

Justyna Plonka-Czerw

„Ekspresja metaloproteinaz (MMPs) i ich tkankowych inhibitorów (TIMPs) w komórkach nowotworowych gruczolu piersiowego oraz w prawidłowych komórkach mikrośrodowiska nowotworu po terapii fotodynamicznej *in vitro*”

STRESZCZENIE PRACY

Rak piersi jest najczęściej rozwijającym się nowotworem złośliwym u kobiet. Mimo znaczącego postępu jaki obserwuje się we wczesnej diagnostyce i leczeniu tego nowotworu, wciąż brakuje metod i schematów leczenia, które pozwoliłyby obniżyć wysoki wskaźnik umieralności jaki towarzyszy chorobie, jak również w znaczący sposób poprawiłyby jakość życia pacjentek. Stosowane obecnie schematy leczenia raka piersi uzależnione są od stopnia zaawansowania choroby. W wielu przypadkach jednak dostępne metody terapeutyczne okazują się nieskuteczne, a podjęte próby leczenia kończą się niepowodzeniem.

W ostatnich latach rozpatruje się możliwość wprowadzenia do leczenia raka piersi terapii fotodynamicznej (PDT) – metody, która przy odpowiednio dobranych parametrach reakcji zachodzącej z udziałem fotouczulacza, światła o odpowiedniej długości fali oraz tlenu w tkance poddanej zabiegowi, pozwala w selektywny sposób eliminować zmiany nowotworowe. Sugeruje się, że PDT mogłaby zostać włączona do leczenia raka piersi jako metoda uzupełniająca stosowane obecnie podstawowe metody leczenia, takie jak radykalne i oszczędzające zabiegi chirurgiczne, radioterapia, chemioterapia czy hormonoterapia, a nawet jako samodzielna metoda walki z transformowanymi komórkami.

Podczas opracowywania nowych terapii przeciwnowotworowych coraz więcej uwagi skupia się obecnie nie tylko na samych komórkach nowotworowych, ale również uwzględnia się rolę mikrośrodowiska nowotworu w progresji i rozprzestrzenianiu się choroby. Ponadto mikrośrodowisko nowotworowe rozpatrywane jest jako kluczowy czynnik decydujący o odpowiedzi na zastosowane leczenie. Na tej podstawie podjęto próbę odpowiedzi na pytanie czy zastosowanie subletalnych warunków PDT, wpływającej na komórki nowotworowe, ale również na komórki znajdujące się w ich najbliższym otoczeniu współtworzące mikrośrodowisko nowotworu, nie stymuluje dodatkowo ich inwazyjnego wzrostu i w efekcie nie przyczynia się do progresji choroby.

Przebieg kolejnych etapów postępującego procesu nowotworzenia zależy jest od aktywności enzymów proteolitycznych, w tym metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej

(MMPs) i ich tkankowych inhibitorów (TIMPs), odpowiedzialnych za reorganizację macierzy pozakomórkowej. Niejednokrotnie, u pacjentów z rakiem sutka, wykazano korelację pomiędzy podwyższoną aktywnością poszczególnych MMPs i TIMPs w tkance nowotworowej a rozmiarem guza pierwotnego piersi, inwazyjnym wzrostem nowotworu oraz obecnością odległych przerzutów, przez co wskazuje się na możliwość wykorzystania MMPs i TIMPs jako wskaźników służących ocenie stopnia zaawansowania choroby i efektywności stosowanej terapii.

Celem prezentowanej pracy była ocena wpływu subletalnych warunków PDT przeprowadzonej z fotouczulaczem - Fotolonem i dawkami promieniowania 2,5 J/cm², 5 J/cm² oraz 10 J/cm² na ekspresję wybranych MMPs i TIMPs w ustalonych liniach komórkowych inwazyjnego raka gruczołu piersiowego oraz w prawidłowych komórkach mikrośrodowiska nowotworu w warunkach *in vitro*. Badania przeprowadzono na trzech liniach komórkowych raka sutka MCF-7, T-47D, MDA-MB-231 oraz prawidłowych fibroblastach HFF-1. Komórki wybranych linii nowotworowych różnią się stopniem złośliwości.

Wpływ PDT na ekspresję genów: *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-9*, *MMP-13*, *MMP-14* oraz *TIMP-1*, *TIMP-2*, *TIMP-3* w komórkach oznaczano wykorzystując technikę RT-QPCR. Analiza ekspresji genów MMPs i TIMPs poprzedzona została oceną żywotności komórek raka sutka MCF-7, T-47D i MDA-MB-231 poddanych PDT z Fotolonem i dawkami promieniowania 2,5 J/cm², 5 J/cm² oraz 10 J/cm².

Ekspresję wybranych genów oznaczano, przed i po PDT, w hodowlach samych komórek nowotworowych, w kokulturach komórek nowotworowych z prawidłowymi fibroblastami oraz w prawidłowych fibroblastach stymulowanych pożywkami zebranymi z hodowli komórek nowotworowych poddanych wcześniej PDT.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że:

- Terapia fotodynamiczna, w przyjętych w pracy warunkach (Fotolon jako fotouczulacz, źródło światła: laser PDT-662 KrioTechnika medyczna, 500 mW, $\lambda=662$ nm w dawkach: 2,5 J/cm², 5 J/cm², 10 J/cm²) ogranicza żywotność komórek raka sutka linii MCF-7, T-47D i MDA-MB-231.
- Komórki raka sutka linii MDA-MB-231 o najwyższej inwazyjności cechuje wyższa (w stosunku do komórek raka sutka linii MCF-7 i T-47D) ekspresja *MMP-1*, *MMP-3*, *MMP-9*, *MMP-14* oraz *TIMP-1*, *TIMP-2*, *TIMP-3*.
- Zastosowanie, w warunkach *in vitro*, terapii fotodynamicznej powoduje zmiany ekspresji badanych MMPs i TIMPs w komórkach raka sutka linii MCF-7, T-47D

i MDA-MB-231, zależne od stopnia ich inwazyjności. Statystycznie istotne zmiany - zmniejszenie liczby transkryptów – dotyczą komórek raka sutka linii MDA-MB-231.

- W kokulturach badanych komórek raka sutka z prawidłowymi fibroblastami linii HFF-1, pozostających w bezpośrednim kontakcie z możliwością wzajemnych oddziaływań parakrynych, terapia fotodynamiczna powoduje obniżenie ekspresji genów kodujących MMPs i TIMPs.
- Ekspozycja prawidłowych fibroblastów na czynniki wydzielane przez komórki raka sutka powoduje zmiany liczby kopii mRNA oznaczanych metaloproteinaz i ich inhibitorów.
- Czynniki uwalniane do pożywki przez komórki nowotworowe poddawane zabiegowi terapii fotodynamicznej powodują w komórkach fibroblastów prawidłowych:
 - eksponowanych na czynniki uwalniane przez komórki raka sutka linii MCF-7 i T-47D – w większości przypadków nieistotny statystycznie wzrost ekspresji *MMPs*, którym towarzyszy wzrost ekspresji *TIMPs*,
 - eksponowanych na czynniki uwalniane przez komórki raka sutka linii MDA-MB-231 - wyraźne obniżenie ekspresji wszystkich badanych *MMPs* i *TIMPs*.
- Uzyskane wyniki sugerują, że PDT zastosowana w przypadku raka piersi nie stymuluje dodatkowo ich inwazyjnego wzrostu i w efekcie nie przyczynia się do progresji choroby

Słowa kluczowe: rak piersi, terapia fotodynamiczna (PDT), metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej

Justyna Plonka-Czerw

„Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in breast cancer cells and normal cells of the tumor microenvironment after *in vitro* photodynamic therapy”

SUMMARY

Breast cancer is the most common malignant tumour that affect women. In spite of significant progress in the early diagnosis and treatment of patients with breast cancer, still there is lack of treatment methods and procedures that could decrease high mortality rate of this illness as well as improve heavily the quality of life for patients. Actually applied treatment procedures depend on the stage of the illness. Though in many cases available therapeutic strategies appear to be ineffective and attempted treatment may result in failure.

In recent years the possibility of applying the photodynamic therapy (PDT) in breast cancer treatment is considered. In this method neoplastic changes can be selectively eliminated due to reaction mediated by using appropriately matched parameters through the interaction of photosensitizer, light of adequate wavelength and oxygen in the tissue undergoing PDT. It is suggested that PDT could serve as a complementary breast cancer therapeutic strategy to used nowadays basic treatment such as breast-conserving and radical surgery, radio- and chemotherapy or hormone therapy. It could be used also separate against transformed cells.

Seeking new antitumour therapies, the target is focused not only on cancer cells, but the role of the tumour microenvironment in disease progression and spreading is gaining more and more attention. Moreover, the tumour microenvironment is considered to be the key factor in treatment response. According to that, there is made an attempt to answer the question if sublethal PDT conditions that influence cancer cells as well as cells localised in the nearest neighborhood being part of the tumour microenvironment, can additionally stimulate their invasive growth and as result contribute to disease progression?

Subsequent staging of tumour progression depends on activity of proteolytic enzymes including extracellular matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) responsible for extracellular matrix reorganization. Correlation between increased activity of several MMPs and TIMPs in neoplastic tissue and size of primary breast tumour, neoplasm invasive growth and distant metastases was frequently demonstrated among patients with breast cancer. It is therefore presumed that MMPs and TIMPs could be exploited as factors that provide information on disease progression stage and effectivity of applied therapy.

The aim of presented study was the evaluation of the influence of sublethal PDT conditions with photosensitizer Photolon and irradiation doses at 2,5 J/cm², 5 J/cm² and 10 J/cm² on expression of chosen *MMPs* and *TIMPs* in established invasive breast cancer cell lines and in normal cells of the tumour microenvironment *in vitro*. Three breast cancer cell lines: MCF-7, T-47D, MDA-MB-231 and normal fibroblast cell line HFF-1 was exploited in the study. Chosen cell lines are different from each other in the level of malignancy.

The influence of PDT on *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-9*, *MMP-13*, *MMP-14* and *TIMP-1*, *TIMP-2*, *TIMP-3* gene expression in cells was assessed using RT-QPCR method. *MMPs* and *TIMPs* gene expression analysis was preceded by evaluation of viability of breast cancer MCF-7, T-47D and MDA-MB-231 cells after PDT with Photolon and irradiation doses at 2,5 J/cm², 5 J/cm² and 10 J/cm²

The expression of selected genes was assessed before and after PDT, in cancer cells cultures by itself, in cocultures of cancer cells and normal fibroblasts and in normal fibroblasts that were previously stimulated with medium obtained from cancer cells culture after PDT.

Performed study showed that:

- Applied photodynamic therapy conditions (Photolon as a photosensitizer, light source: PDT-662 laser KrioTechnika medyczna, 500 mW, $\lambda=662$ nm in doses at 2,5 J/cm², 5 J/cm², 10 J/cm²) reduced cell viability in breast cancer from MCF-7, T-47D and MDA-MB-231 cell lines
- MDA-MB-231 breast cancer cell line of the highest invasiveness showed greater expression of *MMP-1*, *MMP-3*, *MMP-9*, *MMP-14* and *TIMP-1*, *TIMP-2*, *TIMP-3* (in relation to MCF-7 and T-47D cell line)
- Photodynamic therapy *in vitro* influences expression of selected *MMPs* and *TIMPs* in MCF-7, T-47D and MDA-MB-231 breast cancer cell line, changes in *MMPs* and *TIMPs* expression are cell invasiveness- dependent. The decrease of transcript levels in MDA-MB-231 breast cancer cell line demonstrates the *statistical* significance.
- Photodynamic therapy in cocultures of breast cancer cells and HFF-1 normal fibroblasts being in direct contact with possibility of cell-cell paracrine interactions, resulted in expression decrease of genes coding for *MMPs* and *TIMPs*.
- The exposition of normal fibroblasts on agents that are excreting from breast cancer cells resulted in changes in amount of tested metalloproteinases and their inhibitors mRNA copies.
- Agents that are excreting from after PDT influences normal fibroblast cells as follows:

- after exposition on agents excreted from MCF-7 and T-47D breast cancer cells– in most cases statistical insignificant increase in *MMPs* expression, accompanied by insignificant increase of *TIMPs* expression,
- after exposition on agents excreted from MDA-MB-231 breast cancer cells- evident decrease in all tested *MMPs* and *TIMPs*. Expression.
- The results suggest that PDT applied in the case of breast cancer additionally does not stimulate the growth of invasive and consequently does not contribute to disease progression.

Keywords: breast cancer, photodynamic therapy (PDT), extracellular matrix metalloproteinases