

Streszczenie pracy doktorskiej

Adrianna Dudek

„Indukowanie różnicowania monocytów do makrofagów czynnikami wydzielanymi przez komórki raka jelita grubego”

W organizmie nowotwór rozwija się w mikrośrodowisku, które jest tworzone zarówno przez komórki nowotworowe, jak i prawidłowe. Stanowią one swoistą niszę, która umożliwia komórkom nowotworowym dwa ważne dla nich procesy: ucieczkę komórek nowotworowych spod nadzoru układu immunologicznego i powstanie nowych naczyń krwionośnych i limfatycznych.

W trakcie rozwoju choroby nowotworowej, znajdujące się w krwiobiegu i tkankach monocyty i makrofagi są aktywnie rekrutowane do mikrośrodowiska guza. Tam, w zależności od różnych sygnałów mikrośrodowiska, uzyskanych z komórek nowotworu i zrębu, fenotyp makrofagów może ulec zmianie i spowodować przekształcenie ich z formy przeciwnowotworowej, prozapalnej (M1) do formy immunosupresyjnej, promującej rozwój i progresję nowotworu (M2).

Mianem makrofagów związanych z nowotworem (TAMs) określane są makrofagi charakterystyczne dla mikrośrodowiska nowotworowego. Jest to heterogenna populacja komórek, które różnią się od siebie na poziomie molekularnym i funkcjonalnym, zależnie od lokalnego mikrośrodowiska. W początkowym etapie rozwoju nowotworu TAMs posiadają fenotyp M1 i mają działanie przeciwnowotworowe. Pod wpływem czynników wydzielanych przez komórki nowotworowe, mogą przekształcać się w pronowotworowe, immunosupresyjne komórki o fenotypie M2. TAMs posiadają charakterystyczne dla tej grupy komórek markery, a także wytwarzają metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej, cytokiny, chemokiny oraz białka szoku cieplnego.

Większość badań sugeruje, iż akumulacja makrofagów związanych z nowotworem wiąże się ze złymi rokowaniami dla pacjenta, jednakże w przypadku raka jelita grubego informacje te są niejednoznaczne i często sprzeczne, a więc wymagają bardziej szczegółowych badań i analizy.

Zatem celem niniejszej pracy było zbadanie, w jaki sposób czynniki wydzielane przez komórki raka jelita grubego wpływają na różnicowanie monocytów do makrofagów poprzez określenie, czy nowotwór ten powoduje różnicowanie makrofagów do prozapalnej i

przeciwnowotworowej populacji M1, czy supresyjnej i pronowotworowej M2, oraz określenie, czy stadium nowotworu wpływa na różnicowanie makrofagów.

W badaniach wykorzystano następujące linie komórkowe: HT29, LS180, SW948 i SW620. Reprezentowały one cztery kolejne stadia raka jelita grubego. Jako kontrolę zastosowano linię HSF, wyprowadzoną z ludzkich fibroblastów skóry. Podłoża pochodowlane (CM, conditioned media) z tych linii stanowiły model mikrośrodowiska nowotworu. Jako model ludzkich monocytów przyjęto linię białaczkową THP-1, a preaktywowane za pomocą PMA stanowiły model makrofagów spoczynkowych.

W pierwszym etapie badań za pomocą cytometrii przepływowej sprawdzono wpływ podłoży pochodowlanych (CM) na żywotność (barwienie jodkiem propidyny), produkcję wolnych rodników (barwienie DCF) oraz obecność podstawowych markerów powierzchniowych w monocytach i makrofagach w zależności od czasu kontaktu produktów nowotworu z tymi komórkami. Do dalszych eksperymentów wybrano czas 72 godzin. Następnie przeprowadzono ocenę zdolności do hamowania proliferacji linii THP-1 i makrofagów testem wykorzystującym aktywność dehydrogenazy bursztynianowej (MTT) i inkorporacji analogu tymidyny do nowo syntezowanego DNA (BrdU). Bazując na tych wynikach, przebadano także wpływ CM na modulację cyklu komórkowego monocytów za pomocą barwienia PI/RNase i cytometrii przepływowej. Zmiany morfologii komórek makrofagów pod wpływem podłoży pochodowlanych określono przy pomocy barwienia May-Grünwalda – Giemsy. W kolejnym etapie sprawdzono wpływ dawki podłoży pochodowlanych na monocyty i makrofagi. Za pomocą cytometrii przepływowej przeprowadzono badanie żywotności, produkcji wolnych rodników i ekspresji charakterystycznych markerów powierzchniowych i wewnątrzkomórkowych (CD11b, CD163, CD206, CD14, CD204, B7H1, CD40, HLA-DR, IDO, CD68) na monocytach i makrofagach. Następną wykorzystaną w doświadczeniach metodą był test ELISA, dzięki któremu określono poziom cytokin produkowanych przez monocyty lub makrofagi (VEGF, IL-10 i IL-6). Za pomocą metody qRT-PCR, zbadano wpływ podłoży pochodowlanych na ekspresję, w monocytach i makrofagach, genów (*iNOS*, *ARG1*, *IDO1*, *LGALS3* i *LGALS9*) kodujących białka zaangażowane w rozwój nowotworu i przerzutowanie. W ostatnim etapie badań bezpośredni wpływ CM na produkcję białek związanych z metastazą (galektyny 3 i galektyny 9) oraz metaloproteinaz (MMP-9) określono za pomocą, odpowiednio, metody Western Blotting oraz zymografii żelatynowej.

Na podstawie powyższych badań stwierdzono, że nowotworowe podłoża pochodowlane powodują przyspieszenie różnicowania monocytów do makrofagów, powodują

obniżenie ich proliferacji i zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G₁. CM indukują także w monocytach i makrofagach produkcję wolnych rodników oraz ekspresję markerów charakterystycznych dla subpopulacji M1 i M2 makrofagów. Wzrasta również ekspresja genów kodujących białka biorące udział w nowotworzeniu, a także stężenie produkowanych przez makrofagi cytokin, białek uczestniczących w metastazie (galektyny) oraz metaloproteinaz.

W większości doświadczeń wszystkie linie wykazały silny wpływ na monocyty i makrofagi, z wyjątkiem najsilniejszego wpływu linii HT29 na żywotność oraz ekspresję markerów, a także przerzutowej linii SW620 na ekspresję galektyn. Tak więc mikrośrodowisko nowotworu tworzy mieszanina komórek monocytów i makrofagów o różnych fenotypach: M1, M2 i TAM.

Uwzględniając otrzymane wyniki badań w modelu *in vitro*, można wskazać potencjalne drogi rozwoju nowych leków i strategii leczenia raka jelita grubego, polegające na zahamowaniu bądź odwróceniu przekształcania się monocytów oraz makrofagów prozapalnych w komórki promujące rozwój nowotworu.