymanie homeostazy narządów. Badania nad biologią MSCs dokumentują, że mogą stać się obiecującymi narzędziami w zastosowaniach klinicznych w procesach regeneracji tkanek ze względu na ich wysoki potencjał proliferacyjny, właściwości przeciwzapalne i immunomodulujące. Ponadto MSCs uwalniają także różne cząsteczki bioaktywne w postaci czynników rozpuszczalnych, egzosomów i mikropęcherzyków (MVs), które działają w mikrośrodowisku tkanek jako mediatory komunikacji komórka-komórka, wywierając efekty parakryne. W odniesieniu do nowotworów badania wykazały sprzeczne wyniki związane z przeciwnowotworową lub pronowotworową aktywnością MSC i ich pochodnych. Niniejsza rozprawa doktorska przedstawia badania aktywności przeciwnowotworowej MVs, pochodzących z unieśmiertelnionych MSC pozyskanych z tkanki tłuszczowej (HATMSC2-MVs), w odniesieniu do komórek raka jajnika.

### **Celami rozprawy były:**

1) Charakterystyka MVs pochodzących z unieśmiertelnionych mezenchymalnych komórek macierzystych z tkanki tłuszczowej (HATMSC2-MVs); 2) Ocena wpływu HATMSC2-MVs na aktywność biologiczną komórek linii raka jajnika ES-2 i OAW-42; 3) Charakterystyka pierwotnych komórek raka jajnika pochodzących z tkanki pooperacyjnej raka jajnika i płynu puchlinowego; 4) Ocena wpływu HATMSC2-MVs na aktywność biologiczną pierwotnych komórek raka jajnika w modelu 2D i 3D; 5) Analiza obecności białek proapoptotycznych i antyapoptotycznych w komórkach HATMSC2 i w mikropęcherzykach HATMSC2-MVs; 6) Ocena fenotypu oraz właściwości biologicznych komórek pierwotnych raka jajnika izolowanych z płynu puchlinowego (OvCa3 A i OvCa7 A) i pochodzących z nich unieśmiertelnionych linii komórkowych OvCa3 A hTERT i OvCa7 A hTERT.

Rozprawa doktorska składa się z cyklu trzech powiązanych tematycznie prac oryginalnych opublikowanych w recenzowanym czasopiśmie z listy JCR.

W pierwszej publikacji (*IJMS 2020, 1;24(21):15862*) scharakteryzowano mikropęcherzyki pochodzące z unieśmiertelnionych MSC pozyskanych z tkanki tłuszczowej (HATMSC2-MVs). Otrzymano jednorodną populację HATMSC2-MVs o średniej wielkości koło 450 nm, co potwierdzono metodą dynamicznego rozpraszania światła (z ang. Dynamic Light Scattering, DLS) oraz metodą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (z ang. Transmission Electron Microscopy, TEM). HATMSC2-MVs wykazywały ekspresję markerów CD73, CD90, CD105, HLA-ABC oraz brak ekspresji markerów CD45 oraz HLA-DR, porównywalną do fenotypu komórek rodzicielskich HATMSC2.

W dalszej części pracy oceniono wpływ HATMSC2-MVs na aktywność biologiczną komórek linii raka jajnika reprezentujących: raka jasnokomórkowego (ES-2) i torbielakogruczolaka (cystadenocarcinoma) (OAW-42). Zbadano wpływ HATMSC2-MVs na aktywność proliferacyjną, cykl komórkowy, przeżycie komórek, fenotyp oraz profil wydzielniczy komórek nowotworowych. Przed przystąpieniem do testów aktywności biologicznej potwierdzono internalizację HATMSC2-MVs do komórek linii raka jajnika ES-2 i OAW-42 z użyciem metod cytometrii przepływowej i mikroskopii fluorescencyjnej. W testach funkcjonalnych HATMSC2-MVs hamowały proliferację komórek (test MTT) oraz indukowały śmierć komórek nowotworowych na drodze apoptozy i/lub nekrozy co wykazano za pomocą cytometrii przepływowej. HATMSC2-MVs nie wpływały na zmianę fenotypu komórek ES-2 i OAW-42. Internalizacja HATMSC2-MVs do komórek ES-2 i OAW-42 prowadziła do wzrostu wydzielania przez komórki nowotworowe czynników przeciwnowotworowych (np. IL-2, IL-15, IFN- $\gamma$ ) oraz spadku wydzielania czynników

promujących wzrost nowotworu (np. VEGF, IL-8, GRO-alfa) co wykazano za pomocą analizy membran białkowych.

Druga publikacja (*IJMS 2023, 30;21(23):9143*) przedstawia wyniki charakterystyki pierwotnych komórek raka jajnika pochodzących z tkanki pooperacyjnej i płynu puchlinowego oraz ocenę wpływu HATMSC2-MVs na aktywność biologiczną pierwotnych komórek raka jajnika w modelu 2D i 3D. Zbadano również obecność czynników bioaktywnych regulujących apoptozę w komórkach HATMSC2 i HATMSC2-MVs, przy użyciu membran białkowych. Analiza fenotypu komórek została przeprowadzona z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, obrazowania mikroskopowego i metody PCR w czasie rzeczywistym. Wykazano, że pierwotne komórki raka jajnika z tkanki pooperacyjnej i płynu puchlinowego są heterogenną populacją z ekspresją markerów MSCs (CD73, CD90, CD105), markerów CSCs (CD24, CD44, CD133, ALDH1, c-kit) na różnym poziomie. Ponadto, komórki nowotworowe wykazywały ekspresję markerów dla fibroblastów towarzyszących nowotworowi (z ang. Cancer-Associated Fibroblasts, CAFs) (PDGFRa, FAP), markerów przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (z ang. Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT) (Snail, wimentyna) i markerów odpowiedzialnych za utrzymanie pluripotencji (Oct4, Sox2, Nanog) na poziomie ekspresji białka. Ponadto, pierwotne komórki raka jajnika wykazały ekspresję transkryptów odpowiedzialnych za pluripotencję (Oct4, Sox2) oraz transkryptów protoonkogennych p53, p21, c-myc na różnym poziomie ekspresji. W testach funkcjonalnych zaobserwowano wpływ HATMSC2-MVs na spadek aktywności metabolicznej oraz brak wpływu na aktywność migracyjną pierwotnych komórek. Podobnie jak w przypadku linii komórkowych ES-2 i OAW-42, traktowanie pierwotnych komórek nowotworowych przez HATMSC2-MVs indukowało proces apoptozy i/lub nekrozy. W ostatnim etapie pracy utworzono i scharakteryzowano sferoidy pochodzące z pierwotnych komórek raka jajnika na obecność markerów CSCs (CD133, CD44, CD24). Zaobserwowano różnice w ekspresji badanych markerów CSCs pomiędzy sferoidami utworzonymi z komórek izolowanych z tkanki pooperacyjnej i płynu puchlinowego. W sferoidach pochodzących z tkanki pooperacyjnej ekspresja markera CD133 była niższa w porównaniu do sferoidów z płynu puchlinowego. Z drugiej strony poziom CD24 był wyższy w sferoidach z tkanki pooperacyjnej w odniesieniu do sferoidów z płynu puchlinowego. Natomiast marker CD44 był obecny na podobnym poziomie dla obu typów sferoidów. Wykazano wpływ HATMSC2-MVs na spadek przeżycia komórek tworzących sferoidy. W pracy pokazano również różnice w ekspresji analizowanych czynników regulujących apoptozę pomiędzy mikropęcherzykami HATMSC2-MVs a komórkami rodzicielskimi HATMSC2. Spośród 43 badanych czynników bioaktywnych 15 czynników

proapoptotycznych było obecnych na wyższym poziomie w HATMSC2-MVs (np. bad, BID, BIM, kaspaza 3, cytochrom c, TRAIL-R1 i TRAIL-R2) niż w komórkach rodzicielskich HATMSC2.

W trzeciej pracy (*IJMS 2024, 25(10):5384*) porównano fenotyp oraz właściwości biologiczne komórek pierwotnych z płynu puchlinowego (OvCa3 A i OvCa7 A) i pochodzących z nich unieśmiertelnionych linii komórkowych OvCa3 A hTERT i OvCa7 A hTERT. Analiza fenotypu z wykorzystaniem cytometrii przepływowej i obrazowania mikroskopowego wykazała różnice w ekspresji markerów komórek nowotworowych (Pax8, p53), pochodzenia nabłonkowego (CA-125, cytokeratyna 8), fenotypu MSCs (CD73, CD90, CD105), CSCs (CD133, CD24, c-kit), CAFs (PDGFRa, FAP), EMT (Snail, wimentyna) oraz markerów komórek hematopoetycznych (CD34, CD45) i odpowiedzialnych za utrzymanie pluripotencji (Oct4, Sox2, Nanog), pomiędzy komórkami pierwotnymi a otrzymanymi z nich unieśmiertelnionymi liniami. Istotną jest obserwacja, że większość komórek OvCa7 A hTERT ma cechy CSCs z ekspresją CD133+ i była dodatnia pod względem obecności markerów Pax8, p53, CA-125, cytokeratyny 8. Z kolei linia komórkowa OvCa3 A hTERT nie ma ekspresji CD133 i wyróżnia się obecnością markera CD73, wyższą ekspresją CD105 oraz niższą ekspresją c-kit w odniesieniu do OvCa7 A hTERT)

Otrzymane linie komórkowe wykazywały ekspresję transkryptów odpowiedzialnych za utrzymanie pluripotencji (Oct4, Sox2) i protoonkogennych (p53, p21 i c-myc) na różnym poziomie ekspresji co analizowano za pomocą metody RT-PCR w czasie rzeczywistym. W testach funkcjonalnych wykazano, że aktywność metaboliczna (test MTT) oraz aktywność migracyjna (test zarastania rasy) była wyższa w obu unieśmiertelnionych liniach komórkowych, OvCa3 A hTERT i OvCa7 A hTERT, w porównaniu do komórek pierwotnych. Aktywność dehydrogenazy aldehydowej 1 (ALDH1) była niższa w komórkach pierwotnych w porównaniu do odpowiednich linii unieśmiertelnionych. Ponadto, aktywność ALDH1 w komórkach OvCa7 A hTERT była ponad 3-krotnie wyższa w porównaniu z komórkami OvCa3 A hTERT. Aby ocenić obecność CSCs w powstałych sferoidach analizowano ekspresję markerów CD133, CD44 za pomocą cytometrii przepływowej. W sferoidach z komórek OvCa3 A i OvCa3 A hTERT nie stwierdzono obecności komórek CD133. Dla sferoidów utworzonych z komórek OvCa7 A hTERT populacja komórek CD133-pozytywna była większa w porównaniu do komórek pierwotnych OvCa7 A (12% vs. 2%). Nie stwierdzono różnic w ekspresji markera CD44 dla sferoidów utworzonych z komórek pierwotnych i unieśmiertelnionych.

Badania wykonane w ramach rozprawy doktorskiej wykazały, że traktowanie komórek linii raka jajnika ES-2 i OAW-42 przez HATMSC2-MVs prowadzi do spadku aktywności proliferacyjnej, indukuje śmierć komórek na drodze apoptozy i/lub nekrozy oraz zwiększa wydzielanie czynników przeciwnowotworowych a zmniejsza wydzielanie czynników promujących nowotwór. Wyniki uzyskane na liniach komórkowych zostały potwierdzone w badaniach pierwotnych komórek raka jajnika pozyskanych z tkanki pooperacyjnej i płynu puchlinowego, gdzie zaobserwowano spadek aktywności metabolicznej, obniżenie przeżycia komórek, indukcję apoptozy i/lub nekrozy w modelu 2D oraz spadek przeżycia komórek w modelu 3D po traktowaniu HATMSC2-MVs. Wykazano również obecność populacji komórek z ekspresją markerów CSCs (CD133, CD24, CD44, c-kit (CD117) i ALDH1) oraz markerów odpowiedzialnych za utrzymanie pluripotencji (Oct4, Sox2, Nanog) w pierwotnych komórkach raka jajnika izolowanych z tkanki pooperacyjnej i płynu puchlinowego. W ostatnim etapie badań wykazano, że plazmid niosący gen hTERT może być wykorzystany do unieśmiertelnienia pierwotnych komórek raka jajnika. Otrzymana unieśmiertelniąca linia komórkowa OvCa7 A hTERT CD133-pozytywna, z ekspresją markerów Pax8 i p53 oraz wysoką aktywnością ALDH1 może być użytecznym narzędziem w badaniach nad biologią CSCs i opracowaniem nowych strategii terapeutycznych ukierunkowanych na CSCs.