

Abstracts  
Poster sessions

*Streszczenia*  
*Sesja plakatowa*

[68]

## mikroRNA i geny EMT jako biomarkery metastazy

Weronika Przybyła<sup>1</sup>, Tomasz Kolenda<sup>1,2</sup>, Anna Teresiak<sup>1</sup>, Renata Bliźniak<sup>1</sup>, Łukasz Łuczewski<sup>3</sup>, Mateusz Szewczyk<sup>3</sup>, Wojciech Golusiński<sup>3</sup>, Katarzyna Lamperska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cancer Genetics Laboratory, Greater Poland Cancer Centre, Poznan, Poland

<sup>2</sup>Postgraduate School of Molecular Medicine, Medical University of Warsaw, Poland

<sup>3</sup>Head and Neck Surgery Ward and Laryngological Oncology Clinic, Greater Poland Cancer Centre, Poznan, Poland

<sup>1</sup>Pracownia Genetyki Nowotworów, Wielkopolskie Centrum Onkologii, Poznań, Polska

<sup>2</sup>Studium Medycyny Molekularnej, Uniwersytet Medyczny w Warszawie, Polska

<sup>3</sup>Klinika Chirurgii Głowy, Szyi i Onkologii Laryngologicznej, Wielkopolskie Centrum Onkologii, Poznań, Polska

### Abstract

**Introduction:** Head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) are one of the worst prognosis cancers because of their propensity for metastasis. miRNAs pretend to be a good tool for personalisation treatment in HNSCC. In this study we investigated changes in miRNAs expression during epithelial to mesenchymal transition (EMT). It prompted us to define if the expression levels of examined miRNAs would be useful to predict tumour progression and possible metastasis, but also if their changes in expression have influence on EMT.

**Aim of the study:** Analysis of expression profiles of selected miRNAs in cancers cells and metastasis.

**Material and methods:** Ten samples were obtained from 5 patients (tumour and metastasis). Samples ( $n = 10$ ) were stained by H&E and total RNA was isolated from tumour cells. let-7d, 18a, 21, 181a, 205, 421, 504 miRNAs and EMT markers genes expression were examined using qRT-PCR method. Results were compared to tumour and embryonic stem cells (hESC).

**Results:** Changes of miRNAs expression were observed in each patient. We noticed similar tendency of miRNAs expression levels in tumour and lymph nodes metastasis. The miRNAs expression profile of one patient was significantly different from the others as well as high level of catherin and low level of vimentin were observed. In one patient high level of vimentin was observed.

**Conclusions:** Selected miRNAs and EMTs markers seems to be a good candidate as biomarkers of cancer progression. Expression of e-catherin is characteristic of epithelial cells which probably have no ability to metastasis, whereas expression of vimentin is feature of mesenchymal cells able to migration. Patient who reveals a high level of vimentin probably has more aggressive type of cancer. To obtain unequivocal results we should examine more patients and correlate expression profiles of examined genes with patient survival.

**Key words:** miRNA, EMT, biomarkers, cancer, HNSCC.

### Streszczenie

**Wstęp:** Nowotwory głowy i szyi (*head and neck squamous cell carcinomas* – HNSCC) są jednymi z najgorzej prognozujących, ze względu na duży potencjał przerzutowania. Z uwagi na udział miRNA w procesach nowotworzenia podjęto próbę zdefiniowania, czy poziomy ekspresji badanych miRNA umożliwią prognozowanie progresji nowotworu oraz czy zmiany w ich ekspresji mają wpływ na proces tranzycji epitelialno-mezenchymalnej (EMT).

**Cel pracy:** Analiza profili ekspresji wybranych miRNA w komórkach guza i przerzutowych HNSCC.

**Materiał i metody:** Analizowano 10 prób pochodzących od 5 pacjentów (guz i przerzut). Preparaty ( $n = 10$ ) wybarwiono H&E i z oznaczonych komórek nowotworowych wyizolowano całkowite RNA. Następnie zbadano ekspresję miRNA: let7d, 18a, 21, 181a, 205, 421, 504. Przeanalizowano ekspresję markerów procesu EMT (wimentyna, E-kadheryna, N-kadheryna, fibronektyna). Zastosowano technikę qRT-PCR. Kontrolę stanowiły komórki embrionalne (hESC).

**Wyniki:** U każdego z pacjentów zaobserwowano zmiany ekspresji badanych miRNA. Zaobserwowano podobny profil poziomów ekspresji miRNA w guzie i węzłach chłonnych. Jeden z pacjentów wykazał znaczące różnice w profilu ekspresji miRNA w stosunku do pozostałych, a także duże stężenie kadheryny i małe wimentyny. Tylko u jednego z pacjentów odnotowano wysoki poziom wimentyny.

**Wnioski:** Wybrane miRNA i markery EMT wydają się dobrymi kandydatami na biomarkery w prognozowaniu progresji nowotworu. Ekspresja E-kadheryny jest charakterystyczna dla komórek nabłonkowych, które nie posiadają zdolności do przerzutowania. Ekspresja wimentyny cechuje komórki mezenchymalne skłonne do migracji. Pacjenci wykazujący wysoki poziom wimentyny prawdopodobnie mają bardziej agresywny typ nowotworu. W celu potwierdzenia wstępnych wyników przewiduje się analizę większej grupy pacjentów i zbadanie korelacji między profilami ekspresji badanych genów a danymi klinicznymi i przeżywalnością pacjentów.

**Słowa kluczowe:** miRNA, EMT, biomarkery.

[69]

## The analysis of CDK1 protein in laryngeal squamous cell carcinoma

### *Analiza białka CDK1 w rozwoju płaskonabłonkowego raka krtani*

Kinga Bednarek<sup>1</sup>, Magdalena Bodnar<sup>2</sup>, Reidar Grenman<sup>3</sup>, Krzysztof Szyfter<sup>4,4</sup>, Andrzej Marszałek<sup>2,5</sup>, Małgorzata Jarmuż-Szymczak<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup>Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland

<sup>2</sup>Chair and Department of Clinical Pathomorphology, Ludwik Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University, Torun, Poland

<sup>3</sup>Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, University of Turku, Turku, Finland

<sup>4</sup>Chair of Phoniatics and Audiology, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland

<sup>5</sup>Department of Tumor Pathology, Greater Poland Cancer Centre, Poznan; Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland

<sup>6</sup>Chair of Hematology and Stem Cells Transplantation, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland

<sup>1</sup>*Instytut Genetyki Człowieka, Polska Akademia Nauk, Poznań, Polska*

<sup>2</sup>*Katedra i Zakład Patomorfologii Klinicznej, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń, Polska*

<sup>3</sup>*Klinika Otolaryngologii i Chirurgii Nowotworów Głowy i Szyi, Uniwersytet w Turku, Turku, Finlandia*

<sup>4</sup>*Katedra Foniatrii i Audiologii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, Polska*

<sup>5</sup>*Zakład Patologii Nowotworów, Wielkopolskie Centrum Onkologii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, Polska*

<sup>6</sup>*Katedra Hematologii i Transplantacji Szpiku, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, Polska*

#### Abstract

**Introduction:** Squamous cell carcinoma (SCC) of head and neck, including laryngeal cancer, still causes diagnostic and therapeutic problems. The difficulties in diagnosis results consequently in treatment delay and low 5-year survival.

**Aim of the study** was the analysis of CDK1 expression at its protein level in larynx squamous cell carcinoma.

**Material and methods:** The material for the study were the laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) cell lines derived from patient's tumors with different degrees of TNM classification and varying degrees of malignancy. Whole cell lysates from 25 cell lines were used for the Western Blot analysis and normal larynx tissue lysate was used as a control. Furthermore, for the evaluation of the localization of CDK1 the immunohistochemical studies were performed on the archive formalin fixed paraffin embedded tissue sections, containing laryngeal squamous cell carcinoma. Twenty samples of primary LSCC with lymph nodes metastases, 20 samples without lymph nodes metastases and 18 samples of larynx normal mucosa were used. The expression of analyzed protein was performed using automated morphometric methods.

**Results:** The increased of CDK1 protein level in all analyzed LSCC cell lines in the relation to the total non-cancer larynx lysate was shown by Western Blot. Furthermore, the CDK1 expression was found in 100% (40/40) cases of primary LSCC, and in all cases of normal mucosa. The expression of CDK1 was higher in patients with lymph node metastases compared with the patients without lymph node metastases. Also, the expression of CDK1 in normal mucosa was mainly cytoplasmic, therefore – inactive.

**Conclusions:** CDK1 protein is present in both cancer and non-cancer larynx tissue. However, as CDK1 protein is associated with cell proliferation, its level is higher in highly proliferating tumor cells.

**Key words:** CDK1, Western Blot, immunohistochemistry, laryngeal cancer.

#### Streszczenie

**Wstęp:** Płaskonabłonkowe nowotwory głowy i szyi (LSCC), w tym rak krtani, to istotny problem medyczny w Polsce. Utrudniona diagnostyka i w konsekwencji późno wprowadzane leczenie skutkuje niskim współczynnikiem 5-letnich przeżyć.

**Cel pracy:** Analiza ekspresji białka CDK1 (*cyclin-dependent kinase 1*) w rozwoju raka krtani.

**Materiał i metody:** Materiał do badań stanowiły linie komórkowe płaskonabłonkowego raka krtani, wyprowadzone od pacjentów w różnym stadium zaawansowania choroby. Z 25 linii komórkowych przygotowano lizaty białkowe, których użyto do analizy Western Blot (WB), wykorzystując jako kontrolę lizat z prawidłowej tkanki krtani. W celu potwierdzenia lokalizacji białka CDK1 wykonano analizę immunohistochemiczną, z wykorzystaniem archiwalnego materiału tkanekowego w postaci bloczków parafinowych. Grupę badaną stanowiło po 20 przypadków LSCC z przerzutami do węzłów chłonnych oraz bez przerzutów. Materiał kontrolny stanowiło 18 skrawków z obszaru prawidłowej błony śluzowej krtani. Analizę przeprowadzono z użyciem zautomatyzowanych metod morfometrycznych.

**Wyniki:** Metodą WB wykazano znacznie zwiększone stężenie białka CDK1 we wszystkich analizowanych liniach komórkowych w stosunku do prawidłowej krtani. Ponadto wykazano obecność białka CDK1 we wszystkich analizowanych skrawkach parafinowych, pochodzących zarówno z guzów pierwotnych jak i kontrolnych. Poziom białka CDK1 był wyższy u pacjentów z przerzutami do węzłów chłonnych w porównaniu z grupą pacjentów z nowotworem niedającym przerzutów. Zaobserwowano dominację nieaktywnej (cytoplazmatycznej) formy białka CDK1 w skrawkach kontrolnych.

**Wnioski:** Białko CDK1 obecne jest zarówno w tkance krtani zmienionej i niezmienionej nowotworowo. Funkcja białka CDK1 związana jest z proliferacją komórek, stąd jego podwyższony poziom można wiązać z rozrostem komórek nowotworowych.

**Słowa kluczowe:** CDK1, Western Blot, immunohistochemia, rak krtani.

[70]

## Wpływ zakażenia wirusem Epsteina-Barr na apoptozę limfocytów krwi obwodowej u chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową

Karolina Olszewska-Bożek, Monika Pieczykolan, Justyna Woś, Agnieszka Bojarska-Junak, Jacek Roliński

Chair and Department of Clinical Immunology, Medical University in Lublin, Poland  
Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Polska

### Abstract

**Introduction:** Viruses possess the ability of activation and inhibition of the apoptosis in host cells by the influence on the cellular pathways which mediate and regulate this process. Several viruses associated with oncogenic transformation have adopted strategies for blocking apoptosis, that's why it plays important role in carcinogenesis. Understanding the mechanisms by which viruses regulate apoptosis may lead to the development of new therapy for infectious diseases and cancers.

**Aim of the study** was to estimate the influence of EBV infection on the apoptosis of peripheral blood B and T lymphocytes in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL).

**Material and methods:** The study material was peripheral blood (PB) taken from 45 untreated patients with CLL. The level of the Bax and Bcl-2 expression in B lymphocytes CD19+, T cells: CD3+CD4+ and CD3+CD8+ was analyzed by flow cytometry method. The presence of the EBV DNA in PB mononuclear cells was defined by using of Real-Time PCR.

**Results:** In 22 patients (48.89%) the presence of genetic material of EBV was noticed. The study showed the higher Bcl-2/Bax ratio in CD19+ cells in this group of patients in comparison to those without viral DNA load (median: 2.08, median: 1.20;  $p = 0.0054$ , respectively). Furthermore, in CD3+CD8+ cells a significantly higher Bcl-2/Bax ratio was noticed in EBV-positive patients comparing to the group of EBV-negative patients (median: 2.85, median: 1.62,  $p = 0.03$  respectively).

**Conclusions:** The study suggests, that the presence of the EBV DNA may be involved in the disturbances of the apoptotic pathways of leukemia cells observed in CLL. This relation seems to be particularly connected with the later stages of the apoptosis of B and T CD8+ lymphocytes.

**Key words:** apoptosis, viruses, chronic lymphocytic leukemia.

### Streszczenie

**Wstęp:** Wirusy posiadają zdolność zarówno indukcji, jak i hamowania apoptozy w komórkach gospodarza poprzez wpływ na szlaki komórkowe, które pośredniczą i regulują ten proces. Znaczna część wirusów, związana z transformacją nowotworową, przyjęła strategię blokowania apoptozy, przez co odgrywa znaczącą rolę w procesie nowotworzenia. Zrozumienie mechanizmów, za pomocą których wirusy regulują apoptozę, może się przyczynić do rozwoju nowych terapii w przypadku chorób zakaźnych i nowotworów.

**Cel pracy:** Ocena wpływu zakażenia wirusem Epsteina-Barr (EBV) na apoptozę limfocytów B i T w krwi obwodowej chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową.

**Materiał i metody:** Materiał do badań stanowiła krew obwodowa pozyskana od 45 nieleczonych chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową. Poziom ekspresji białek Bax i Bcl-2 w limfocytach B – CD19+ oraz T – CD3+CD4+, T – CD3+CD8+ został oznaczony przy użyciu cytometrii przepływową. Obecność DNA wirusa EBV w komórkach mononuklearnych została określona za pomocą real-time PCR.

**Wyniki:** W grupie badanej u 22 osób (48,89%) stwierdzono obecność materiału genetycznego EBV. Przeprowadzone badania wykazały istotnie wyższy stosunek Bcl-2/Bax w komórkach CD19+ w tej grupie osób w porównaniu z osobami bez obecności DNA wirusowego (odpowiednio mediana 2,08, mediana 1,20,  $p = 0,0054$ ). Ponadto w komórkach CD3+CD8+ odnotowano istotnie wyższy stosunek Bcl-2/Bax u chorych z wirusem w odniesieniu do grupy chorych bez wirusa (odpowiednio mediana 2,85, mediana 1,62,  $p = 0,03$ ).

**Wnioski:** Przeprowadzone badania sugerują, że obecność DNA wirusa EBV może mieć wpływ na zaburzenia apoptozy komórek białaczkowych obserwowane w przewlekłej białaczce limfocytowej, zwłaszcza na przebieg późniejszych etapów apoptozy limfocytów B CD19+ oraz komórek T CD3+CD8+.

**Słowa kluczowe:** apoptoza, wirusy, przewlekła białaczka limfocytowa.

[71]

## Oparta o nanocząstki złota i powierzchniowy rezonans plazmonowy detekcja miRNA-210

Karol Tuśnio<sup>1</sup>, Roberta D'Agata<sup>2</sup>, Alex Manicardi<sup>3</sup>, Roberto Corradini<sup>3</sup>, Giuseppe Spoto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>NanoBioMedical Center, Poznan, Poland

<sup>2</sup>Department of Chemical Science, University of Catania, Catania, Italy

<sup>3</sup>Chemistry Department, University of Parma, Parma, Italy

<sup>1</sup>NanoBioMedical Center, Poznań, Poland

<sup>2</sup>Wydział Nauk Chemicznych, Uniwersytet w Katanii, Catania, Włochy

<sup>3</sup>Wydział Chemii, Uniwersytet w Parmie, Parma, Włochy

### Abstract

**Introduction:** MicroRNAs (miRNA) are short single stranded molecules which control genes expression by degradation of mRNA or by inhibition of translation. The Role of miRNA in many pathological states makes them a potential candidates for biomarkers. Despite many research results that sustain the correlation between the changes of expression of miRNA and the progress of pathological state, there are many challenges that have to be overcome for the development of method for miRNA detection. The most characteristic feature of miRNA is their short length and high sequence similarity. Those factors may cause many problems in hybridization based detection methods.

**Aim of the study:** The main goal of this work was to set up a new methods for miRNA detection sensitive and reliable.

**Material and methods:** Surface plasmon resonance (SPR) based diagnostic methods are characterized by short time needed for obtaining an result, are sensitive, and don't require labeling of molecules. In this work we present a new method for detection based on SPR in which after the hybridization of miRNA on the sensor surface with the PNA probe the 3' and 5' ends of miRNA are enzymatically and chemically modified with the use of poly(A) tail or biotin. After the functionalization of miRNA the detection stage is carried out by gold nanoparticles functionalized with poly(T) or streptavidin.

**Results:** The analysis shows that the use of gold nanoparticles that enhance the SPR signal and specific PNA probes, it is possible to detect miRNA in subnanomolar concentrations.

**Conclusions:** The results show that the sensitivity and versatility of this method of detection can be used for the development of diagnostic methods that don't require amplification of genetic material.

**Key words:** surface plasmon resonance, miRNA, gold nanoparticles.

### Streszczenie

**Wstęp:** MikroRNA (miRNA) są niekodującymi jednoniciowymi molekułami RNA, które kontrolują ekspresję genów poprzez degradowanie mRNA lub przez inhibicję translacji. Funkcja, którą spełniają miRNA w wielu stanach patologicznych, powoduje, że mogą być wykorzystane jako biomarkery. Pomimo wielu doniesień naukowych potwierdzających korelację pomiędzy zmianami w ekspresji miRNA a rozwojem stanu chorobowego nadal istnieje wiele technicznych problemów, które należy pokonać w celu opracowania odpowiedniej metody dla detekcji miRNA. Charakterystyczną cechą miRNA są ich krótkie sekwencje o wysokim stopniu podobieństwa, z czego wynikają problemy w metodach detekcji opartych na hybrydyzacji.

**Cel pracy:** Opracowanie nowych metod detekcji miRNA o wyższej czułości i niezawodności.

**Materiał i metody:** Metody diagnostyczne oparte na powierzchniowym rezonansie plazmonowym (SPR) cechują się krótkim czasem potrzebnym na uzyskanie wyniku, są czułe i nie wymagają znakowania badanych molekuł. W poniższej pracy prezentujemy nową metodę detekcji opartą o SPR, w której po hybrydyzacji miRNA na powierzchni sensora z sondą PNA, końce 3' lub 5' końce miRNA są enzymatycznie lub chemicznie modyfikowane za pośrednictwem ogona poly(A) lub biotyny. Po etapie funkcjonalizacji końców miRNA następuje etap detekcji za pośrednictwem funkcjonalizowanych za pomocą poly(T) lub streptawidyny nanocząstek złota.

**Wyniki:** Przeprowadzona analiza wykazała, że przy zastosowaniu wzmacniających sygnał SPR nanocząstek złota oraz specyficznej sondy PNA możliwe jest wykrycie miRNA w stężeniach nanomolarnych.

**Wnioski:** Rezultaty pokazują, że czułość i wszechstronność metody detekcji może być idealna dla rozwoju metod diagnostycznych niewymagających amplifikacji materiału genetycznego.

**Słowa kluczowe:** miRNA, nanocząstki złota, powierzchniowy rezonans plazmonowy.

[72]

## Rola sulfotransferazy (CST) i sulfatydu w progresji raka gruczołu piersiowego

Jarostaw Suchański<sup>1</sup>, Piotr Dziegieł<sup>2</sup>, Maciej Ugorski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Wrocław, Poland

<sup>2</sup>Wrocław Medical University, Wrocław, Poland

<sup>1</sup>Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Polska

<sup>2</sup>Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich, Wrocław, Polska

### Abstract

**Introduction:** Tumor cells have the ability to aggregate platelets which correlates with their metastatic potential. Interactions between circulating tumor cells and platelets protect tumor cells from physical stressors and immune system response. Aggregation also increases the chance of metastasis by facilitating the adhesion of tumor cell aggregates to vascular endothelium. One of the platelet surface molecules involved in aggregation is P-selectin, which is translocated from intracellular granules to the external membrane after platelet activation. In case of murine MC-38 colon carcinoma cells, sulfated galactosylcerebroside (SM4, sulfatide) was found to be P-selectin ligand on, and its involvement in formation of metastases was shown using mice model.

**Aim of the study:** The role of sulfatide in breast cancer progression.

**Material and methods:** The interactions of control MDA-MB-231 cells (MDA/PURO) and MDA/PURO/CST cells with high expression of sulfatide, obtained by stable expression of human galactose-3-O-sulfotransferase (GAL3ST1) cDNA in breast cancer MDA-MB-231 cells, with CHO cells expressing P- or E-selectin were analyzed using laminar flow. The ability of MDA/PURO cells MDA/PURO/CST cells to induce platelet activation and subsequently aggregation was studied using aggregation assay.

**Results:** It was found that the presence of sulfatide on the surface of breast cancer MDA-MB-231 cells allow them to adhere to P-selectin-carrying cells, and not to E-selectin-carrying cells, under shear flow. The sulfatide was also involved in formation of aggregates between platelets and breast cancer cells.

**Conclusions:** Our data suggest that sulfatide present on the surface of breast cancer cells can be a ligand for P-selectin present on the surface of endothelial cells and platelets.

**Key words:** tumor progression, sulfatide, platelets, breast cancer.

### Streszczenie

**Wstęp:** Zdolność komórek nowotworowych do agregacji płytek krwi koreluje z ich potencjałem przerzutującym. Interakcje między komórkami nowotworowymi a płytkami krwi pełnią funkcję w ochronie komórek nowotworowych przed czynnikami stresu fizycznego, przed rozpoznaniem ich przez układ odpornościowy, a także ułatwiają adhezję agregatów komórek nowotworowych z płytkami krwi do śródbłonnka naczyńowego. W agregacji płytek krwi kluczową rolę odgrywa selektyna P, która po aktywacji przemieszcza się z ziarnistości  $\alpha$  na powierzchnię błony komórkowej. W przypadku mysich komórek MC-38 raka okrężnicy ligandem dla selektyny P jest sulfatyd, który wpływa na potencjał przerzutujący tych komórek. Wskazują na to badania *in vivo* przeprowadzone na modelu mysim.

**Cel pracy:** Określenie roli sulfotransferazy i sulfatydu w progresji raka piersi.

**Materiał i metody:** Do badania oddziaływań pomiędzy ludzkimi komórkami raka piersi MDA-MB-231 z nadekspresją CST i sulfatydu (MDA/PURO/CST) oraz kontrolnymi komórkami MDA-MB-231 (MDA/PURO) wykorzystano test adhezyjny w warunkach laminarnego przepływu cieczy. Tworzenie agregatów przez komórki MDA/PURO/CST lub MDA/PURO z płytkami krwi analizowano poprzez pomiar zmętnienia zawiesiny komórek.

**Wyniki:** Ludzkie komórki MDA-MB-231 raka piersi z nadekspresją CST i sulfatydu (MDA/PURO/CST) oddziałują w warunkach laminarnego przepływu cieczy jedynie z komórkami CHO ekspresjonującymi selektynę P. Kontrolne komórki MDA-MB-231 (MDA/PURO) nie wiążą się do komórek z ekspresją selektyny P, jak również selektyny E. Stwierdzono też, że sulfatyd bierze udział w aktywacji płytek krwi, a w konsekwencji do tworzenia agregatów komórek nowotworowych z płytkami krwi.

**Wnioski:** Sulfatyd obecny na komórkach raka piersi w wyniku oddziaływania z selektyną P umożliwia ich adhezję do komórek śródbłonnka i bierze udział w tworzeniu agregatów z płytkami krwi.

**Słowa kluczowe:** progresja nowotworowa, sulfatyd, płytki krwi, rak piersi.

[73]

## Cell-penetrating peptides as nanocarriers for drug/gene delivery into living human cells

Łucja Przysiecka<sup>1</sup>, Alicja Warowicka<sup>1</sup>, Jacek Gapiński<sup>1,2</sup>, Anna Goździcka-Józefiak<sup>1,3</sup>, Stefan Jurga<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>NanoBioMedical Centre, Adam Mickiewicz University, Poznan, Poland

<sup>2</sup>Department of Biophysics, Faculty of Physics, Adam Mickiewicz University, Poznan, Poland

<sup>3</sup>Department of Molecular Virology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University, Poznan, Poland

<sup>4</sup>Department of Macromolecular Physics, Faculty of Physics, Adam Mickiewicz University, Poznan, Poland

<sup>1</sup>Centrum NanoBioMedyczne, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań, Polska

<sup>2</sup>Zakład Biofizyki, Wydział Fizyki, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań, Polska

<sup>3</sup>Zakład Wirusologii Molekularnej, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań, Polska

<sup>4</sup>Zakład Fizyki Makromolekularnej, Wydział Fizyki, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań, Polska

### Abstract

**Introduction:** Cell-penetrating peptides are short, positively charged (at neutral pH) peptides possessing the ability to penetrate into the cell. This property, combined with formation of complexes with other molecules, allows to use them as transporters crossing the biological membrane barrier. By means of covalent or electrostatic interactions cell-penetrating peptides bind to molecules, whose transport without their participation would be impossible or at low efficiency. Aim of the study was comparison of the two CPP peptides, C6M1 and HR9 as intracellular transporters.

**Material and methods:** Materials were two peptides HR9 and C6M1, as well as the same peptides FITC-labeled. Experiments were performed on two cell lines: HeLa and Hek 293. Plasmids encoding green fluorescent protein (GFP) were used. Complexes of molecules with the appropriate CPP were formed using electrostatic interactions. The cells which have been introduced into peptides or peptide/plasmid complexes was evaluated by the rate of cell membrane transport, intracellular localization, cytotoxicity and cell viability.

**Results:** Peptides HR9 and C6M1 were localized in the cytoplasm, mainly close to nuclear membrane. Cytotoxicity analysis showed no negative impact on cells. Plasmids encoding GFP protein were introduced into cell by both peptides and expressed, what proves the effectiveness of these CPPs as carriers of active biomolecules. HR9 peptide was more efficient in DNA transport.

**Conclusions:** Understanding the effect of introduced compounds on cell, their intracellular localization and the ability to transport functional molecules is essential in order to exploit and develop the proposed system for therapy and medical diagnostics.

**Key words:** CPP, carrier, bioimaging, cell lines, GFP.

### Streszczenie

**Wstęp:** Peptydy penetrujące komórkę (*cell penetrating peptide* – CPP) to krótkie naładowane dodatnio (w obojętnym pH) peptydy wykazujące zdolność przenikania do wnętrza komórki. Właściwość ta w przypadku tworzenia kompleksów z innymi molekułami umożliwia wykorzystanie ich jako przenośników pokonujących barierę błony biologicznej. Są one bowiem w stanie łączyć się wiązaniami kowalencyjnymi lub oddziaływaniami elektrostatycznymi z cząsteczką, której transport bez ich udziału byłby niemożliwy lub nisko wydajny.

**Cel pracy:** Porównanie 2 peptydów CPP: C6M1 oraz HR9, jako transporterów wewnątrzkomórkowych.

**Materiał i metody:** Zastosowano dwa peptydy HR9 oraz C6M1 znakowane również fluorochromem FITC. Eksperymenty prowadzono na dwóch liniach komórkowych HeLa i Hek 293. Do badań wykorzystano plazmidy kodujące białko GFP. Kompleksy peptydów CPP/plazmid utworzono za pomocą oddziaływań elektrostatycznych. Po wprowadzeniu peptydów oraz kompleksów oceniano szybkość transportu przez błonę komórkową, lokalizację w komórce oraz cytotoksyczność i przeżywalność linii komórkowych.

**Wyniki:** Zarówno peptyd HR9, jak i C6M1 lokalizowały się w cytoplazmie, głównie przy błonie jądrowej. Analizy cytotoksyczności nie wykazały negatywnego wpływu na komórki. Wprowadzone za pomocą peptydów CPP plazmidy kodujące białko GFP (*green fluorescent protein*) ulegały ekspresji, co świadczy o efektywności peptydów jako transporterów aktywnych biomolekuł. Peptyd HR9 był bardziej wydajny w transporcie DNA.

**Wnioski:** Poznanie wpływu wprowadzonych związków na komórkę, ich wewnątrzkomórkowa lokalizacja oraz zdolność transportu funkcjonalnych molekuł jest niezbędnym elementem w celu wykorzystania i rozwijania proponowanych układów w terapii i diagnostyce medycznej.

**Słowa kluczowe:** CPP, nośnik, bioobrazowanie, linie komórkowe, GFP.

[74]

## Enhanced expression of CYP24A1 in nevi and early-stage skin melanomas

### Zwiększona ekspresja CYP24A1 w znamionach i czerniakach we wczesnych stadiach zaawansowania

Anna A. Brożyna, Wojciech Józwicki, Cezary Jochymowski

Department of Tumor Pathology and Pathomorphology, Oncology Centre – Prof. Franciszek Łukaszczyk Memorial Hospital, Bydgoszcz, Poland

Ludwik Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University, Torun, Poland

Zakład Patologii Nowotworów i Patomorfologii, Centrum Onkologii im. F. Łukaszczyka, Bydgoszcz, Polska  
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń, Polska

#### Abstract

**Introduction:** Mitochondrial 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> 24-hydroxylase (CYP24A1), an enzyme belonging to cytochrome p450 family, deactivates active vitamin D<sub>3</sub> through its metabolism starting by hydroxylation at C24. Our previous study revealed that in melanomas other elements of vitamin D<sub>3</sub> endocrine system, vitamin D receptor (VDR) and 1 $\alpha$ -hydroxylase (CYP27B1), is deregulated and negatively correlated with progression of skin melanoma, its aggressiveness and overall or disease free survivals.

**Aim of the study:** We analyzed the expression of CYP24A1 in melanocytic lesions.

**Material and methods:** CYP24A1 were detected using immunohistochemistry in 6 normal skins, 15 benign melanocytic nevi, 58 melanomas and 25 metastases obtained from 67 patients.

**Results:** In skin melanocytic lesions the expression of CYP24A1 was increased when compared to normal epidermis. The highest mean CYP24A1 immunostaining was observed in nevi and melanomas at stage I–II and pT1–2 and this differences were statistically significant when compared to normal skin and melanomas at advanced stages (stages III–IV, pT3–4). In nevi, the high CYP24A1 immunostaining was observed most often but the mean CYP24A1 expression in nevi and early-stage melanomas was comparable. The level of CYP24A1 in nevi and early stage melanomas was also significantly higher than in metastases. Furthermore, the CYP24A1 expression positively correlated with VDR and CYP27B1 level.

**Conclusions:** Based on our previous studies and present results, we concluded that vitamin D endocrine system affects melanoma behavior. And CYP24A1 seems to have important impact on melanoma biology at early stages and on inquiring malignant potential by melanoma cells. The work was supported in part by grant O3/CM/2013 to AAB and statutory research funds from Collegium Medicum Nicolaus Copernicus University.

**Key words:** skin melanoma, vitamin D<sub>3</sub>, CYP24A1.

#### Streszczenie

**Wstęp:** Mitochondrialna 24-hydroksylaza 1,25-dihydroksywitaminy D<sub>3</sub> (CYP24A1), należąca do rodziny cytochromu p450, inaktywuje witaminę D<sub>3</sub> poprzez jej metabolizm rozpoczynający się od hydroksylacji przy węglu C24. Nasze wcześniejsze badania wykazały, że ekspresja innych elementów endokrynnego systemu witaminy D<sub>3</sub>, receptora witaminy D (VDR) oraz 1 $\alpha$ -hydroksylazy (CYP27B1), jest zaburzona w czerniakach oraz negatywnie skorelowana z ich progresją, agresywnością oraz całkowitym i wolnym od choroby przeżyciem.

**Cel pracy:** Analiza ekspresji CYP24A1 w zmianach melanocytarnych.

**Materiał i metody:** Poziom CYP24A1 był oznaczany immunohistochemicznie w 6 próbkach prawidłowej skóry, 15 znamionach, 58 czerniakach oraz 25 przerzutach poprzecznych od 67 pacjentów.

**Wyniki:** W nowotworach melanocytarnych skóry poziom CYP24A1 był wyższy niż w skórze prawidłowej. W znamionach i czerniakach w stadium I–II oraz zaawansowaniu pT1–2 obserwowano wysoki poziom CYP24A1, istotnie wyższy niż w czerniakach zaawansowanych (stadium III–IV, pT3–4) i przerzutach. W znamionach często obserwowano wysoką ekspresję CYP24A1, ale średni poziom CYP24A1 był porównywalny ze stwierdzonym w czerniakach we wczesnych stadiach zaawansowania. Ponadto ekspresja CYP24A1 była pozytywnie skorelowana z poziomem VDR i CYP27B1.

**Wnioski:** Na podstawie wyników poprzednich i obecnych badań można stwierdzić, że endokrynną system witaminy D<sub>3</sub> modyfikuje patogenezę czerniaka. A CYP24A1 wydaje się wpływać na biologię czerniaka, zwłaszcza we wczesnych etapach rozwoju, a być może także na nabywanie potencjału inwazyjnego.

Badania były częściowo finansowane z grantu O3/CM/2013 przyznanego AAB oraz funduszy na działalność statutową Collegium Medicum Uniwersytetu Mikołaja Kopernika.

**Słowa kluczowe:** czerniak skóry, witamina D<sub>3</sub>, CYP24A1.



[75]

## Linia komórkowa B16 (F10) jako model w badaniach komórek inicjujących czerniaka

Anna Jagiełło<sup>1</sup>, Karolina Bukowska-Strakova<sup>2</sup>, Hevidar Taha<sup>2</sup>, Halina Waś<sup>2</sup>, Claudine Kieda<sup>3</sup>, Józef Dulak<sup>2</sup>, Alicja Józkowicz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Jagiellonian University, Krakow, Poland

<sup>2</sup>Department of Medical Biotechnology, Faculty of Biochemistry, Biophysics, and Biotechnology, Jagiellonian University, Krakow, Poland

<sup>3</sup>CNRS, Centre de Biophysique Moléculaire, Orleans, France

<sup>1</sup>Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Polska

<sup>2</sup>Zakład Biotechnologii Medycznej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Polska

<sup>3</sup>CNRS, Centre de Biophysique Moléculaire, Orlean, Francja

### Abstract

**Introduction:** Cancer stem cells (CSCs) have been recently widely investigated in many types of tumors, including melanoma. One of the *in vitro* model used in melanoma studies is B16 (F10) murine melanoma cell line.

**Aim of the study:** To investigate and characterize melanoma initiating cells (MICs) within B16 (F10) cell line.

**Material and methods:** Flow cytometry using LSR Fortessa cell analyzer, single-cell sorting using MoFlo XDP sorter, cell cultures.

**Results:** The results show that within B16 (F10) cell line there are small subpopulations positive for single MIC markers: CD20, CD24, CD133 and ALDH activity. Moreover hypoxia further increased expression of MIC markers. Single-cell sorting of prospective MIC revealed their abilities to form clones and grow as melanospheres. B16 (F10) CD20+ cells formed clones with 3.13% efficiency, CD24+ 4.25%, CD133+ 6.25% and ALDHhigh 10.4%. Numbers of colonies were slightly increased in CD20+ (up to 5.2%) and ALDHhigh (up to 13.5%) cells over-expressing heme oxygenase 1 (HO-1), the cytoprotective enzyme. Our preliminary data indicates that HO-1 might influence the proliferative potential and formation of clones by MIC. Moreover, cell lines derived from clones were able to differentiate and restore the heterogeneity of parental cell line.

**Conclusions:** Within B16 (F10) cell line there are subpopulations positive for single MIC markers that display the characteristics of CSC. Thus, B16 (F10) cell line might be used as tool in studies of MIC biology and the role of HO-1 in these cells.

**Key words:** melanoma, melanoma initiating cells, B16 (F10), heme oxygenase 1.

### Streszczenie

**Wstęp:** Liczne badania nad powstawaniem nowotworów (w tym czerniaka) skupiają się nad teorią dotyczącą nowotworowych komórek macierzystych. Jednym z modeli używanych w badaniach nad biologią czerniaka jest linia mysiego czerniaka B16 (F10). Niewiele wiadomo jednak na temat obecności i charakterystyki nowotworowych komórek macierzystych w tej linii.

**Cel pracy:** Zbadanie i charakterystyka komórek inicjujących czerniaka w mysiej linii komórkowej B16 (F10).

**Materiał i metody:** Zastosowano cytometrię przepływową (LSR Fortessa), sortowanie pojedynczych komórek (MoFlo XDP) i hodowle komórkowe.

**Wyniki:** Analiza cytofluorymetryczna komórek linii B16 (F10) wykazała obecność niewielkich subpopulacji pozytywnych względem pojedynczych markerów komórek inicjujących czerniaka (*melanoma initiating cells* – MICs): CD20, CD24, CD133, oraz o aktywności ALDH, które uległy niewielkiemu zwiększeniu po hodowli w warunkach hipoksyjnych. Po od-sortowaniu pojedynczych komórek tych populacji część z nich podjęła wzrost klonalny i utworzyła struktury sferoidalne. Komórki CD20+ tworzyły klony z wydajnością 3,13%, CD24+ 4,25%, CD133+ 6,25%, ALDHhigh 10,4%. Wydajności tworzenia klonów w subpopulacjach CD20+ oraz ALDHhigh były nieco wyższe (odpowiednio 5,2% i 13,5%) w komórkach wykazujących nadekspresję oksygenazy hemowej 1 – enzymu cytoprotekcyjnego. Może to świadczyć o wpływie HO-1 na tempo wzrostu klonów powstałych z MIC. Co więcej, linie komórkowe wyprowadzone z pojedynczych klonów posiadały zdolności do różnicowania i odtwarzania heterogenności linii wyjściowej.

**Wnioski:** Linia B16 (F10) wykazuje obecność subpopulacji pozytywnych względem markerów MIC o właściwościach komórek macierzystych. Dlatego też linia ta może służyć jako model w badaniach nad biologią MIC oraz nad rolą HO-1 w tych komórkach.

**Słowa kluczowe:** czerniak, komórki inicjujące czerniaka, B16 (F10), oksygenaza hemowa 1.

[76]

## Oksygenaza hemowa 1 w komórkach macierzystych mezenchymalnych – interakcje z linią kolczystokomórkowego raka SCC VII

Witold Nowak, Agata Szade, Krzysztof Szade, Karolina Hajduk, Karolina Bukowska-Strakova, Józef Dulak, Alicja Józkowicz

Department of Medical Biotechnology, Faculty of Biochemistry, Biophysics, and Biotechnology, Jagiellonian University, Krakow, Poland

Zakład Biotechnologii Medycznej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Krakow, Poland

### Abstract

**Introduction:** Heme oxygenase-1 (HO1) prevents induction of squamous cells carcinoma in mice but protects neoplastic cells from anticancer therapies. Mesenchymal stem cells (MSC) can be recruited to the tumour site and influence tumour growth with immunosuppression and differentiation to stroma cells.

**Aim of the study** was to determine the interactions of MSC and SCC VII cell line with different levels of HO1.

**Material and methods:** We used murine Hmox1+/+ or Hmox1-/- MSC and SCC VII murine squamous cell carcinoma cell lines expressing luciferase (SCC VII-luc) or luciferase and HO1 (SCC VII-luc-HO1). Influence of Hmox1+/+ or Hmox1-/- MSC on SCC VII growth *in vitro* in co-culture was assessed with IVIS Lumina 200. Influence of conditioned media from SCC VII lines on the differentiation and immunomodulatory gene expression in MSC was assessed with realtime PCR. Mobilization of MSC to the SCC VII tumours *in vivo* was assessed with flow cytometry.

**Results:** There is no difference in the growth of SCC VII-luc or SCC VII-luc-HO1 tumours co-cultured with MSC with or without functional HO1 gene. MSC stimulation with conditioned media from both SCC VII lines similarly induces expression of  $\alpha$ SMA – marker of myofibroblasts. Moreover, Hmox1+/+ MSCs up-regulate while Hmox1-/- down-regulate immunosuppressive IL-10 when stimulated with conditioned media from SCC VII cells. What is more, Hmox1-/- cells up-regulate indoleamine-2,3-dioxygenase. Finally, both SCC VII cell lines mobilized similar numbers of MSCs *in vivo*.

**Conclusions:** Lack of HO1 in MSC influences neither growth of SCC VII cell lines nor MSC differentiation to myofibroblasts but may affect their immunosuppressive activity.

**Key words:** tumour, immunomodulation, mesenchymal stem cells.

### Streszczenie

**Wstęp:** Oksygenaza hemowa 1 (HO1) chroni przed chemiczną indukcją raka kolczystokomórkowego u myszy, ale może osłabiać działanie terapii przeciwnowotworowej. Komórki macierzyste mezenchymalne mogą być rekrutowane do guzów nowotworowych i wpływać na ich wzrost, różnicując do komórek zrębu tkankowego i hamując odpowiedź immunologiczną.

**Cel pracy:** Ocena interakcji między komórkami MSC oraz SCC VII o różnym poziomie HO1.

**Materiał i metody:** W badaniach wykorzystano szpiczkowe komórki MSC z myszy Hmox1+/+ lub Hmox1-/- oraz linie komórkowe SCC VII wykazujące ekspresję lucyferazy (SCC VII-luc) lub lucyferazy i HO1 (SCC VII-luc-HO1). Wpływ Hmox1+/+ lub Hmox1-/- MSC na wzrost SCC VII w kokulturze *in vitro* oceniono za pomocą systemu IVIS Lumina 200. Wpływ mediów z SCC VII-luc lub SCC VII-luc-HO1 na różnicowanie i ekspresję genów immunosupresyjnych w MSC oceniono za pomocą real time PCR. Mobilizację MSC *in vivo* do guzów z komórek SCC VII-luc lub SCC VII-luc-HO1 oceniono za pomocą cytometrii przepływowej.

**Wyniki:** Nie zaobserwowano różnic we wzroście linii SCC VII w kokulturze z MSC Hmox1+/+ lub Hmox1-/. Stymulacja MSC mediami z obu linii SCC VII skutkowałą wzrostem ekspresji SMA – markera miofibroblastów. Ponadto MSC Hmox1+/+ zwiększają, natomiast MSC Hmox1-/- zmniejszają ekspresję IL-10 pod wpływem mediów z SCC VII. Ponadto MSC Hmox1-/- zwiększają ekspresjęIDO. W eksperymentach *in vivo* guzy zbudowane z obu typów komórek SCC VII mobilizowały podobne liczby komórek MSC.

**Wnioski:** Brak HO1 w komórkach MSC nie wpływa na wzrost linii SCC VII w ko-kulturze ani na różnicowanie do miofibroblastów pod wpływem mediów kondycjonowanych. Poziom HO1 w MSC może wpływać na ich właściwości immunomodulacyjne.

**Słowa kluczowe:** nowotwór, immunomodulacja, komórki macierzyste mezenchymalne.

[77]

## Cytotoxicity of thermo-responsive nanogels based on pNiPAM

### Badania cytotoksyczności termowrażliwego polimeru NiPAM

Tobiasz Deptuła, Alicja Warowicka, Adam Patkowski

NanoBioMedical Centre, Adam Mickiewicz University, Poznan, Poland  
Centrum NanoBioMedyczne, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań, Polska

#### Abstract

**Introduction:** Recent improvements in applying of the new polymer-based materials among several industrial and bio-medical applications have lead scientists to investigate new materials that would not only improve old techniques, but also open way for new approaches and applications. Being respondent to variations in temperature, pH, ionic strength or hydrostatic pressure, 'intelligent' polymers, mostly because of their nanometric size and tunable properties, are widely considered as a promising tool for biomaterials, drug delivery systems, biosensors and bioanalytical devices. pNiPAM is one example among this new class of materials with wide range of applications due to its low critical solution temperature (LCST), around natural human body temperature, at 33°C.

**Aim of the study:** Since NiPAM monomer has been reported as a toxic component, developing biocompatible-approach requires more detailed test that can determine the systems cytotoxicity. In this work we focused on cytotoxicity of various pNiPAM hydrogels.

**Material and methods:** We use previously synthesized (free radical co-polymerization in water) thermoresponsive pNiPAM hydrogels with different degrees of crosslinking and in a range of different concentrations. Examination was conducted on HeLa and HEKcell lines to investigate materials cytotoxicity by standard MTT and viability tests. In order to study potential bio-medical application, particles structure was investigate by employing CRYO-SEM technique.

**Results:** We report no cytotoxicity effects on tested cell lines in used concentration for several different pNiPAM nanoparticles. One can also observe higher proliferation activity of cells upon adding NiPAM biopolymer.

**Conclusions:** Lack of cytotoxicity and additional pNiPAM based surface effect, promoting cells growth, suggest that pNiPAM might formed bio-scaffold for cell cultures.

**Key words:** cytotoxicity, pNiPAM, nanoparticles, nanomedicine, drugdelivery, nanotechnology.

#### Streszczenie

**Wstęp:** Postęp w stosowaniu polimerowych materiałów zarówno w przemyśle, jak i w biomedycynie koncentruje uwagę naukowców na polimerach wykazujących właściwości konkurencyjne w stosunku do tradycyjnych materiałów. Polimery tworzące struktury w skali nano stanowią obiecujące narzędzie o szerokim spektrum zastosowań. Jednym z takich polimerów jest pNiPAM (poly-N-isopropylacrylamid) i dzięki temperaturze przejścia fazowego (*Lower Critical Solution Temperature*) około naturalnej temperatury ciała ludzkiego 33°C wykazuje wiele potencjalnych zastosowań, np. jako biomateriały, biosensory czy systemy dostarczania leków.

**Cel pracy:** Synteza i zbadanie cytotoksyczności polimeru NiPAM o potencjalnym zastosowaniu w biomedycynie.

**Materiał i metody:** Użyto wcześniej syntetyzowanych (*free radical co-polymerization in water*) termowrażliwych hydrożeli pNiPAM z różnym stopniem usieciowania i w różnych stężeniach. Badano efekt toksyczności na liniach komórkowych HeLa i HEK293, używając standardowego testu MTT i testów do oceny żywotności komórek. Zastosowano mikroskopię SEM i CRYO-SEM w celu zbadania struktury polimerów.

**Wyniki:** Nie stwierdzono efektu cytotoksycznego na badanych liniach komórkowych przy użytym zakresie stężeń biopolimeru NiPAM. Zaobserwowano również wzrost proliferacji komórek w stosunku do kontroli.

**Wnioski:** Brak cytotoksyczności oraz efekt polegający na tworzeniu porowatych powierzchni daje możliwość zastosowania badanych polimerów jako potencjalnych biorusztowań do hodowli komórkowych.

**Słowa kluczowe:** cytotoksyczność, pNiPAM, nanocząstki, nanomedycyna, systemy dostarczania leków, nanotechnologia.

[78]

## Próba indukcji cech macierzystopodobnych w komórkach nowotworowych raka jajnika za pomocą warunków hodowli

Aleksandra Klemba<sup>1,2,3</sup>, Sławomir Lewicki<sup>4</sup>, Robert Zdanowski<sup>4</sup>, Anna Czarnecka<sup>2</sup>, Cezary Szczylik<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>University of Warsaw, Warsaw, Poland

<sup>2</sup>Military Institute of Medicine, Warsaw, Poland

<sup>3</sup>Fundacja Onkologii Doświadczalnej i Klinicznej, Warsaw, Poland

<sup>4</sup>Military Institute of Hygiene and Epidemiology, Warsaw, Poland

<sup>1</sup>Uniwersytet Warszawski, Warszawa, Polska

<sup>2</sup>Wojskowy Instytut Medyczny, Warszawa, Polska

<sup>3</sup>Fundacja Onkologii Doświadczalnej i Klinicznej, Warszawa, Polska

<sup>4</sup>Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii, Warszawa, Polska

### Abstract

**Introduction:** Among hypotheses aiming at explaining aggressive phenotype of ovarian cancer, the concept of stem-like cancer cells has gains more and more experimental evidence. This phenotype can be established by surface markers. This can be achieved by manipulation of medium ingredients.

**Aim of the study** was to establish the ingredients essential to induce stem-like properties of ovarian cells (understood as presence of certain surface markers) in ovarian cancer cell lines.

**Material and methods:** Ovarian cancer cell lines SKOV-3 and OvBH-1 were cultured in medium without FBS, with certain supplements. In certain time points morphology analysis and FACS were performed to estimate CD105 and CD133 presence.

**Results:** The morphology of the ovarian cancer cells changed during the treatment with supplemented medium. As a result of treatment, increase of CD105, not CD133, population was observed in contrary to expected results.

**Conclusions:** Obtained supplemented medium can be applied to induce stem-like properties of ovarian cancer cell line in terms of CD105 appearance.

**Key words:** ovarian cancer, stem-like cancer cells, CD105, CD133.

### Streszczenie

**Wstęp:** Pośród hipotez mających wyjaśnić agresywny fenotyp raka jajnika koncepcja macierzystopodobnych komórek nowotworowych zyskuje coraz więcej dowodów eksperymentalnych. Taki fenotyp określa się m.in. za pomocą markerów powierzchniowych. Można go otrzymać m.in. poprzez manipulację składem pożywki.

**Cel pracy:** Wyselekcjonowanie medium do indukcji cech macierzystopodobnych (rozumianych jako pojawianie się odpowiednich markerów powierzchniowych) w liniach komórkowych raka jajnika.

**Materiał i metody:** Linie komórkowe raka jajnika SKOV-3 i OvBH-1 hodowano w pożywkach bez surowicy, z określonymi suplementami. W określonych punktach czasowych przeprowadzano analizę morfologii komórek i analizę FACS, mającą na celu sprawdzenie obecności markerów CD105 i CD133.

**Wyniki:** Morfologia komórek ulegała zmianie w trakcie hodowli w mediach suplementowanych. W wyniku traktowania komórek uzyskano wzrost populacji CD105+, a nie CD133+, jak się wcześniej spodziewano.

**Wnioski:** Opracowany skład medium może służyć do otrzymywania cech macierzystopodobnych w komórkach raka jajnika, rozumianych jako podwyższona ekspresja markera CD105.

**Słowa kluczowe:** rak jajnika, nowotworowe komórki macierzyste, CD105, CD133.

[79]

## **NFKBIA polymorphic variant c.\*126G>A may be associated with increased risk of differentiated thyroid cancer in Polish patients**

**Szymon Hryhorowicz<sup>1</sup>, Katarzyna Ziernicka<sup>2</sup>, Marta Kaczmarek-Ryś<sup>3</sup>, Justyna Hoppe-Gotębiewska<sup>3</sup>, Monika Gołąb<sup>2</sup>, Małgorzata Szkudlarek<sup>2</sup>, Marek Ruchała<sup>2</sup>, Ryszard Słomski<sup>1,3,4</sup>**

<sup>1</sup>NanoBioMedical Centre, Adam Mickiewicz University, Poznan, Poland

<sup>2</sup>Department of Endocrinology and Internal Diseases, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland

<sup>3</sup>Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland

<sup>4</sup>Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Life Sciences, Poznan, Poland

<sup>1</sup>NanoBioMedical Centre, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań, Polska

<sup>2</sup>Klinika Endokrynologii i Chorób Wewnętrznych, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, Polska

<sup>3</sup>Instytut Genetyki Człowieka, Polska Akademia Nauk, Poznań, Polska

<sup>4</sup>Wydział Biochemii i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy, Poznań, Polska

### **Abstract**

**Introduction:** Thyroid cancer determine 1% of all malignant tumors and it is the most frequent endocrine malignancy. It is 12 commonest cancers in women. Incidence in Poland exceeds 1000 new cases per year, in addition, there is increase in incidence by about 4% each year.

**Aim of the study** was to analyze the frequency of c.\*126G>A SNP polymorphism (single nucleotide polymorphism) of the NFKBIA gene and examine its role in the development of differentiated thyroid cancer (DTC).

**Material and methods:** DNA was isolated from peripheral blood leukocytes collected from group of 548 patients with differentiated thyroid cancer and 535 individuals from population group. Samples were drawn from the Department of Endocrinology, Metabolism and Internal Diseases, University of Medical Sciences in Poznań and the Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sciences in Poznań. Sequence variants were determined by pyrosequencing.

**Results:** There were observed differences in allele and genotype frequencies. In patients with thyroid cancer allele G was present with frequency 0.581 and allele A with frequency 0.418 compared with 0.521 and 0.478 in population group respectively. The differences were more significant when considerate men and women separately. Allele G in males with DTC was observed with frequency 0.651 comparing with males population control 0.533; allele A with frequency 0.349 in patient males and 0.467 in males population.

**Conclusions:** Regarding lower frequency of the disease in males, detected differences may indicate on association of allele G with thyroid cancer risk.

**Key words:** differentiated thyroid cancer, polymorphism, NFKBIA, SNP, population studies.

### **Streszczenie**

**Wstęp:** Rak tarczycy stanowi 1% wszystkich nowotworów złośliwych i jest najczęstszym nowotworem złośliwym układu endokrynnego. Zajmuje 12. miejsce wśród najczęściej występujących nowotworów u kobiet. Zachorowalność na raka tarczycy w Polsce to ponad 1000 przypadków rocznie, ponadto co roku następuje przyrost zachorowalności o ok. 4%.

**Cel pracy:** Analiza częstości występowania wariantu polimorficznego c.\*126G>A genu NFKBIA u chorych ze zróżnicowanym rakiem tarczycy oraz w populacji polskiej.

**Materiał i metody:** Materiał, który został wykorzystany do badań, stanowił DNA wyizolowany z leukocytów krwi obwodowej pobranej od 548 osób chorych ze zróżnicowanym rakiem tarczycy (DTC) oraz od grupy 535 osób z grupy populacyjnej. Materiał do badań pochodził z Kliniki Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu oraz z Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu. Analizy wariantów sekwencji wykonano za pomocą metody pirosekwencjonowania.

**Wyniki:** W pierwszym etapie analizy statystycznej nie zaobserwowano istotnych różnic dla częstości alleli i genotypów u osób badanych. U pacjentów z rakiem tarczycy allel G był obecny z częstotliwością 0,581, natomiast allel A z częstotliwością 0,418, a w grupie populacyjnej częstości te wynosiły odpowiednio 0,521 i 0,478. Różnice były bardziej znaczące, gdy potraktowano mężczyzn oraz kobiety jako dwie oddzielne grupy. Allel G u mężczyzn z DTC wystąpił z częstością 0,651 w porównaniu z grupą kontrolną, gdzie wynosił 0,533. Z kolei allel A wystąpił z częstotliwością 0,349 u mężczyzn z DTC i z częstością 0,467 w grupie kontrolnej.

**Wnioski:** Biorąc pod uwagę fakt niższej częstotliwości zachorowań na raka tarczycy u mężczyzn, wykryte różnice mogą sugerować zależność wystąpienia allelu G z ryzykiem zachorowania na raka tarczycy.

**Słowa kluczowe:** zróżnicowane raki tarczycy, polimorfizm, NFKBIA, SNP, badania populacyjne.

[80]

## Wpływ pośredniego i bezpośredniego działania promieniowania jonizującego w warunkach *in vitro* na liczbę podwójnych pęknięć DNA i proliferację komórek

Karolina Zaleska, Wiktoria Maria Suchorska, Marlena Wolek, Anna Kowalik, Marta Kruszyna, Weronika Jackowiak

Greater Poland Cancer Center, Poznan, Poland  
Wielkopolskie Centrum Onkologii, Poznań, Polska

### Abstract

**Introduction:** It is believed that the radiation dose has a significant impact on the effectiveness of radiation therapy. Understanding the biological effects depend on the dose rate is crucial for the effective treatment of ionizing radiation. Basically the reduction of the dose leads to a reduction in lethal effect, but in some circumstances may be observed the opposite effect of the dose rate, characterized by an increase in damage and cell killing effect as compared to equivalent doses of high power.

**Aim of the study:** The aim of the experiment is to compare the number of double strand breaks (DSB) in the DNA resulting from scattered radiation (low energy, keV) and the primary (high energy MeV) and cell proliferation analysis of the MDA-MB-231 cell line.

**Material and methods:** Triple negative breast cancer MDA-MB-231 cells were cultured under standard conditions and irradiated in the dose range 1.5–3.0 Gy in the beam axis (indirect radiation) and ten centimeters out-of-field (the scattered radiation) in the water phantom using Clinac 2300C. Sixty minutes after the irradiation, were labeled by immunofluorescence using Apoptosis, DNA Damage and Cell Proliferation Kit BD Pharmingen™. Analysis was performed using a flow cytometer. In addition, clonogenic assays were performed with the aim of determining the value of SF (survival fraction).

**Results:** Ionizing radiation in beam axis cause different number of DSB in MDA-MB-231 cell line compared to cells treated 10 cm out-of-field. Moreover, these cells have different proliferative and apoptotic potential.

**Conclusions:** Indirect ionizing radiation in dose range of 1.5–3.0 Gy in beam axis causes a different biological effect than the radiation scattered 10 cm out-of-field *in vitro*.

**Key words:** ionizing radiation, dose-rate, DNA damage, proliferation.

### Streszczenie

**Wstęp:** Moc dawki promieniowania ma znaczący wpływ na skuteczność radioterapii. Poznanie efektów biologicznych zależnych od mocy dawki jest kluczowe dla skutecznego leczenia. Zasadniczo obniżenie mocy dawki prowadzi do obniżenia efektu letalnego, jednakże w pewnych warunkach obserwuje się efekt odwrotny mocy dawki.

**Cel pracy:** Celem eksperymentu jest porównanie liczby podwójnych uszkodzeń (DSB) w DNA powstałych na skutek promieniowania jonizującego rozproszonego (o niskiej energii, keV) oraz pierwotnego (o wysokiej energii, MeV) wraz z analizą proliferacji komórek *in vitro*.

**Materiał i metody:** Komórki nowotworowe raka piersi potrójnie ujemne MDA-MB-231 hodowane w warunkach standardowych napromieniono dawkami 1,5–3,0 Gy w osi wiązki (promieniowanie pośrednie) oraz dziesięć centymetrów od osi wiązki (promieniowanie rozproszone) w fantomie wodnym za pomocą akceleratora liniowego CLINAC 2300C. Sześćdziesiąt minut po napromienieniu zostały wyznakowane immunofluorescencyjnie przy użyciu Apoptosis, DNA Damage and Cell Proliferation Kit BD Pharmingen™. Analizę wykonano przy użyciu cytometru przepływowego. Ponadto wykonano testy klonogenne celem określenia wartości SF (*survival fraction*).

**Wyniki:** W wyniku działania promieniowania jonizującego na komórki nowotworowe raka piersi MDA-MB-231 w zakresie 1,5–3,0 Gy w osi wiązki powstaje inna liczba podwójnych uszkodzeń DNA niż w komórkach poddanych działaniu promieniowania jonizującego 10 cm od osi wiązki. Ponadto komórki te wykazują odmienny potencjał proliferacyjny oraz apoptyczny.

**Wnioski:** Promieniowanie jonizujące pośrednie w zakresie dawki 1,5–3,0 Gy w osi wiązki powoduje inny efekt biologiczny niż promieniowanie rozproszone w warunkach *in vitro*.

**Słowa kluczowe:** promieniowanie jonizujące, moc dawki, uszkodzenia DNA, proliferacja.

[81]

## Analiza dużych mutacji w genie *BARD1* u pacjentek z rakiem piersi i/lub jajnika

Katarzyna Klonowska<sup>1</sup>, Magdalena Ratajska<sup>2</sup>, Alina Kuźniacka<sup>2</sup>, Janusz Limon<sup>2</sup>, Karol Czubak<sup>1</sup>, Piotr Kozłowski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland

<sup>2</sup>Chair and Department of Biology and Genetics, Medical University of Gdansk, Gdansk, Polska

<sup>1</sup>Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań, Polska

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Biologii i Genetyki, Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk, Polska

### Abstract

**Introduction:** Besides *BRCA1/2* genes, a considerable fraction of breast and/or ovarian predisposing factors is still unknown. Initial studies, reporting small size-mutations, suggest that several pathogenic variants in *BARD1* gene may be responsible for familial aggregation of breast and/or ovarian cancer. Although it was suggested that large mutations (multi-exon deletions or duplications) may contribute substantially to the deleterious variation of *BARD1*, no systematic study of large mutations in *BARD1* was performed so far.

**Aim of the study:** Here we decided to characterize the role of large mutations in *BARD1* in familial aggregation of breast and/or ovarian cancer.

**Material and methods:** We designed and generated multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) probe set covering all exons and flanking sequences of *BARD1*. The MLPA assay was used for the analysis of 524 DNA samples from patients with familial breast and/or ovarian cancer and 344 DNA specimens from patients with unselected ovarian cancer.

**Results:** Conducted investigation did not reveal any large mutations in *BARD1* gene. As a side effect of the analysis, confirming precision of our test, we detected 7 single nucleotide substitutions, inducing 30–45% decrease in signal of single MLPA probe specific for either exon 8 or 10. Sequencing analysis led to identification of 3 different sequence variants, located within target sequence of respective MLPA probes. Two of them, c.1690C>T and c.1977A>G, were described earlier to induce aberrant splicing. The third one, c.1972C>T (R658C), was reported as possibly pathogenic.

**Conclusions:** Concluding, although we cannot exclude presence of large mutations in *BARD1*, our study indicates that such mutations do not contribute substantially to the risk of breast and/or ovarian cancer.

**Key words:** *BARD1*, large mutations, MLPA, breast and/or ovarian cancer, familial predisposition.

*Funding:* NCN 2011/01/B/NZ5/02773

### Streszczenie

**Wstęp:** Oprócz genów *BRCA1/2* znaczna część czynników predisponujących do rodzinnej agregacji raka piersi i/lub jajnika jest wciąż nieznana. Wstępne doniesienia wskazują, że mutacje w genie *BARD1* mogą być czynnikami predisponującymi do raka piersi i/lub jajnika. Pomimo wskazań, że duże mutacje (wieloeksonowe delecje lub duplikacje) mogą się znacząco przyczynić do patogenicznej zmienności *BARD1*, nie przeprowadzono do tej pory systematycznej analizy takich mutacji w genie *BARD1*.

**Cel pracy:** W niniejszym projekcie postanowiliśmy scharakteryzować udział dużych mutacji w genie *BARD1* w rodzinnej predyspozycji do raka piersi i/lub jajnika.

**Materiał i metody:** Zaprojektowaliśmy zestaw sond do zależnej od ligacji multipleksowej amplifikacji sond (MLPA), obejmujący wszystkie eksony i sekwencje flankujące genu *BARD1*. Test MLPA został zastosowany do analizy 524 próbek DNA pacjentek z rodzinną formą raka piersi i/lub jajnika i 344 próbek DNA pacjentek z nieselekcjonowanym rakiem jajnika.

**Wyniki:** Przeprowadzona analiza nie wykazała obecności dużych mutacji w genie *BARD1*. Mimo to w wyniku przeprowadzonych badań w 7 próbkach DNA zidentyfikowaliśmy 3 różne, jednonukleotydowe substytucje leżące w sekwencjach rozpoznawanych przez sondy MLPA specyficzne dla eksonu 8 lub 10 genu *BARD1*. Wykrycie tych mutacji poprzez nieznaczne obniżenie sygnałów odpowiednich sond potwierdza wysoką czułość naszego testu. Wcześniej wykazano, że dwie ze zidentyfikowanych przez nas mutacji, c.1690C>T i c.1977A>G, powodują zaburzenia splicingu. Trzecia zmiana, c.1972C>T (R658C), została wcześniej określona jako potencjalnie patogenna.

**Wnioski:** Podsumowując – mimo że nie można wykluczyć obecności dużych mutacji w genie *BARD1*, dokonana analiza wskazuje, że tego typu mutacje nie mają dużego udziału we wzroście ryzyka raka piersi i/lub jajnika.

**Słowa kluczowe:** *BARD1*, duże mutacje, MLPA, rak piersi i/lub jajnika, rodzinna predyspozycja.

*Finansowanie:* NCN 2011/01/B/NZ5/02773.

[82]

## Personalized medicine for CLL: case report on CLL cell sensitivity evaluation of antileukemic agent(s) in progressive leukemia

*Personalizacja terapii PBL: ocena wrażliwości komórek białaczkowych w postępującej chorobie nowotworowej*

**Małgorzata Rogalińska<sup>1</sup>, Jerzy Błoński<sup>2</sup>, Paweł Góralski<sup>3</sup>, Paweł Robak<sup>4</sup>, Aneta Rogalska<sup>5</sup>, Jan Barciszewski<sup>6</sup>, Karolina Tarnowska<sup>7</sup>, Marta Wawro<sup>1</sup>, Daniel Wysokiński<sup>7</sup>, Katarzyna Woźniak<sup>7</sup>, Aneta Koceva-Chyła<sup>5</sup>, Henryk Piekarski<sup>3</sup>, Tadeusz Robak<sup>2</sup>, Zofia Kilianska<sup>7</sup>**

<sup>1</sup>Department of Cytochemistry, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Lodz, Poland

<sup>2</sup>Chair of Hematology, Medical University of Lodz, Lodz, Poland

<sup>3</sup>Chair of Physical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Lodz, Lodz, Poland

<sup>4</sup>Chair of Experimental Hematology, Medical University of Lodz, Lodz, Poland

<sup>5</sup>Chair of Termbiology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Lodz, Poland

<sup>6</sup>Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland

<sup>7</sup>Chair of Molecular Genetics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Lodz, Poland

<sup>1</sup>*Katedra Cytochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź*

<sup>2</sup>*Katedra Hematologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi*

<sup>3</sup>*Katedra Chemii Fizycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Łódzki, Łódź*

<sup>4</sup>*Katedra Hematologii Eksperymentalnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi*

<sup>5</sup>*Katedra Termbiologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź*

<sup>6</sup>*Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań, Polska*

<sup>7</sup>*Katedra Genetyki Molekularnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź, Polska*

### Abstract

**Introduction:** Chronic lymphocytic leukemia (CLL) touches usually elderly, but an increasing tendency of this cancer incidence for young people occurs.

**Aim of the study:** The aim of our *in vitro* studies was to monitor the cytotoxicity, apoptosis rate, thermal profiles of anticancer agents in mononuclear cells from peripheral blood (PBMcs) of women with progressive CLL.

**Material and methods:** PBMcs samples were obtained from blood of untreated patient in the age of 22 (leukocytosis  $120 \times 10^3/\mu\text{l}$ ) and one year later ( $667 \times 10^3/\mu\text{l}$ ). PBMc cells were exposed to cladribine or fludarabine combined with cyclophosphamide/mafosfamide (CC/CM, FC/FM), and to CM combined with MAb – rituximab (RitCM), rituximab alone (Rit) and to kinetin riboside (KR). CLL cell viability and rate of apoptosis were analyzed using Vybrant Apoptosis Assay #4 by flow cytometry and fluorescence microscopy. Nuclear preparations of control and drug-treated leukemic cells were analyzed by differential scanning calorimetry (DSC). The expression/proteolysis of apoptosis related proteins was evaluated by Western blot technique.

**Results:** A similar tendency in CLL cell sensitivity to anticancer agents was observed, except Rit. The strong decrease in cell viability, overlaps with significant changes in DSC profiles, as well as in expression of apoptosis-related proteins (see above). Moreover, their cytotoxicity was also confirmed by Comet assay technique. The strongest DNA damages were observed in leukemic cells exposed to FM and RCM.

**Conclusions:** The obtained results of previously untreated patient with aggressive CLL suggest that *in vitro* tests of leukemic cell susceptibility to examined agent(s) could be helpful in the therapy choice and earlier sensitivity evaluation.

**Key words:** personalized therapy, CLL, anticancer agents, purine derivatives, cyclophosphamide, rituximab.

### Streszczenie

**Wstęp:** Przewlekła białaczka limfocytowa (PBL) dotyka zwykle osoby w wieku podeszłym. Obserwuje się tendencję wzrostową zachorowań na ten typ białaczki u osób młodych.

**Cel pracy:** Porównawczy monitoring cytotoxycywności i przebiegu apoptozy komórek PBMcs z krwi pacjentki z progresywną postacią PBL, eksponowanych na związki antynowotworowe.

**Materiał i metody:** Komórki białaczkowe izolowano z krwi pacjentki w wieku 22 lat oraz po upływie roku (leukocytoza odpowiednio  $120$  i  $667 \times 10^3/\mu\text{l}$ ) i inkubowano z kladrybiną lub fludarabiną w kombinacji z cyklofosfamidem/mafosfamidem (CC/CM; FC/FM), CM z rituksimabem (RCM), z rituksimabem (Rit) oraz rybozydem kinetyny (KR), samodzielnie. Przeżywalność komórek PBL i poziom apoptozy analizowano przy użyciu Vybrant Apoptosis Assay #4, wykorzystując cytometrię przepływową oraz mikroskopię fluorescencyjną. Zmiany profili termicznych jąder komórek PBL, kontrolnych oraz traktowanych ww. związkami badano metodą DSC. Ekspresję/proteolizę białek związanych z apoptozą analizowano metodą Western blot.

**Wyniki:** Otrzymane wyniki wskazują na korelację pomiędzy odpowiedzią komórek PBL na stosowane związki antynowotworowe a ich wrażliwością. Odnotowano spadek przeżywalności PBMcs, któremu towarzyszyły zmiany w profilach termicznych frakcji jądrowych badanych komórek i ekspresji białek związanych z przebiegiem apoptozy. Wyniki wskazują, że poza Rit pozostałe związki/ich kombinacje indukowały apoptozę w komórkach białaczkowych chorej kobiety. Ponadto test kometykowy potwierdził uszkodzenia DNA, głównie w komórkach traktowanych FM oraz RCM.

**Wnioski:** Uzyskane wyniki wskazują, że w przypadku nieleczzonej agresywnej formy PBL, testy *in vitro* podatności komórek PBMc na potencjalną terapię antynowotworową mogą być pomocne w wyborze skutecznej terapii i we wcześniejszej ocenie wrażliwości na leki.

**Słowa kluczowe:** terapia spersonalizowana, PBL, pochodne purynowe, cyklofosfamid, związki antynowotworowe, rituksimab.



[83]

## Sfery z bioinżynierowanych białek jedwabiu pajęczego MS1 oraz MS2 jako nowe nośniki leków przeciwnowotworowych

Katarzyna Kaźmierska<sup>1,2,3</sup>, Anna Florczak<sup>1,2,3</sup>, Yinnan Lin<sup>4</sup>, Andrzej Mackiewicz<sup>2,3</sup>, David Kaplan<sup>4</sup>, Hanna Dams-Kozłowska<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>NanoBioMedical Centre, Adam Mickiewicz University, Poznan, Poland

<sup>2</sup>Department of Diagnostic and Cancer Immunology, Greater Poland Cancer Center, Poznan, Poland

<sup>3</sup>Department of Cancer Immunology, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland

<sup>4</sup>Department of Biomedical Engineering, Tufts University, Medford, MA, USA

<sup>1</sup>Centrum NanoBioMedyczne, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań, Polska

<sup>2</sup>Zakład Diagnostyki i Immunologii Nowotworów, Wielkopolskie Centrum Onkologii Poznań, Polska

<sup>3</sup>Zakład Immunologii Nowotworów, Katedra Biotechnologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny Poznań, Polska

<sup>4</sup>Department of Biomedical Engineering, Tufts University, Medford, MA, Stany Zjednoczone

### Abstract

**Introduction:** A drug carrier should be biocompatible, biodegradable, nanometric and have an ability to bind and release the bioactive compound. Spider silk proteins are an excellent candidates since they are biocompatible and possess self-assembly properties. Moreover, they can be modified by adding a new functional group and produced in bacteria what provides a sufficient amount of the material at low cost.

**Aim of the study** is to obtain a drug carrier based on the bioengineered spider silk.

**Material and methods:** The bioengineered spider silk proteins: MS1 and MS2 were produced in *E. coli* and purified by thermal extraction. The spheres were produced by mixing of a soluble silk protein with a phosphate buffer and characterized using SEM, FTIR and zeta potential measurements. The sphere's cytotoxicity was measured by a MTT assay. The particle's potential of binding of anti-cancer drugs and their release profiles were investigated for doxorubicin, mitoxantrone and etoposide.

**Results:** The MS1 and MS2 proteins form spheres of different morphology, size and surface charge. The size of the particles can be controlled by a concentration of a silk protein mixed with phosphate, while the phosphate concentration influences stability of the silk spheres. Both particle types are non-toxic towards fibroblasts 3T3 *in vitro*. MS1 spheres showed a stronger affinity to anti-cancer drugs: doxorubicin and mitoxantrone.

**Conclusions:** The bioengineered spider silk spheres made of MS1 and MS2 proteins show different properties and different affinity to the anti-cancer drugs. The spheres are non-toxic, biodegradable and, due to their size, they should be able to enter the tumor environment. Those features combined with an affinity to anti-cancer drugs determine the potential of bioengineered spider silk spheres as the drug carriers in cancer therapy.

**Key words:** cancer therapy, doxorubicin, spider silk, nanoparticles, drug carriers.

### Streszczenie

**Wstęp:** Nośniki leków powinny się charakteryzować biokompatybilnością, biodegradowalnością, nanometrycznym rozmiarem oraz zdolnością inkorporacji i opóźnionego uwalniania terapeutycznego. Białka jedwabiu pajęczego stanowią doskonały budulec takich nośników, ponieważ są one biokompatybilne oraz mają zdolność samoskładania. Ponadto mogą być poddane modyfikacjom nadającym im nowe funkcje, a ich produkcja w organizmach prokariotycznych eliminuje problem dostępności materiału.

**Cel pracy:** Uzyskanie nośników leków opartych na bioinżynierowanym jedwabiu pajęczym.

**Materiał i metody:** Bioinżynierowane białka jedwabiu MS1 i MS2 produkowano w *E. coli* oraz oczyszczono na drodze ekstrakcji termicznej. Sfery wytwarzano poprzez mieszanie rozpuszczalnego białka z fosforanem potasu. Sfery charakteryzowano za pomocą mikroskopii elektronowej, spektroskopii podczerwieni oraz pomiaru potencjału dzeta. Cytotoksyczność sfer oznaczono za pomocą testu MTT. Badano potencjał wiązania do sfer, a także profile uwalniania: doksorubicyny, mitoksantronu oraz etopozydu.

**Wyniki:** Białka MS1 oraz MS2 formują sfery charakteryzujące się różną morfologią, rozmiarem oraz ładunkiem powierzchniowym. Rozmiar sfer może być kontrolowany poprzez zmianę stężenia białka, natomiast stężenie fosforanu wpływa na ich stabilność. Sfery nie są toksyczne wobec fibroblastów 3T3 *in vitro*. Sfery MS1 wykazują większe powinowactwo do chemioterapeutyków – doksorubicyny oraz mitoksantronu.

**Wnioski:** Sfery z bioinżynierowanego jedwabiu pajęczego MS1 oraz MS2 wykazują różne właściwości fizyczne oraz różne powinowactwo do badanych leków. Nietoksyczność, biodegradowalność oraz rozmiar pozwalający na wnikanie do środowiska guza w połączeniu ze zdolnością inkorporacji leków stanowi o potencjale sfer z bioinżynierowanego jedwabiu pajęczego jako nośników leku w terapii nowotworów.

**Słowa kluczowe:** terapia nowotworów, doksorubicyna, nanocząstki, jedwab pajęczycy, nośniki leku.

[84]

## Rola ekspresji czynnika transkrypcyjnego SOX18 w rakach jajnika

**Bartosz Puła<sup>1</sup>, Christopher Kobierzycki<sup>1</sup>, Daniel Soliński<sup>1</sup>, Mateusz Olbromski<sup>1</sup>, Maciej Zabel<sup>1</sup>, Witold Kędzia<sup>2</sup>, Ewa Nowak-Markwitz<sup>2</sup>, Piotr Dziegiel<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>Chair and Department of Histology and Embryology, Wrocław Medical University, Wrocław, Poland

<sup>2</sup>Department of Oncological Gynecology, Poznań University of Medical Sciences, Poznań, Poland

<sup>3</sup>Chair of Physiotherapy and Occupational Therapy in Conservative Medicine, Academy of Physical Education, Wrocław, Poland

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich, Wrocław, Polska

<sup>2</sup>Klinika Ginekologii Onkologicznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, Polska

<sup>3</sup>Katedra Fizjoterapii i Terapii Zajęciowej w Medycynie Zachowawczej i Zabiegowej,

Akademia Wychowania Fizycznego, Wrocław, Polska

### Abstract

**Introduction:** SOX18 is a transcription factor known to be involved in hair follicle, blood and lymphatic vessel development, and wound healing processes. In addition, it has been reported that SOX18 may influence the tumour growth. Until now, the role of SOX18 expression in ovarian cancer (OC) has not been determined.

**Aim of the study** was to assess the role of SOX18 expression of OC cells in regard to patients clinico-pathological features.

**Material and methods:** SOX18 expression was assessed in cancer cells of 85 OC patients treated with based platinum chemotherapy utilizing the immunohistochemical method.

**Results:** SOX18 was expressed in cancer cell nuclei as well as cytoplasm. Higher nuclear SOX18 expression was associated with presence of residual disease following surgical treatment ( $p = 0.0158$ ) and advanced disease stage ( $p = 0.0056$ ). Univariate survival analysis revealed that high SOX18 ( $p = 0.0125$ ) expression, presence of residual disease ( $p < 0.0001$ ) and advanced disease stage ( $p < 0.0324$ ) predicted poor patient outcome.

**Conclusions:** Our results suggest that high SOX18 expression in cancer cells may be a new predictive factor for OC.

**Key words:** ovarian cancer, SOX18.

### Streszczenie

**Wstęp:** Czynnikiem transkrypcyjnym SOX18 bierze udział w rozwoju mieszków włosowych, naczyń krwionośnych oraz chłonnych, jak również w procesie gojenia się ran. Wykazano ponadto, że SOX18 może wpływać na wzrost komórek nowotworowych. Dotychczas nie określono roli ekspresji ww. czynnika w rakach jajnika.

**Cel pracy:** Określenie znaczenia ekspresji SOX18 w komórkach nowotworowych raka jajnika z uwzględnieniem danych kliniczno-patologicznych pacjentek.

**Materiał i metody:** Ekspresja SOX18 została określona z użyciem metody immunohistochemicznej w komórkach nowotworowych 85 pacjentek z rakiem jajnika poddanych chemioterapii opartej na pochodnych platyny.

**Wyniki:** Ekspresja SOX18 obserwowana była zarówno w jądrze, jak i cytoplazmie komórek nowotworowych. Wykazano istotną statystycznie zależność silnej, jądrowej ekspresji SOX18 z obecnością choroby resztkowej po zabiegu cytoredukcyjnym ( $p = 0,0158$ ) oraz klinicznym zaawansowaniem choroby ( $p = 0,0056$ ). Jednoczynnikowa analiza przeżyć wykazała, że wysoka jądrowa ekspresja SOX18 ( $p = 0,0125$ ), obecność choroby resztkowej po zabiegu cytoredukcyjnym ( $p < 0,0001$ ) oraz kliniczne zaawansowanie choroby ( $p < 0,0324$ ) były związane z istotnie statystycznie gorszym rokowaniem pacjentek.

**Wnioski:** Nasze wyniki wskazują, że wysoka jądrowa ekspresja SOX18 może być niekorzystnym czynnikiem predykcyjnym raka jajnika.

**Słowa kluczowe:** rak jajnika, SOX18.

[85]

## Hyper interleukin 11 (H11) stimulates thrombopoiesis during cancer treatment

### *Hiperinterleukina 11 (H11) stymuluje trombopoezę w przebiegu leczenia chorób nowotworowych*

Hanna Dams-Kozłowska, Eliza Kwiatkowska-Borowczyk, Katarzyna Gryśka, Andrzej Mackiewicz

Greater Poland Cancer Center, Poznan, Poland  
Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland  
Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu, Polska  
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Polska

#### Abstract

**Introduction:** In oncology thrombocytopenia significantly increases the risk of bleeding and limits therapeutic dose intensity and causes dose delay. The current thrombocytopenia standard treatment is the platelet transfusion. However, the procedure is associated with number of potential risks e.g. alloimmunisation. Thus, the intensive search for novel therapeutic strategies including new thrombopoietic agents is required.

**Aim of the study:** Analysis of activity of H11 in thrombocytopenia model – *in vivo* study.

**Material and methods:** Hyper interleukin 11 (H11) was constructed based on soluble interleukin 11 receptor alpha (sIL-11R) and IL-11. H11 was produced in baculovirus system and purified by anion chromatography. For *in vivo* study Balb/c mice were used. The myelosuppressive regimen was achieved by sublethal irradiation from a <sup>137</sup>Cs source followed by an injection of carboplatin. Control PBS or cytokines H11 and rh IL-11 were administered subcutaneously in dose 100 µg/kg for 7 days. The peripheral hematology was monitored using hematology analyzer. Bone marrow cells were counted microscopically. The bone marrow and spleen progenitors were determined using colony-forming cell assay.

**Results:** The irradiation and carboplatin regimen resulted in severe myelosuppression characterized by prolonged thrombocytopenia. Administration of IL-11 or H11 reduced the period of thrombocytopenia and myelosuppression, increased the number of bone marrow cells, and increased the number of megakaryocyte, erythroid, granulocyte/macrophage progenitors comparing with the vehicle-treated controls. Although, H11 was administered at three times lower molar concentration, its effect was comparable or slightly better comparing with IL-11 treated group.

**Conclusions:** H11 is a novel candidate for treatment of thrombocytopenia.

**Key words:** thrombocytopenia, interleukin 11, Hyper cytokine.

Grant from NSC, no 2011/01/B/NZ4/05796.

#### Streszczenie

**Wstęp:** Małopłytkowość jest poważnym problemem w leczeniu onkologicznym. Zmniejszenie liczby płytek ogranicza stosowanie dawek terapeutycznych leków bądź opóźnia kolejne cykle leczenia. Główną formą zapobiegania lub leczenia małopłytkowości jest transfuzja płytek krwi. Transfuzja jednak może wywoływać reakcje niepożądane, np. autoimmunizację. Z tego powodu prowadzone są intensywne poszukiwania nowych rozwiązań leczenia małopłytkowości.

**Cel pracy:** Analiza aktywności hiperinterleukiny 11 (H11) w mysim modelu trombocytopenii.

**Materiał i metody:** Sztuczną cytokinę H11 skonstruowano na bazie rozpuszczalnego receptora interleukiny 11 (sIL-11R) i IL-11. H11 produkowano w bakulowirusowym systemie oraz oczyszczano za pomocą chromatografii jonowymiennej. Badania *in vivo* przeprowadzono z użyciem myszy Balb/c. Mielosupresję uzyskiwano poprzez napromienianie myszy ze źródła cezowego Cs-137 i podawanie karboplatyny. Myszom podawano podskórnie PBS albo cytokiny H11 i IL-11 w dawce 100 µg/kg przez 7 dni. Morfologię krwi badano z użyciem analizatora hematologicznego. Komórki szpiku liczone za pomocą mikroskopu. Komórki progenitorowe szpiku i śledziony oceniano przy użyciu testów klonogennych.

**Wyniki:** Napromienianie i podanie chemioterapeutyku wywoływało ostrą mielosupresję charakteryzującą się długoczasową małopłytkowością. Podanie IL-11 lub H11 powodowało zredukowanie okresu małopłytkowości i mielosupresji, zwiększenie liczby komórek szpiku, zwiększenie liczby komórek pregenitorowych w porównaniu z grupą kontrolną. Mimo że H11 podawana była w trzykrotnie mniejszym stężeniu molarnym, efekt terapeutyczny był porównywalny lub nieznacznie lepszy w porównaniu z grupą leczoną IL-11.

**Wnioski:** Białko H11 jest molekułą o olbrzymim potencjale leczenia małopłytkowości.

**Słowa kluczowe:** małopłytkowość, interleukina 11, hiper-cytokina.

Grant z NSC, nr 2011/01/B/NZ4/05796.

[86]

## Immunophenotyping and functional evaluation of lung cancer-associated granulocyte cells

*Ocena immunofenotypowa i czynnościowa komórek granulocytarnych towarzyszących rakom płuc*

Joanna Maciejewska<sup>1</sup>, Mariusz Kaczmarek<sup>1</sup>, Marta Marciniak<sup>1</sup>, Agata Kolecka-Bednarczyk<sup>1</sup>, Łukasz Szychalski<sup>2</sup>, Piotr Gabryel<sup>2</sup>, Rodryg Ramlau<sup>2</sup>, Wojciech Dyszkiewicz<sup>2</sup>, Jan Sikora<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology, Chair of Immunology, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland

<sup>2</sup>Department of Lung and Thoracic Cancers, Clinic of Thoracosurgery, Poznan University of Medical Sciences; Wielkopolska Center of Pulmonology and Thoracosurgery, Poznan, Poland

<sup>1</sup>Zakład Immunologii, Katedra Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, Polska

<sup>2</sup>Pracownia Nowotworów Płuca i Klatki Piersiowej, Klinika Torakochirurgii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego; Wielkopolskie Centrum Pulmonologii i Torakochirurgii, Poznań, Polska

### Abstract

**Introduction:** Neutrophils are the most abundant immune system cells and their main function is to protect organism from penetrating pathogens. Recently researchers emphasize their role in course of cancer disease. These cells, depends on the microenvironmental agents, reveal differentiated phenotype which is defined as antitumorigenic – N1 or protumorigenic – N2. Cells which display diverse activation pattern, demonstrate also significant functional differences. Granulocytic myeloid-derived suppressor cells (GrMDSC) are cluster of cells, which appear and spread in organism in their immature form during pathological conditions, i.e. during cancer disease. Their behavior in tumour microenvironment is significantly less known than neutrophils. Literature data suggest, that their functional character is similar to neutrophils N2.

**Aim of the study:** Destination of this project is immunophenotyping and functional evaluation of GrMDSCs and neutrophils associated with lung cancer in their ability to phagocytosis and intracellular killing dependent on oxidative mechanisms.

**Material and methods:** Neutrophils and GrMDSC from pleural effusions with different etiology, also from tumours, pulmonary vein blood and peripheral blood from patients with non-small cell lung cancers were assessed using flow cytofluorometer.

**Results:** Studied cells showed differences in the expression of selected antigens and phagocytic activity, also in ability to intracellular killing dependent on reactive oxygen species.

**Conclusions:** The results will help to better characterize the immunological importance of granulocytic cells associated with tumour inside NSCLC microenvironment, which may increase the diagnostic potential and set new targets for personalized cancer therapy.

**Key words:** neutrophils, phagocytosis, reactive oxygen species.

### Streszczenie

**Wstęp:** Neutrofile to najliczniejsze komórki układu immunologicznego, których główną funkcją jest obrona organizmu przed wnikającymi patogenami. Od niedawna badacze podkreślają ich rolę w przebiegu procesu nowotworowego. Komórki te, w zależności od czynników mikrośrodowiska, wykazują zróżnicowany fenotyp określany jako przeciwnowotworowy – N1, bądź pronowotworowy – N2. Komórki charakteryzujące się różnym wzorcem aktywacji wykazują znaczące różnice funkcjonalne. Granulocytarne komórki supresorowe pochodzenia szpikowego (*granulocytic myeloid derived suppressor cells* – GrMDSC) stanowią grupę komórek pojawiających się i rozprzestrzeniających w organizmie w formie niedojrzałej w stanach patologicznych, np. w chorobie nowotworowej. Ich zachowanie w mikrośrodoisku nowotworu jest znacznie mniej poznane niż neutrofilii. Dotychczasowe doniesienia literaturowe sugerują, że ich charakter funkcjonalny jest podobny do neutrofilów typu N2.

**Cel pracy:** Ocena immunofenotypowa i czynnościowa komórek GrMDSC oraz neutrofilii towarzyszących rakom płuc w zakresie ich zdolności do fagocytozy oraz zabijania wewnątrzkomórkowego zależnego od mechanizmów tlenowych.

**Materiał i metody:** Neutrofile oraz GrMDSC z wysięków opłucnowych o różnej etiologii, z guzów, z krwi z żyły płucnej i krwi obwodowej od chorych z niedrobnokomórkowym rakiem płuc (NDRP) poddano ocenie przy użyciu cytofluorometru przepływowego.

**Wyniki:** Wykazano różnice w obrębie ekspresji wybranych antygenów oraz aktywności fagocytarnej i zdolności do zabijania wewnątrzkomórkowego zależnego od reaktywnych form tlenu.

**Wnioski:** Uzyskane wyniki pomogą lepiej scharakteryzować znaczenie immunologiczne granulocytarnych komórek towarzyszących nowotworom w mikrośrodoisku NDRP, co może zwiększyć potencjał diagnostyczny oraz wytyczyć nowe cele dla spersonalizowanej terapii nowotworu.

**Słowa kluczowe:** neutrofile, fagocytoza, reaktywne formy tlenu.

[87]

## The relationship between the expression of vascular endothelial growth factors (VEGFs) and vessels density in benign and malignant adrenal pheochromocytoma

*Zależność pomiędzy ekspresją naczyniowych czynników wzrostu (VEGFs) oraz gęstością naczyń w łagodnych i złośliwych guzach chromochłonnych (pheochromocytoma)*

Anastazja Stój<sup>1</sup>, Magdalena Białas<sup>1</sup>, Grzegorz Dyduch<sup>1</sup>, Krzysztof Okoń<sup>1</sup>, Joanna Dudata<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathomorphology, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland

<sup>2</sup>Chair of Medical Physics and Biophysics, Faculty of Physics and Applied Computer Science, AGH University of Science and Technology, Krakow, Poland

<sup>1</sup>Katedra Patomorfologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie, Polska

<sup>2</sup>Katedra Fizyki Medycznej i Biofizyki Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej, Akademia Górniczo-Hutnicza, Kraków, Polska

### Abstract

**Introduction:** Pheochromocytomas are tumors arising from chromaffin cells of adrenal medulla. It is difficult to predict their clinical course on the basis of histology.

**Aim of the study** was to determine the expression of vascular growth factors (VEGF-A, -C and -D) and vessels density in subcapsular and central parts of the tumor to find whether there is a correlation between VEGFs expression and vessels density and if vascular density may be helpful in predicting benign or malignant clinical course of pheochromocytoma.

**Material and methods:** The material under study consisted of 62 pheochromocytoma, 5 of them with confirmed malignant clinical course (three with distant metastasis, two with local recurrence). Vessels density was determined by two methods (Chalkley and hot-spots) after labeling with the two different antibodies: CD31 and CD105. The expression of VEGFs was determined as a sum of the percentage of positive cells and intensity of staining of the tumor cells.

**Results:** VEGF-A showed more pronounced expression (mean value: 4.57) than VEGF-C and VEGF-D (mean values respectively: 3.58 and 1.93). VEGF-A expression was correlated with the subcapsular ( $p < 0.05$ ) and central ( $p < 0.05$ ) vascular density in pheochromocytomas in both counting methods. There was no correlation between the expression of other vascular growth factors (VEGF-C and VEGF-D) and vascular density. There was no statistically significant difference between the expression of vascular growth factors and vascular density in groups of benign and malignant pheochromocytomas.

### Conclusions:

1. In pheochromocytomas VEGF-A shows the strongest expression.
2. VEGF-A expression is correlated with vascular density in both: subcapsular and central parts of the tumor.
3. There is no difference in vascular density in benign and malignant pheochromocytoma.

**Key words:** pheochromocytoma, vascular growth factors, vessels density.

### Streszczenie

**Wstęp:** Pheochromocytoma to nowotwór wywodzący się z komórek chromafinowych rdzenia nadnercza o trudnym do przewidzenia przebiegu klinicznym.

**Cel pracy:** Określenie ekspresji naczyniowych czynników wzrostu (VEGF-A, -C i -D), policzenie gęstości naczyń w podtorebkowych i centralnych częściach guza oraz odpowiedź na pytanie, czy istnieje korelacja między ekspresją VEGFs a gęstością naczyń w guzach chromochłonnych oraz czy określanie gęstości naczyń może być pomocne w prognozowaniu przebiegu klinicznego guza chromochłonnego.

**Materiał i metody:** Badano 62 przypadki pheochromocytoma, 5 z nich o potwierdzonym złośliwym przebiegu klinicznym (w trzech stwierdzono obecność przerzutów odległych, dwa dały wznowę miejscową). Gęstość naczyń określono dwoma metodami (metodą Chalkleya i *hot-spots*) po wyznaczeniu naczyń za pomocą przeciwciał CD31 i CD105. Ekspresję czynników wzrostu określono, sumując procent pozytywnych komórek guza i nasilenie odczynu.

**Wyniki:** Czynnikiem wzrostu naczyń VEGF-A wykazał silniejszą ekspresję (średnia wartość 4,57) niż czynniki VEGF-C i VEGF-D (średnie wartości: 3,58 i 1,93). Ekspresja VEGF-A korelowała z gęstością naczyń w podtorebkowych ( $p < 0,05$ ) i w centralnych ( $p < 0,05$ ) częściach guza chromochłonnego przy obydwu metodach liczenia gęstości naczyń. Nie wykazano istnienia korelacji pomiędzy ekspresją pozostałych czynników wzrostu naczyń (VEGF-C i VEGF-D) a gęstością naczyń. Nie ma istotnych statystycznie różnic pomiędzy ekspresją naczyniowych czynników wzrostu i gęstością naczyń w grupach łagodnych i złośliwych guzów chromochłonnych.

### Wnioski:

1. W guzach chromochłonnych najsilniejszą ekspresję wykazuje VEGF-A.
2. Ekspresja VEGF-A koreluje z gęstością naczyń w podtorebkowych oraz centralnych częściach nowotworu.
3. Nie ma różnic w gęstości naczyń w guzach o łagodnym i złośliwym przebiegu klinicznym.

**Słowa kluczowe:** pheochromocytoma, naczyniowe czynniki wzrostu, gęstość naczyń.

[88]

## Synteza kropek kwantowych CuInS<sub>2</sub>/ZnS jako znaczników fluorescencyjnych do obrazowania nowotworów

Martyna Michalska<sup>1,2</sup>, Anna Florczak<sup>1,3,4</sup>, Raphaël Schneider<sup>3</sup>, Stefan Jurga<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>NanoBioMedical Centre, Adam Mickiewicz University, Poznan, Poland

<sup>2</sup>Department of Macromolecular Physics, Faculty of Physics, Adam Mickiewicz University, Poznan, Poland

<sup>3</sup>Laboratoire Réactions et Génie de Procédés, Université de Lorraine, France

<sup>4</sup>Department of Diagnostics and Cancer Immunology, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland

<sup>1</sup>Centrum NanoBioMedyczne, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań, Polska

<sup>2</sup>Zakład Fizyki Makromolekularnej, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań, Polska

<sup>3</sup>Laboratoire Réactions et Génie de Procédés, Université de Lorraine, Francja

<sup>4</sup>Zakład Diagnostyki i Immunologii Nowotworów, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, Polska

### Abstract

**Introduction:** Quantum dots (QDs) are semiconductor nanocrystals (NCs) that possess unique optical properties attributed to the quantum confinement effect. Thanks to their broad absorption profiles the simultaneous excitation of multiple colors of QDs is possible unlike the conventional organic dyes. Moreover, the QDs surface can be functionalized by conjugation with various molecules enabling the NCs to be dispersed in water and to be specifically addressed for bio-applications.

**Aim of the study:** During the last decade Cd-based QDs have been a major focus in the form of size and shape-controlled NCs. However, despite their great optical properties, the toxicity of Cd and the production of reactive oxygen species from these NCs shed a doubt on the future applicability of these QDs, particularly in view of recent environmental regulations. Thus, there is a big interest in developing new synthetic routes for production of Cd-free QDs.

**Material and methods:** One of an alternative materials are ternary I-III-VI NCs, including CuInS<sub>2</sub>, which possess lower toxicity, high absorption coefficient, high stability, and tunable emissions in VIS-NIR region.

**Results:** Here, we report a new synthesis of CuInS<sub>2</sub>/ZnS QDs with PL emission at ca. 610 nm, and photoluminescence quantum yield (QY) up to 65%. The successful transfer of these dots into water was achieved via overcoating with the amphiphilic polymer, poly(maleic anhydride-alt-1-octadecene) (PMAO). The products were characterized by means of UV-vis and fluorescence spectroscopies, X-ray diffraction, dynamic light scattering and high resolution transmission electron microscopy.

**Conclusions:** The PMAO-coated QDs emit at ca. 640 nm with QY of 35%. Such prepared NCs will be functionalized and used in cancer cells imaging.

**Key words:** bioimaging, quantum dots.

### Streszczenie

**Wstęp:** Krople kwantowe (*quantum dots* – QDs) to półprzewodnikowe nanokryształy (*nanocrystals* – NCs) o bardzo atrakcyjnych właściwościach optycznych, wynikających z efektu ograniczenia kwantowego. Wykazują m.in. stabilną, jasną, zależną od rozmiaru kropek fluorescencję i posiadają szerokie widmo absorpcji. Poprzez modyfikację ich powierzchni, która pozwala dyspergować je w wodzie, oraz funkcjonalizacji mogą one znaleźć zastosowanie w biologii i medycynie, m.in. jako znaczniki fluorescencyjne.

**Cel pracy:** W przeciągu ostatniej dekady główny temat badań stanowiły QDs oparte na bazie kadmu. Jednakże, pomimo ich atrakcyjnych właściwości, toksyczność Cd oraz produkcja reaktywnych form tlenu przez te nanokryształy podają w wątpliwość użyteczność tych materiałów w przyszłości, zwłaszcza w dobie aktualnych ograniczeń ze względów ekologicznych. Poszukuje się zatem nowych ścieżek syntetycznych do produkcji wolnych od kadmu QDs.

**Materiał i metody:** Jeden z alternatywnych materiałów stanowią trzeciorzędowe I-III-VI NCs, w tym CuInS<sub>2</sub>, które wykazują niższą toksyczność, posiadają wyższy współczynnik absorpcji, lepszą stabilność oraz możliwość dostrajania emisji w zakresie VIS-NIR.

**Wyniki:** W tej pracy zaprezentowano nową syntezę kropek rdzeń/powłoka CuInS<sub>2</sub>/ZnS emitujących przy ok. 610 nm, z wydajnością kwantową (*quantum yield* – QY) do 65%. Kolejno, te NCs zostały z sukcesem zdyspergowane w wodzie poprzez otoczenie ich amfifilowym polimerem PMAO (*poly(maleic anhydride-alt-1-octadecene)*). Scharakteryzowano właściwości optyczne produktów, ich strukturę krystaliczną, morfologię i cytotoxyczność.

**Wnioski:** Ostatecznie otrzymano nanokropki otoczone PMAO z maksimum emisji przy ok. 640 nm, których QY wynosi 35%. Tak przygotowany materiał zostanie sfunkcjonalizowany w celu obrazowania komórek nowotworowych.

**Słowa kluczowe:** bioobrazowanie, kropki kwantowe.

[89]

## Optymalizacja warunków wytwarzania sfer z bioinżynierowanego jedwabiu pajęczego

Kamil Kucharczyk<sup>1,2</sup>, Katarzyna Kaźmierska<sup>1,2,3</sup>, Edyta Felcyn<sup>4</sup>, Hanna Dams-Kozłowska<sup>1,2</sup>, Andrzej Mackiewicz<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland

<sup>2</sup>Greater Poland Cancer Center, Poznan, Poland

<sup>3</sup>NanoBioMedical Centre, Adam Mickiewicz University, Poznan, Poland

<sup>4</sup>BioContract, Poznan, Poland

<sup>1</sup>Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, Polska

<sup>2</sup>Wielkopolskie Centrum Onkologii, Poznań, Polska

<sup>3</sup>Centrum NanoBioMedyczne, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań, Polska

<sup>4</sup>BioContract, Poznań, Polska

### Abstract

**Introduction:** Spider silk is a biomaterial combining superb mechanical properties, biocompatibility and biodegradability. Bioengineered silk can be easily processed into various morphological forms such as fibers, films or scaffolds. It can also form micro- and nanospheres which may serve as drug carriers in anticancer therapy.

**Aim of the study:** Construction of bioengineered spider silk proteins, production and characteristics of silk spheres.

**Material and methods:** Two bioengineered silks were constructed: MS2 and EMS2. Their sequences were based on the consensus motif of MaSp2 spidroin from *N. clavipes*. MS2 consists of 15 repeat units and 15 times repeated unit of EMS2 was modified by glutamic acid addition. The proteins were produced in *E. coli* expression system and purified by thermal denaturation method. To prepare spheres the silks solutions were mixed with  $K_3PO_4$  at different concentrations and pH of  $K_3PO_4$  buffer and various concentration of proteins. Morphology and size of spheres were characterized using scanning electron microscopy. Zeta potential was measured using Zetasizer analyzer. The cytotoxicity of spheres was investigated by MTT assay.

**Results:** Constructed bioengineered silks – MS2 and EMS2 formed spheres in conditions above a critical  $K_3PO_4$  concentration – 1M for MS2 and 2M for EMS2. SEM analysis demonstrated differences in spheres morphology and size what depended on the type and concentration of protein and the pH of potassium phosphate buffer. Spheres made of MS2 and EMS2 differed in Zeta potential. The analysis of cytotoxicity revealed that both spheres were not cytotoxic.

**Conclusions:** The properties of spheres depend on type of the protein and conditions during their preparation –  $K_3PO_4$  concentration, pH and protein concentration. The spheres with the best characteristics can be used for drug loading and delivery to tumor cells.

**Key words:** bioengineered spider silk, spheres formation.

### Streszczenie

**Wstęp:** Jedwab pajęczy jest biomateriałem, łączącym niewyższe właściwości mechaniczne oraz biokompatybilność i biodegradowalność. Z bioinżynierowanego jedwabiu pozyskujemy różne formy morfologiczne, takie jak włókna, filmy czy rusztowania. Może on także formować mikro- i nanosfery, służące jako nośniki leków w terapii przeciwnowotworowej.

**Cel pracy:** Konstrukcja bioinżynierowanych białek jedwabiu pajęczego, wytwarzanie i charakterystyka sfer.

**Materiał i metody:** Konstruowano dwa bioinżynierowane białka jedwabiu: MS2 i EMS2. Sekwencje białek oparto na sekwencji konsensusowej spidroiny MaSp2 pająka *Nephilla clavipes*. MS2 otrzymywano, ligując 15 sekwencji konsensusowych, natomiast sekwencje powtarzające się EMS2 modyfikowano dodaniem kwasu glutaminowego. Białka produkowano w bakteryjnym systemie ekspresyjnym i oczyszczano metodą termicznej denaturacji. Sfery wytwarzano przez mieszanie roztworów białek z  $K_3PO_4$  w różnym stężeniu fosforanu, pH buforu fosforanowego oraz różnym stężeniu jedwabiu. Morfologię i rozmiar sfer analizowano, wykorzystując skaningowy mikroskop elektronowy. Potencjał dzeta mierzono przy użyciu analizatora Zetasizer. Cytotoksyczność sfer badano za pomocą testu MTT.

**Wyniki:** Otrzymane białka bioinżynierowanego jedwabiu – MS2 i EMS2, formowały sfery w warunkach powyżej krytycznego stężenia  $K_3PO_4$ : 1M dla MS2 i 2M dla EMS2. Analiza SEM wykazała różnice w morfologii i rozmiarze sfer, co zależało od rodzaju i stężenia białka oraz pH buforu fosforanowego. Sfery MS2 i EMS2 różniły się potencjałem dzeta. Badanie cytotoksyczności wykazało, że oba rodzaje sfer nie są toksyczne.

**Wnioski:** Właściwości sfer zależą od rodzaju użytego białka oraz warunków wytwarzania – stężenia  $K_3PO_4$ , jego pH oraz stężenia jedwabiu. Sfery o najbardziej korzystnych cechach mogą być wykorzystane do ładowania i dostarczania leków do komórek nowotworowych.

**Słowa kluczowe:** bioinżynierowany jedwab pajęczy, formowanie sfer.

[90]

## Nanohybrydy metaloorganiczne MOF jako nowe nośniki leków

Patryk Florczak, Grażyna Bartkowiak, Saadat Sulaimankulova, Stefan Jurga

NanoBioMedical Centre, Adam Mickiewicz University, Poznan, Poland  
Centrum NanoBioMedyczne, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań, Polska

### Abstract

**Introduction:** A challenge in anticancer therapy is the simultaneous ability of both delivering medicaments, to the right place in the body, and trace the therapeutic progress. The development of novel drug nanocarriers which protect organism from toxic side effects, fast drug degradation and capable of enabling the traceability of the delivery process is proposed. Aim of the study is the synthesis of new anticancer drug carriers. Synthesis will involve the preparation of nanocomposite, core-shell system, in which the core consists of magnetite nanoparticles responsible for imaging (MRI). Whereas, the as shell is used a MOF material, whose task will be to trap the anticancer drug agent. Attachment of a peptide to obtain composite will allow the targeted therapy.

**Material and methods:** The first stage of preparation of drug nanocarrier is the synthesis of nanoparticles of magnetite. The next step is the growth of the MOF shell on the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> particles. An important stage of research is encapsulation of doxorubicin into the porous MOF. The final stage is attachment of a peptide having affinity for the HER2 receptor in cancer cells. After each of the stages of preparation, resulting systems will be characterized: XRD, EPR, SQUID, FT-IR, BET, SEM, TEM, NMR, MRI. Is also planned a study of doxorubicin release and cytotoxicity tests *in vitro* on breast cancer cell line.

**Results:** Magnetite nanoparticles obtained using the thermal decomposition method of iron oleate complex.

**Conclusions:** The obtained particles have size distribution in the range of 10–12 nm. Using co-precipitation method, particles from 12 to 20 nm were obtained, and the pure phase of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> was confirmed (XRD). Pulsed plasma method in liquid gives particles with a wide distribution of sizes of 25–60 nm, XRD result showed the combination of Fe and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> phases.

**Key words:** magnetite, MOF, drug carrier, encapsulation, doxorubicin.

### Streszczenie

**Wstęp:** Wyzwaniem w nowoczesnej terapii antynowotworowej jest jednoczesne dostarczanie terapeutycznej dawki leku w odpowiednie miejsce w organizmie oraz możliwość obrazowania postępów terapii. Lecznicze substancje aktywne posiadają ograniczenia w zastosowaniu. Nanonośniki leków mają zapewnić ochronę leku przed przedwczesną degradacją oraz organizmu przed szkodliwym działaniem leku.

**Cel pracy:** Synteza nowych nośników leków przeciwnowotworowych. Synteza ma polegać na otrzymaniu nanokompozytów typu rdzeń-powłoka. Rdzeniami będą nanocząstki magnetytu odpowiedzialne za obrazowanie (MRI), natomiast powłoką materiał MOF, którego rolą będzie uwięzienie leku przeciwnowotworowego. Przyłączenie peptydu do otrzymanego kompozytu umożliwi terapię celowaną.

**Materiał i metody:** Pierwszym etapem preparatyki nanonośnika leku jest synteza nanocząstek magnetytu. Następnym krokiem jest synteza materiału MOF [MIL-100(Fe)] na powierzchni cząstek magnetycznych. Kolejnym etapem jest enkapsulacja doksorubicyny. Finalnie do otrzymanych układów zostanie przyłączony peptyd mający powinowactwo do receptorów HER2. Na poszczególnych etapach preparatyki otrzymywane układy charakteryzowano za pomocą XRD, EPR, SQUID FT-IR, BET, SEM, TEM, NMR, MRI. Planowane są również badania sposobu uwalniania substancji aktywnej oraz ocena cytotoksyczności *in vitro*, na nowotworowej linii komórkowej raka piersi.

**Wyniki:** Najbardziej obiecujące wyniki syntez nanocząstek magnetytu uzyskano, stosując metodę termicznej dekompozycji kompleksu oleinianu żelaza.

**Wnioski:** Syntetyzowane cząstki posiadają dystrybucję rozmiarów w granicach 10–12 nm. Metodą współstrąceniową otrzymano cząstki od 12 do 20 nm, uzyskano czystą fazę Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (XRD). Metodą pulsacyjnej plazmy pozyskano cząstki o szerokiej dystrybucji rozmiarów 25–50 nm, oprócz Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> obserwowano dodatkowo Fe.

**Słowa kluczowe:** magnetyt, MOF, nanonośnik leku, enkapsulacja, doksorubicyna.



[91]

## Ocena polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNPs) i ich wpływ na potencjał do prezentacji antygeny przez komórki dendrytyczne u pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca

Agata Kolecka-Bednarczyk<sup>1</sup>, Magdalena Frydrychowicz<sup>1</sup>, Bartłomiej Budny<sup>2</sup>, Piotr Gabryel<sup>3</sup>, Małgorzata Rydzanicz<sup>4</sup>, Mariusz Kaczmarek<sup>1</sup>, Wojciech Dyszkiewicz, Joanna Wesoly<sup>4</sup>, Katarzyna Ziemińska<sup>2</sup>, Grzegorz Dworacki<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology, Chair of Clinical Immunology, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland

<sup>2</sup>Chair of Endocrinology, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland

<sup>3</sup>Department and Division of Thoracosurgery, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland

<sup>4</sup>Department of Human Molecular Genetics, Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Adam Mickiewicz University, Poznan, Poland

<sup>1</sup>Zakład Immunologii, Katedra Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

<sup>2</sup>Katedra Endokrynologii, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

<sup>3</sup>Klinika i Oddział Torakochirurgii, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

<sup>4</sup>Zakład Genetyki Molekularnej Człowieka, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

### Abstract

**Introduction:** Non-small cell lung cancer is one of the most common cancers in men and composes 80% of lung cancer. It develops as a result of the accumulation of genetic defects including SNP. They lead to the development of not only the cancer cell itself, but also stimulate the formation of its microenvironment, and set a number of mechanisms for tumor escape from the immune system. Their essential element is the disorder of antigen presentation.

**Aim of the study:** The aim was the molecular characterization of tumor and the assessment of the impact of these changes on the potential for antigen presentation by dendritic cells in patients with non-small cell lung cancer.

**Material and methods:** The biological material is obtained from: peripheral blood, blood collected from tumor draining area pulmonary vein and tumor tissue, from 28 patients with non-small cell lung cancer and qualified for radical surgery treatment. The molecular characterization of the tumor tissue was performed by SNP microarrays – Cancer Panel – Illumina platform Golden Gate Assay. Determination of the number of dendritic cells and their degree of maturity was estimated by expression of molecules HLAII-DR, CD80, CD86- performed by flow cytometry using a BD FACS Canto-II.

**Results:** Analysis of 1,400 SNPs in 400 genes showed a wide variety of changes, their number in individual genes and the number of genes were highly variable in patients. The score of dendritic cells showed a decrease of antigen presentation capacity – the largest original tumor microenvironment emerging trend to increase the number of immature dendritic cells in peripheral blood.

**Conclusions:** Non-small cell lung cancer is heterogeneous tumor, in which the SNP include various genes. It is difficult to develop a molecular profile, which affects the immunosuppressive mechanisms associated with antigen presentation.

**Key words:** non-small cell lung cancer, dendritic cells, antigen presentation, SNP.

### Streszczenie

**Wstęp:** Niedrobnokomórkowy rak płuca jest jednym z najczęściej występujących nowotworów u ludzi i stanowi 80% nowotworów złośliwych płuca. Rozwijają się w wyniku nagromadzenia wielu wad genetycznych, w tym zmian pojedynczego nukleotydu (*single nucleotide polymorphism* – SNP). Prowadzą one do rozwoju komórki nowotworowej, stymulują tworzenie jej mikrośrodowiska, i uruchamiają szereg mechanizmów ucieczki nowotworu spod nadzoru immunologicznego. Ich istotnym elementem jest zaburzenie prezentacji antygeny.

**Cel pracy:** Charakterystyka molekularna guza i ocena wpływu tych zmian na potencjał do prezentacji antygeny przez komórki dendrytyczne u pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca.

**Materiał i metody:** Materiał biologiczny: krew obwodowa, krew z żyły płucnej splotu guza, guz. Materiał pozyskano od 28 pacjentów zakwalifikowanych do radykalnego leczenia z powodu niedrobnokomórkowego raka płuca. Molekularna charakterystyka guza, wykonana została przy użyciu metody mikromacierzy – Cancer SNP Panel – Illumina Golden Gate Assay. Oznaczenie liczby komórek dendrytycznych i stopnia ich dojrzałości poprzez ocenę ekspresji cząsteczki HLAII-DR, CD80, CD86 zostało wykonane metodą cytometrii przepływowo- BD FACS Canto II.

**Wyniki:** Analiza 1400 SNP zlokalizowanych w 400 genach wykazała różnorodną zmiany. Ich liczba w poszczególnych genach i liczba genów była bardzo zmienna. Ocena komórek dendrytycznych wykazała spadek potencjału do prezentacji antygeny – największy w mikrośrodowisku guza przy pojawiającej się tendencji do zwiększania liczby niedojrzałych komórek dendrytycznych we krwi obwodowej.

**Wnioski:** Niedrobnokomórkowy rak płuca jest nowotworem heterogennym. Zmiany pojedynczego nukleotydu obejmują różne geny i trudno jest określić charakterystyczny profil molekularny, który wpływa na mechanizmy nadzoru immunologicznego związanego z prezentacją antygeny.

**Słowa kluczowe:** niedrobnokomórkowy rak płuca, komórki dendrytyczne, prezentacja antygeny, SNP.

[92]

## Próba indukcji cech macierzystopodobnych w komórkach nowotworowych raka jajnika za pomocą warunków hodowli

Aleksandra Klemba<sup>1,2,3</sup>, Sławomir Lewicki<sup>4</sup>, Robert Zdanowski<sup>4</sup>, Anna Czarnecka<sup>2</sup>, Cezary Szczylik<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>University of Warsaw, Warsaw, Poland

<sup>2</sup>Military Institute of Medicine, Warsaw, Poland

<sup>3</sup>Fundacja Onkologii Doświadczalnej i Klinicznej, Warsaw, Poland

<sup>4</sup>Military Institute of Hygiene and Epidemiology, Warsaw, Poland

<sup>1</sup>Uniwersytet Warszawski, Warszawa, Polska

<sup>2</sup>Wojskowy Instytut Medyczny, Warszawa, Polska

<sup>3</sup>Fundacja Onkologii Doświadczalnej i Klinicznej, Warszawa, Polska

<sup>4</sup>Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii, Warszawa, Polska

### Abstract

**Introduction:** Among hypotheses aiming at explaining aggressive phenotype of ovarian cancer, the concept of stem-like cancer cells has gains more and more experimental evidence. This phenotype can be defined by e.g. surface markers. This can be achieved by manipulation of medium ingredients.

**Aim of the study** was to establish the ingredients essential to induce stem-like properties of ovarian cells (understood as presence of certain surface markers) in ovarian cancer cell lines.

**Material and methods:** Ovarian cancer cell lines SKOV-3 and OvBH-1 were cultured in medium without FBS, with certain supplements. In certain time points morphology analysis and FACS were performed to estimate CD105 and CD133 presence.

**Results:** The morphology of the ovarian cancer cells changed during the treatment with supplemented medium. As a result of treatment, increase of CD105, not CD133, population was observed, in contrary to expected results.

**Conclusions:** Obtained supplemented medium can be applied to induce stem-like properties of ovarian cancer cell line in terms of CD105 presence.

**Key words:** ovarian cancer, stem-like cancer cells, surface markers.

### Streszczenie

**Wstęp:** Pośród hipotez mających wyjaśnić agresywny fenotyp raka jajnika koncepcja macierzystopodobnych komórek nowotworowych zyskuje coraz więcej dowodów eksperymentalnych. Taki fenotyp określa się m.in. za pomocą markerów powierzchniowych. Można go otrzymać m.in. poprzez manipulację składem pożywki.

**Cel pracy:** Wyselekcjonowanie medium do indukcji cech macierzystopodobnych (rozumianych jako pojawianie się odpowiednich markerów powierzchniowych) w liniach komórkowych raka jajnika.

**Materiał i metody:** Linie komórkowe raka jajnika SKOV-3 i OvBH-1 hodowano w pożywkach bez surowicy, z wybranymi suplementami. W określonych punktach czasowych przeprowadzano analizę morfologii komórek i analizę FACS, mającą na celu sprawdzenie obecności markerów CD105 i CD133.

**Wyniki:** Morfologia komórek ulegała zmianie w trakcie hodowli w mediach suplementowanych. W wyniku traktowania komórek uzyskano wzrost populacji CD105+, a nie CD133+, jak się wcześniej spodziewano.

**Wnioski:** Opracowany skład medium może służyć do otrzymywania cech macierzystopodobnych w komórkach raka jajnika, rozumianych jako podwyższona ekspresja markera CD105.

**Słowa kluczowe:** rak jajnika, macierzystopodobne komórki nowotworowe, markery powierzchniowe.

[93]

## CpG-siRNA – spider silk complexes: a novel strategy for siRNA delivery to tumor microenvironment in cancer therapy

*Kompleksy CpG-siRNA i bioinżynierowanego jedwabiu pajęczego: nowa strategia dostarczania siRNA do komórek mikrośrodowiska guza w terapii nowotworów*

Anna Kozłowska<sup>1</sup>, Maciej Śmiątek<sup>1</sup>, Anna Florczak<sup>1,2</sup>, Andrzej Mackiewicz<sup>1,3</sup>, Marcin Kortylewski<sup>4</sup>, Hanna Dams-Kozłowska<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Chair of Medical Biotechnology, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland

<sup>2</sup>NanoBioMedical Centre, Adam Mickiewicz University, Poznan, Poland

<sup>3</sup>Department of Diagnostics and Cancer Immunology, Greater Poland Cancer Centre, Poznan, Poland

<sup>4</sup>Beckman Research Institute, City of Hope National Medical Center, Duarte, CA, USA

<sup>1</sup>Katedra Biotechnologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, Polska

<sup>2</sup>Centrum NanoBioMedyczne, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań, Polska

<sup>3</sup>Zakład Diagnostyki i Immunologii Nowotworów, Wielkopolskie Centrum Onkologii, Poznań, Polska

<sup>4</sup>Beckman Research Institute, City of Hope National Medical Center, Duarte, CA, Stany Zjednoczone

### Abstract

**Introduction:** Efficient and specific delivery of siRNA remains a challenge in cancer therapy. CpG-siRNA conjugates are internalized by TLR9+ immune cells without any transfection reagents and overcome a problem of cell-specific delivery. However, systemic delivery of CpG-siRNA for clinical application requires optimization of molecule stability in body fluids. Spider silks exhibit extraordinary properties which make them suitable for biomedical applications. Functionalization of silk by adding nucleic acid binding domain enables development of siRNA delivery system. Complexes of CpG-siRNA and silk may improve serum stability of these complexes and sustain cell-specific delivery.

**Aim of the study:** Analysis of CpG-siRNA binding, blood stability and cell uptake of complexes made of CpG-siRNA and silk.

**Material and methods:** Spider silk (MS2) was based on the sequence of MaSp2 spidroin of *Nephila clavipes*. MS2 was functionalized by adding nucleic acid binding domain (KN). MS2 and hybrid MS2KN were produced in bacterial expression system. The complexes of silk proteins and CpG-siRNA were prepared by mixing 1 : 10 ratio and characterized by gel electrophoresis. For serum stability assays, the complexes of MS2KN and CpG-siRNA were incubated in presence of mouse serum and analyzed in PAGE gel. The uptake of complexes by murine macrophages was analyzed using flow cytometry and confocal microscopy.

**Results:** CpG-siRNA efficiently bound to MS2KN in contrary to control protein MS2. Resulted complexes protected siRNA from degradation in serum, were recognized by TLR9+ macrophages, and both nucleic acid and protein were localized inside the cells.

**Conclusions:** CpG-siRNA-spider silk complexes allow for cell-specific uptake of intact and functional CpG-siRNA, and are a promising strategy for delivery of therapeutic nucleic acids into the tumor microenvironment.

**Key words:** bioengineered spider silk, CpG-siRNA, cancer therapy, tumour microenvironment.

### Streszczenie

**Wstęp:** Wydajne dostarczanie siRNA do określonych populacji komórek pozostaje wyzwaniem w terapii nowotworów. Koniugaty CpG-siRNA są specyficznie pobierane przez komórki TLR9+ bez użycia odczynników transfekcyjnych. Jednakże, ogólnoustrojowe podanie CpG-siRNA wymaga optymalizacji stabilności koniugatu w płynach ustrojowych. Ze względu na swoje właściwości jedwab pajęczy jest doskonałym materiałem do zastosowania w biomedycynie. Dodanie domeny wiążącej kwasy nukleinowe do jedwabiu umożliwiło rozwój systemu dostarczania siRNA. Kompleksy CpG-siRNA i jedwabiu mogą poprawić stabilność siRNA we krwi przy zachowaniu specyficznego dostarczania do komórek.

**Cel pracy:** Analiza wiązania CpG-siRNA, stabilności we krwi i pobierania kompleksów utworzonych z CpG-siRNA i jedwabiu.

**Materiał i metody:** Jedwab MS2 powstał w oparciu o sekwencję spidroiny pająka *Nephila clavipes*. MS2 modyfikowano poprzez dodanie domeny wiążącej kwasy nukleinowe (KN). MS2 i MS2KN wyprodukowano za pomocą bakteryjnego systemu ekspresyjnego. Kompleksy białek jedwabiu i CpG-siRNA przygotowywano poprzez zmieszanie ich w stosunku 1 : 10 i analizowano na żelu agarozowym. Do testu stabilności kompleksy inkubowano w obecności mysiej surowicy i analizowano na żelu poliakryloamidowym. Pobieranie kompleksów przez mysie komórki analizowano za pomocą cytometrii przepływowej i mikroskopii konfokalnej.

**Wyniki:** CpG-siRNA wydajnie wiązało się do białka MS2KN, a nie do białka kontrolnego MS2. Powstałe kompleksy zapobiegały degradacji siRNA w surowicy oraz były pobierane przez makrofagi. Zarówno kwas nukleinowy, jak i białko były zlokalizowane wewnątrz komórek.

**Wnioski:** Kompleksy CpG-siRNA i jedwabiu pajęczego umożliwiają specyficzne dostarczanie niezdegradowanego i funkcjonalnego CpG-siRNA do komórek i są obiecującym narzędziem mogącym dostarczać kwasy nukleinowe do mikrośrodowiska guza.

**Słowa kluczowe:** bioinżynierowany jedwab pajęczy, CpG-siRNA, terapia nowotworów, mikrośrodowisko guza.

[94]

## Polimery gwiaździste jako modelowe układy do dostarczania leków i kwasów nukleinowych na bazie poli(glikolu etylenowego)

Katarzyna Wegner<sup>1,2</sup>, Magdalena Walawender<sup>3</sup>, Monika Makrocka-Rydzik<sup>3</sup>, Łukasz Popenda<sup>1</sup>, Marcin Jarek<sup>1</sup>, Hong Y. Choc<sup>2</sup>, Maciej Cieśla<sup>4</sup>, Stefan Jurga<sup>1,3</sup>, Krzysztof Matyjaszewski<sup>2</sup>

<sup>1</sup>NanoBioMedical Centre, Adam Mickiewicz University, Poznan, Poland

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, USA

<sup>3</sup>Department of Macromolecular Physics, Faculty of Physics, Adam Mickiewicz University, Poznan, Poland

<sup>4</sup>Department of Medical Biotechnology, Faculty of Biochemistry, Biophysics, and Biotechnology, Jagiellonian University, Krakow, Poland

<sup>1</sup>Centrum NanoBioMedyczne, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań, Polska

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, Stany Zjednoczone

<sup>3</sup>Zakład Fizyki Makromolekularnej, Wydział Fizyki, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań, Polska

<sup>4</sup>Zakład Biotechnologii Medycznej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Polska

### Abstract

**Introduction:** Therapy based on delivery of nucleic acids in treatment of genetic disorders or cancers is nowadays the object of interest of many scientists from miscellaneous disciplines. Nucleic acids (NA) e.g. siRNA can be used to induction express or silence genes. Recent studies are focused on finding such carriers, which prevents the electrostatic repulsion between the cell membrane and NAs and lead to an increase in the permeability of cells.

**Aim of the study:** The goal of this research is to evaluate efficient, biocompatible polymeric carriers for NA and drug delivery.

**Material and methods:** Atom transfer radical polymerization (ATRP) is one of the most robust controlled radical polymerization (CRP) techniques. It can be used to produce polymers of various architectures (e.g. star polymers, dendrimers etc.) enabling introducing innovative features to the polymer. Poly(ethylene oxide) – PEO is nontoxic, biocompatible polymer. Thus it is ideal candidates for biomedical applications include a scaffold's component in tissue engineering or as a carriers for drug or NA. Star polymers with multiple arms joined to a centrally located core, having a three-dimensional spherical compact structure. Depending on the end group functionalization is possible providing the desired physical and chemical properties.

**Results:** The study involves the polymerization (by an "arm-first" ATRP method) of (PEG)-based star polymers with cationic and degradable core. Their structural and biological characteristics, obtained with the use of various methods (e.g. DSC, NMR, POM, etc.) will be presented. Moreover, the comparison of the studied system with linear PEG and simple star PEGs will be given.

**Conclusions:** An obtained star polymer shows all desired properties and appears to be promising candidates for biomedical applications.

**Key words:** gene therapy, star polymers, ATRP, PEO.

### Streszczenie

**Wstęp:** Terapie oparte na dostarczaniu kwasów nukleinowych wykorzystywane do leczenia chorób genetycznych lub nowotworowych są obecnie obiektem zainteresowań naukowców z różnych dyscyplin. Kwasy nukleinowe (NA), np. siRNA, mogą zostać użyte w celu indukcji ekspresji lub wyciszenia genów. Dotychczasowe badania koncentrują się na znalezieniu nośników, które zapobiegają elektrostatycznemu odpychaniu między ujemnie naładowaną błoną komórkową i NA oraz zwiększają przepuszczalność błon komórkowych.

**Cel pracy:** Ocena wpływu architektury i składu nośników polimerowych na efektywności w dostarczaniu NA.

**Materiał i metody:** Polimeryzacja rodnikowa z przeniesieniem atomu (ATRP) jest jedną z technik kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej (CRP). Może być użyta do syntezy polimerów o różnych architekturach (np. gwiazdy, dendrimery), nadając im innowacyjne cechy. Poli(tlenek etylenu) – PEO, jest nietoksycznym, biokompatybilnym polimerem. Dzięki temu jest idealnym kandydatem do aplikacji biomedycznych, m.in. jako składnik rusztowań w inżynierii tkankowej lub jako nośnik leków i kwasów nukleinowych. Wieloramienne polimery gwiaździste połączone z centralnie położonym rdzeniem mają trójwymiarową sferyczną zwartą strukturę. W zależności od grup końcowych można je funkcjonalizować, co pozwala uzyskać pożądane właściwości fizyczne oraz chemiczne.

**Wyniki:** Przedstawione badania obejmują polimeryzację (metodą *arm-first* ATRP) gwiaździstych polimerów opartych na PEO z kationowym (DMAEMA) i degradable rdzeniem. W pracy przedstawiono charakterystykę strukturalną (m.in. DSC, NMR, POM) oraz biologiczną. Dodatkowo badane układy porównano z prostszymi, jakimi są liniowy PEG oraz gwiazdy 4-ramienne.

**Wnioski:** Otrzymane gwiazdy wykazują wszystkie cechy dobrego wektora do dostarczania NA i są obiecującymi kandydatami w aplikacjach biomedycznych.

**Słowa kluczowe:** terapia genowa, polimery gwiaździste, ATRP, PEO.

[95]

## Prognostic value of HIF1 $\alpha$ and GLUT1 expression in skin melanomas

Anna A. Brożyna<sup>1</sup>, Wojciech Jóźwicki<sup>2</sup>, Andrzej T. Słominski<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology and Pathomorphology of Cancers, Franciszek Łukaszczyk Oncology Centre, Ludwik Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nikolaus Copernicus University, Torun, Poland

<sup>2</sup>Department of Pathology and Laboratory Medicine, Division of Dermatology, Department of Medicine, University of Tennessee Health Science Center, Memphis, USA

<sup>1</sup>Zakład Patologii Nowotworów i Patomorfologii, Centrum Onkologii im. Franciszka Łukaszczyka, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń, Polska

<sup>2</sup>Department of Pathology and Laboratory Medicine, Division of Dermatology, Department of Medicine, University of Tennessee Health Science Center, Memphis, Stany Zjednoczone

### Abstract

**Introduction:** Hypoxia-inducible factor-1 (HIF1) is the nuclear transcription factor, composed of a constitutively expressed  $\beta$ -subunit (HIF1 $\beta$ ) and an oxygen-dependent  $\alpha$ -subunit (HIF1 $\alpha$ ). The HIF1 system regulates many of genes containing hypoxia-response elements in their promoter regions, including glucose transporter 1 (GLUT1).

**Aim of the study:** Both hypoxia and reactive oxygen species regulate HIF1 $\alpha$  activity in melanoma. HIF1 $\alpha$  enable tumor cells adapting to stress parameters like tumor hypoxia, thus we examined using immunohistochemistry the expression both HIF1 $\alpha$  and GLUT1 in melanocytic lesions and analyzed its level with clinicopathomorphological features.

**Material and methods:** HIF1 $\alpha$  and GLUT1 were analyzed in 75 melanomas and 26 nevi using immunohistochemistry.

**Results:** Both in nevi and melanomas HIF1 $\alpha$  was found in cytoplasm and nuclei, nevertheless the differences were observed only for nuclear HIF1 $\alpha$ . The higher percentage of HIF1 $\alpha$ -positive cell nuclei in melanomas than in nevi and in nodular than in superficial spreading melanomas was found. In melanomas we observed increase of both cytoplasmic and nuclear HIF1 $\alpha$  level with pT and pM advancement and cytoplasmic HIF1 $\alpha$  with pN stage. GLUT1 was found in cytoplasm and membrane of analyzed samples, however membrane GLUT1 was observed only in melanomas. Cytoplasmic GLUT1 was more often observed in malignant than benign melanocytic lesions. Comprehensive analysis of GLUT1 level revealed significantly highest membrane GLUT1 level in melanomas at pT3-4 stage and pN3 than in less advanced melanomas. Shortened OS and DFS was related with membrane GLUT1.

**Conclusions:** Our results indicate a possible role for HIF1 and GLUT1 in the development and progression of skin melanoma and also its potential role as an prognostic biomarkers.

**Key words:** skin melanoma, HIF1, GLUT1, overall survival, progression.

### Streszczenie

**Wstęp:** Jądrowy transkrypcyjny czynnik indukowany przez hipoksję 1 (HIF1) składa się z podjednostki  $\beta$  (HIF1 $\beta$ ), ulegającej konstytutywnej ekspresji i zależnej od poziomu tlenu podjednostki  $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ). HIF1 reguluje ekspresję wielu genów zawierających w regionach promotorowych elementy odpowiedzi na hipoksję, w tym transporter glukozy 1 (GLUT1).

**Cel pracy:** W czerniakach zarówno hipoksja, jak i reaktywne formy tlenu regulują aktywność HIF1 $\alpha$ . HIF1 $\alpha$  umożliwia komórkom adaptację do warunków stresowych, w tym do hipoksji, zatem badano ekspresję HIF1 $\alpha$  i GLUT1 w zmianach melanocytarnych i analizowano ich ekspresję w odniesieniu do cech kliniczno-patomorfologicznych.

**Materiał i metody:** Ekspresję HIF1 $\alpha$  i GLUT1 badano przy użyciu immunohistochemii w 75 czerniakach i 26 znamionach.

**Wyniki:** W znamionach i czerniakach stwierdzono obecność HIF1 $\alpha$  w cytoplazmie i jądrach komórkowych, ale różnice istotne statystycznie zaobserwowano tylko dla jądrowego HIF1 $\alpha$ . Wyższy odsetek jąder komórkowych z HIF1 $\alpha$  obserwowano w czerniakach niż w znamionach oraz w czerniakach guzowatych niż w szerzących się powierzchownie. W czerniakach stwierdzono wzrost cytoplazmatycznego i jądrowego poziomu HIF1 $\alpha$  wraz ze wzrostem zaawansowania pT i pM oraz tylko cytoplazmatycznego ze wzrostem zaawansowania pN. GLUT1 w analizowanych zmianach był obecny zarówno w cytoplazmie i błonach komórkowych, jednak tylko w czerniakach GLUT1 wykazywał lokalizację błonową. Ponadto cytoplazmatyczny GLUT1 był częściej obserwowany w złośliwych niż łagodnych zmianach. Szczegółowa analiza GLUT1 wykazała istotnie wyższy poziom błonowego GLUT1 w czerniakach w stadium pT3-4 i pN3 niż w czerniakach mniej zaawansowanych.

**Wnioski:** Wyniki badań wskazują na istotną rolę HIF1 $\alpha$  i GLUT1 w rozwoju i progresji czerniaków skóry oraz ich potencjalne znaczenie jako markerów prognostycznych.

**Słowa kluczowe:** czerniak skóry, HIF1 $\alpha$ , GLUT1, całkowite przeżycie, progresja.

[96]

## Hybrid bioengineered spider silk as a tool for cell transfection

Maciej Śmiątek<sup>1</sup>, Anna Florczak<sup>1,2,3</sup>, Andrzej Mackiewicz<sup>1,3</sup>, Hanna Dams-Kozłowska<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Diagnostics and Cancer Immunology, Greater Poland Cancer Centre, Poznan, Poland

<sup>2</sup>NanoBioMedical Centre, Adam Mickiewicz University, Poznan, Poland

<sup>3</sup>Chair of Medical Biotechnology, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland

<sup>1</sup>Zakład Diagnostyki i Immunologii Nowotworów, Wielkopolskie Centrum Onkologii, Poznań, Polska

<sup>2</sup>Centrum NanoBioMedyczne, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań, Polska

<sup>3</sup>Katedra Biotechnologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, Polska

### Abstract

**Introduction:** Remarkable mechanical properties, as well as biodegradability and biocompatibility, made spider silk material of great potential for medical applications. Functionalization of synthetic spider silk by adding nucleic acid binding domain (KN) and domain binding to Her2 cell surface receptor (H2.1) may enable to obtain new system for cell transfection.

**Aim of the study:** Construction of hybrid bioengineered spider silk for cell transfection.

**Material and methods:** MS1 and MS2 genes were based on the native sequences of spider fibroins MaSp1 and MaSp2 from *Nephila clavipes*. MS1 and MS2 constructs were functionalized by adding the domains KN and H2.1. Therefore all constructs were expressed in bacterial expression system in bioreactor, and were purified by organic acid and thermal denaturation methods. Recombinant silk/pDNA complexes were obtained by mixing several molecular ratios and was analyzed by agarose gel electrophoresis. Spheres were obtained by mixing spider silk, pDNA and 2M K3PO4 pH = 8.0 and were characterized by confocal and SEM microscopy, as well as by flow cytometry. Loading and release efficiency of pDNA was measured spectrophotometrically. Transfection efficiency was analyzed using fluorescence microscopy.

**Results:** MS1, H2.1MS1 and MS2, KNMS2, MS2KN, H2.1MS1KN – constructs were obtained, expressed and then purified. Agarose gel electrophoresis revealed that functionalized spider silk proteins – KNMS2, MS2KN and H2.1MS1KN – bound plasmid DNA. SEM analysis, as well as confocal microscopy characterization have proved spherical morphology of obtained spheres. Flow cytometry analysis proved binding of functionalized spider spheres – H2.1MS1 – to cells, that overexpressed Her2.

**Conclusions:** Further functionalization with domains enabling endosomal escape of DNA or directing DNA to cell nucleus may improve the delivery system.

**Key words:** bioengineered spider silk, transfection, nucleic acid binding, HER2 receptor, functionalization of genes.

### Streszczenie

**Wstęp:** Niezwykłe właściwości mechaniczne jedwabiu pajęczego oraz biodegradowalność i biokompatybilność, wskazują na potencjalne jego zastosowanie w medycynie. Funkcjonalizacja jedwabiu pajęczego poprzez domeny wiążące kwasy nukleinowe (KN) i receptory Her2 na powierzchni komórek (H2.1) umożliwiła otrzymanie nowego systemu do transfekcji komórek.

**Cel pracy:** Konstrukcja hybrydowego bioinżynierowanego jedwabiu pajęczego do celów transfekcji komórek.

**Materiał i metody:** Geny MS1 i MS2 bazowały na naturalnych sekwencjach fibroin MaSp1 i MaSp2 pająka *Nephila clavipes*. Konstrukty MS1 i MS2 modyfikowano poprzez dodanie domen KN oraz H2.1. Wszystkie konstrukty białkowe otrzymano w bakteryjnym systemie ekspresyjnym w bioreaktorze, a następnie oczyszczono metodami ekstrakcji kwasem organicznym i denaturacji termicznej. Kompleksy rekombinowany jedwab/pDNA otrzymano poprzez mieszanie w różnych stosunkach molowych oraz analizowano za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym. Sfery uzyskano poprzez mieszanie jedwabiu, pDNA i 2M K3PO4 pH = 8, a następnie charakteryzowano za pomocą mikroskopii konfokalnej i elektronowej oraz cytometrii przepływowej. Spektrofotometrycznie zmierzono wydajność ładowania i uwalniania pDNA ze sfer. Wydajność transfekcji analizowano przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej.

**Wyniki:** Uzyskano i oczyszczono następujące konstrukty: MS1, H2.1MS1, MS2, KNMS2, MS2KN, H2.1MS1KN. Analiza elektroforetyczna wykazała wiązanie się plazmidowego DNA do białek z domeną KN. Za pomocą mikroskopii konfokalnej i elektronowej wykazano kulisty kształt otrzymanych sfer. Przy użyciu cytometrii przepływowej udowodniono wiązanie sfer z H2.1MS1 do komórek z nadekspresją receptora Her2.

**Wnioski:** Dalsze modyfikacje za pomocą domen umożliwiających ucieczkę z endosomu lub kierujących DNA do jądra komórkowego może zwiększyć wydajność skonstruowanego systemu.

**Słowa kluczowe:** bioinżynierowany jedwab pajęczy, transfekcja, wiązanie kwasów nukleinowych, receptor HER2, funkcjonalizacja genów.

[97]

## 3D cancer model – analysis of cell morphology, proliferation and cytotoxicity

Ewelina Dondajewska<sup>1</sup>, Hanna Dams-Kozłowska<sup>1</sup>, Andrzej Mackiewicz<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland

<sup>2</sup>Greater Poland Cancer Centre, Poznan, Poland

<sup>1</sup>Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, Polska

<sup>2</sup>Wielkopolskie Centrum Onkologii, Poznań, Polska

### Abstract

**Introduction:** Two-dimensional methods of cell culture do not provide enough information about the cell environment, cell-cell interactions and ECM production. 3D porous scaffolds made of natural silk fiber are a better alternative for cell cultures.

**Aim of the study** was to engineer 3D cancer model to study to study cell morphology, proliferation and drug resistance in a co-culture system.

**Material and methods:** Silk fibroin solution was obtained from *Bombyx mori* silk cocoons. Porous scaffolds were manufactured by salt-leaching method. Two cell lines were used: EMT6 – breast cancer cell line and 3T3 fibroblasts. Cells were cultured as a monoculture or a co-culture of both lines in 2D conditions on standard tissue culture plates and in 3D conditions on silk fibroin porous scaffolds. Cell morphology was visualized using confocal laser microscopy, cell proliferation and cytotoxicity of Doxorubicin was determined by Alamar Blue assay and MTT assay.

**Results:** Both tested cell lines attached and proliferated on the silk scaffolds. Cells cultured in 3D proliferated slower than in 2D conditions. Fibroblasts' morphology was different in co-culture in comparison to monoculture. Cytotoxic effect of doxorubicin was considerably lower in 3D culture, moreover, the cytotoxicity of Dox in co-cultures was lower than that observed for cancer cells alone.

**Conclusions:** *In vitro* three-dimensional breast cancer model consisting of cancer cells, fibroblast and in the future endothelial or immune cells is a perfect system to study cancer in an environment similar to that observed *in vivo*. The similarities include: slower proliferation rate of cells, production of extracellular matrix, cell morphology, higher resistance to cytotoxic agents, none of which can be observed in 2D culture.

**Key words:** breast cancer, silk, scaffolds, 3D cell culture.

### Streszczenie

**Wstęp:** Najpowszechniejsze obecnie metody hodowli komórek na płaskich płytkach nie dostarczają wielu istotnych informacji o środowisku komórkowym, oddziaływaniach komórka-komórka i wytwarzaniu macierzy pozakomórkowej. Trójwymiarowe porowate rusztowania z naturalnego jedwabiu stanowią lepszą alternatywę do badań biologii nowotworu. Jedwab jest białkiem nietoksycznym, biokompatybilnym i biodegradowalnym. Jego zastosowanie jako rusztowania zapewnia odpowiednie warunki wzrostu komórek.

**Cel pracy:** Zaprojektowanie przestrzennego modelu nowotworu do badania morfologii komórek, ich tempa proliferacji i oporności na leki w układzie kohodowli.

**Materiał i metody:** Roztwór jedwabiu naturalnego otrzymano z kokonów jedwabnika *Bombyx mori*. Porowate rusztowania zostały wyprodukowane metodą wyptukiwania soli. Użyto dwóch linii komórkowych: EMT6 – komórki raka piersi, i 3T3 – fibroblasty. Komórki były utrzymywane jako monohodowle lub kohodowle zarówno w 2D (TCP), jak i w 3D na porowatych rusztowaniach z jedwabiu. Morfologię komórek obrazowano z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej, proliferację komórek i cytotoksyczności doksorubicyny określano w teście Alamar Blue i teście MTT.

**Wyniki:** Komórki hodowane w 3D rosły wolniej niż w warunkach 2D. Zaobserwowano różnicę w morfologii fibroblastów hodowanych w 3D w monohodowli i kohodowli. Cytotoksyczne działanie doksorubicyny było znacznie słabsze w przypadku komórek hodowanych w 3D niż w 2D, ponadto cytotoksyczność była wyższa w monohodowlach w porównaniu z kohodowlami.

**Wnioski:** Przestrzenny model raka piersi *in vitro*, składający się z komórek rakowych, fibroblastów oraz w przyszłości także z komórek śródbłonna i komórek układu odpornościowego, to idealny system do badania biologii nowotworu w środowisku zbliżonym do obserwowanego *in vivo*.

**Słowa kluczowe:** jedwab, hodowla 3D, rak piersi.

[98]

## Magnetic nanoparticles based non-viral vectors for gene therapy

**Bartosz Grześkowiak**

NanoBioMedical Centre, Adam Mickiewicz University, Poznan, Poland  
Centrum NanoBioMedyczne, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań, Polska

### Abstract

**Introduction:** Gene therapy allows treatment of certain diseases by delivering of functional gene into cells in order to achieve therapeutic benefit to patient. Developing of the efficient nucleic acid delivery vectors remain the most significant challenge in this field. Great efforts has been made to produce biocompatible magnetic nanoparticles for teranostic purposes. There is a lot of clinical settings where genetically modified fibroblasts appear to be the suitable cell for gene therapy.

**Aim of the study:** In this study we describe the potential of the plasmid DNA delivery to the model mouse fibroblasts using magnetic delivery vectors and gradient magnetic fields, an approach known as magnetofection.

**Material and methods:** Superparamagnetic iron oxide nanoparticles and different liposomal transfection reagents were used to formulate magnetic pDNA lipoplexes. The complexes were characterized in regards to their size, magnetic moment and electrokinetic potential. Magnetofection of the mouse fibroblasts was performed in order to assess *in vitro* transfection efficiency of the prepared nonviral vectors.

**Results:** Magnetofection mouse fibroblasts with optimal magnetic lipoplexes resulted in improvement of the transfection efficiency in terms of the luciferase reporter gene expression and in the percent of the transfected cells. Respiration activity of the mouse fibroblasts measured after 48 h incubation with optimal magnetic transfection complexes was not inhibited.

**Conclusions:** Magnetic nanoparticles have the potential to be used in gene therapy and further experiments *in vivo* are needed.

**Key words:** gene therapy, magnetic nanoparticles, magnetofection, nonviral vectors.

### Streszczenie

**Wstęp:** Terapia genowa umożliwia leczenie chorób poprzez wprowadzanie genów funkcjonalnych do komórek w celu uzyskania terapeutycznego efektu u pacjentów. Poszukiwanie skutecznych nośników wprowadzania kwasów nukleinowych pozostaje największym wyzwaniem w tej dziedzinie. Duża uwaga naukowców skupia się na wytworzeniu biokompatybilnych nanocząstek magnetycznych do celów teranostycznych. Istnieje wiele aplikacji klinicznych, w których genetycznie modyfikowane fibroblasty mogą się okazać odpowiednimi komórkami w terapii genowej.

**Cel pracy:** Pokazanie potencjału magnetofekcji, czyli wprowadzania plazmidowego DNA do modelowych komórek mysich fibroblastów z wykorzystaniem nośników magnetycznych oraz pola magnetycznego.

**Materiał i metody:** Superparamagnetyczne nanocząstki żelaza, plazmidowy DNA oraz różne odczynniki do transfekcji zostały wykorzystane do utworzenia magnetycznych lipopleksów. Kompleksy te zostały scharakteryzowane pod kątem wielkości, momentu magnetycznego oraz potencjału elektrokinetycznego. Magnetofekcja mysich fibroblastów została wykonana w celu oceny wydajności transfekcji zastosowanych nie wirusowych nośników w warunkach *in vitro*.

**Wyniki:** W wyniku magnetofekcji mysich fibroblastów uzyskano wzrost poziomu ekspresji genów reporterowych, w porównaniu z lipofekcją. Przeprowadzone badania cytotoksyczności kompleksów za pomocą testu MTT wskazują, że aktywność oddechowa tego typu komórek mierzona po 48 godz. inkubacji nie była zahamowana.

**Wnioski:** Nanocząstki magnetyczne mogą być z powodzeniem wykorzystywane jako nośniki kwasów nukleinowych w terapii genowej, jednakże niezbędne jest przeprowadzenie badań w warunkach *in vivo*.

**Słowa kluczowe:** terapia genowa, nanocząstki magnetyczne, magnetofekcja, nośniki niewirusowe.



[99]

## Analysis of antigen-specific T cells induced in patients treated with therapeutic genetically modified melanoma vaccine

*Analiza antygenowo swoistych limfocytów T u chorych leczonych terapeutyczną genetycznie modyfikowaną szczepionką czerniakową*

**Katarzyna Tomela<sup>1</sup>, Anna Przybyła<sup>1</sup>, Anna Kozłowska<sup>1</sup>, Andrzej Mackiewicz<sup>1,2</sup>, Eliza Kwiatkowska-Borowczyk<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland

<sup>2</sup>Greater Poland Cancer Centre, Poznan, Poland

<sup>1</sup>Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, Polska

<sup>2</sup>Wielkopolskie Centrum Onkologii, Poznań, Polska

### Abstract

**Introduction:** Administration of therapeutic cancer vaccine induces T cells specific for melanoma antigens in the vaccine. Due to the phenomenon of epitope spreading, T cells specific to other antigens in the tumour can emerge. Consequently, along with evaluation of immune response driven by vaccine antigens, immune response to tumour cells, including cancer initiating cells (CICs) should be measured. The unique feature of AGI-101H vaccine is the expression and high activity of ALDH. That ALDH expression may account for direct induction of immune response that target cancer initiating cells in vaccinated melanoma patients. Aim of the study was to evaluate the specific immune response against CICs elicited by AGI-101H vaccine.

**Material and methods:** PBMC were isolated and cryopreserved from HLA-A2 positive melanoma patients treated with AGI-101H (before vaccination with AGI-101H and after 6 or 11 days), from untreated melanoma patients and healthy persons. To enumerate ALDH1A1-specific CD8+ T cells freshly isolated PBMC were stained with MHC Dextramer® reagents. The effector functions of CTLs and T helper cryopreserved PBMC were analysed using granzyme-B, IFN- $\gamma$  and IL-2 ELISpot.

**Results:** Dextramer staining revealed increase in number of ALDH1A1-specific CD8+ T cells in vaccinated patient compared to healthy controls. Moreover, there was a significant difference in number of ALDH1A1-specific CD8+ T cells before and after treatment. Preliminary data of ELISpot assays showed that treatment with AGI-101H vaccine induces functionally active ALDH1A1-specific CTLs and T helper lymphocytes.

**Conclusions:** ALDH1A1 might serve as a biomarker of patients' immune response to melanoma CICs and for monitoring response to AGI-101H therapy.

**Key words:** melanoma, immunotherapy, cancer initiating cells, immune response.

### Streszczenie

**Wstęp:** Terapeutyczne szczepionki nowotworowe wzbudzają odpowiedź limfocytów T swoistych dla antygenów zawartych w szczepionce. Dzięki zjawisku „epitope spreading” mogą się pojawiać także limfocyty T swoiste dla innych antygenów nowotworu. Poza oceną odpowiedzi immunologicznej wzbudzonej przez antygeny szczepionki, analizowana powinna być zatem także odpowiedź na komórki nowotworowe, w szczególności komórki inicjujące nowotwór (CICs). Unikalną cechą szczepionki AGI-101H jest ekspresja i wysoka aktywność ALDH. Może to prowadzić do bezpośredniej indukcji odpowiedzi immunologicznej ukierunkowanej na CICs, u chorych leczonych tą szczepionką.

**Cel pracy:** Analiza swoistej odpowiedzi immunologicznej ukierunkowanej na CICs, wzbudzonej przez szczepionkę AGI-101H.

**Materiał i metody:** Mononuklearne komórki krwi obwodowej (PBMC) od chorych na czerniaka leczonych szczepionką AGI-101H (przed podaniem szczepionki oraz 6 lub 11 dni po podaniu), chorych nieleczonych oraz zdrowych dawców były izolowane oraz zamrażane. Aby określić liczbę limfocytów T CD8+ swoistych dla ALDH1A1 świeżo izolowane PBMC barwiono dekstramerami i analizowano cytometrycznie. Funkcje efektorowe CTL-i i limfocytów T pomocniczych były analizowane z użyciem testów ELISpot na granzym-B, IFN- $\gamma$  i IL-2.

**Wyniki:** Barwienie dekstramerami wykazało podwyższoną liczbę limfocytów T CD8+ swoistych dla ALDH1A1 u chorych, w porównaniu ze zdrowymi dawcami. Wykazano też znaczącą różnicę w liczbie komórek CD8+dextramer+ przed i po podaniu szczepionki. Wstępne wyniki analizy ELISpot wykazały, że szczepionka AGI-101H indukuje funkcjonalnie aktywne komórki CTL i limfocyty T pomocnicze, swoiste dla ALDH1A1.

**Wnioski:** Badania wykazały, że ALDH1A1 posiada potencjał biomarkera odpowiedzi immunologicznej na komórki inicjujące nowotwór oraz monitorowania odpowiedzi chorych na leczenie szczepionką AGI-101H.

**Słowa kluczowe:** czerniak złośliwy, immunoterapia, komórki inicjujące nowotwór, odpowiedź immunologiczna.

[100]

## Synteza i charakterystyka *in vitro/in vivo* magnetycznych nanocząstek tlenku żelaza z doxorubicyną jako potencjalnego systemu dostarczania leków przeciwnowotworowych

Magdalena Hałupka-Bryl, Kei Asai, Sindhu Tahngevel, Magda Bednarowicz, Ryszard Krzyminiewski, Yukio Nagasaki

NanoBioMedical Centre, Adam Mickiewicz University, Poznan, Poland  
Centrum NanoBioMedyczne, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań, Polska

### Abstract

**Introduction:** In this study, we developed a simple method of preparation of magnetic nanoparticles modified with our original surface modification agent – PEG-derivative (poly(ethylene glycol)-block-poly(4-vinylbenzylphosphonate)) and the anticancer drug.

**Aim of the study** was to obtain a biocompatible and injectable nanosystem with antitumour activity. Iron oxide nanoparticles were synthesized by alkali co-precipitation of iron salts followed by coating with copolymer (PEG-PIONs).

**Material and methods:** An anticancer drug doxorubicin (DOX), which clinical use is associated with cardiotoxicity, was loaded onto PEG-PIONs (PEG-PIONs/DOX). Nanoparticles were investigated in terms of their stability in different conditions, drug loading efficiency, *in vitro* drug release as well as antiproliferative effect on cancer cells.

**Results:** PEG-PIONs/DOX have been successfully used for the efficient delivery of an anticancer drug into the tumour region. Fluorescent imaging showed the internalization of PEG-PIONs/DOX in the cytoplasm. Biodistribution studies demonstrated that PEG-PIONs/DOX preferentially accumulate in tumour region via the enhanced permeability and retention effect. In addition, the analysis of serum enzymes level indicated that PEG-PIONs/DOX reduced the liver- and cardiotoxicity associated with free DOX. Therefore, PEG-PIONs/DOX are promising magnetic drug carriers to be used in biomedical applications such as cancer therapy. Further studies are required to explore the physicochemical properties of PEG-PIONs/DOX.

**Conclusions:** PEG-PIONs/DOX has a potential as a targeted drug delivery system.

**Key words:** doxorubicin, iron oxide.

### Streszczenie

**Wstęp:** Jednym z głównych założeń rozwoju i doskonalenia współczesnej terapii przeciwnowotworowej jest dostarczenie leku bezpośrednio do wybranej lokalizacji w organizmie, stosując jego możliwie jak najmniejszą dawkę oraz kontrolując jego uwalnianie. Osiągnięcie tego celu umożliwiłoby zmniejszenie toksycznych działań niepożądanych chemioterapii i wpłynęłoby korzystnie na efektywność leczenia. Na przestrzeni ostatnich lat nanonauki zaproponowały nowe kierunki celowanych chemioterapii. Jednym z nich są magnetyczne nanocząstki tlenku żelaza jako nośnika leku przeciwnowotworowego.

**Cel pracy:** Opracowanie systemu dostarczania leków przeciwnowotworowych opartego na nanocząstkach żelaza.

**Materiał i metody:** Przygotowanie stabilnych nanocząstek PEG-PIONs/DOX. Określenie stopnia enkapsulacji otrzymanego systemu i jego cytotoksyczności. Eksperymenty *in vitro*.

**Wyniki:** Przedstawione dotychczasowe wyniki przeprowadzonych badań potwierdzają utworzenie stabilnych nanocząstek (PEG-PIONs/DOX) w warunkach fizjologicznych, o odpowiedniej do zastosowań biomedycznych wielkości, o wysokim stopniu enkapsulacji leku i jego przedłużonym uwalnianiu z PEG-PIONs/DOX. Badania *in vitro* wykazują, iż DOX z PEG-PIONs/DOX była skutecznie zinternalizowana przez komórki nowotworowe oraz efektywnie zmniejszyła ich żywotność. Wychwyt DOX z PEG-PIONs/DOX w tkance guza myszy BALB/c był większy niż równoważne dawki wolnego roztworu DOX, a związana z zastosowaniem leku kardiotoxyczność była znacznie mniejsza w przypadku zastosowania układu PEG-PIONs/DOX.

**Wnioski:** PEG-PIONs/DOX mogą być systemem dostarczania doxorubicyny.

**Słowa kluczowe:** doxorubicyna, tlenek żelaza.

[101]

## Analiza liczby kopii wybranych genów mikroRNA i genów związanych z biogenezą mikroRNA w raku płuca

Karol Czubak<sup>1</sup>, Wojciech Józwicki<sup>2,3</sup>, Janusz Kowalewski<sup>2,3</sup>, Marzena Anna Lewandowska<sup>2,3</sup>, Katarzyna Klonowska<sup>1</sup>, Piotr Kozłowski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland

<sup>2</sup>Franciszek Łukaszczyk Oncology Centre, Bydgoszcz, Poland

<sup>3</sup>Ludwik Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University, Torun, Poland

<sup>1</sup>Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań, Polska

<sup>2</sup>Centrum Onkologii im. prof. Franciszka Łukaszczyka, Bydgoszcz, Polska

<sup>3</sup>Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń, Polska

### Abstract

**Introduction:** Lung cancer is the leading cause of cancer related deaths worldwide. It is mostly diagnosed at an advanced stage, while the survival of patients depends significantly on early detection. Thus, early diagnosis and prognostic biomarkers have become the target of interest. Among them are microRNAs, a class of small, noncoding RNAs that regulate mRNA and protein expression. Recently, two independent meta-analyses revealed a group of microRNAs with the most frequently altered expression in lung cancer cases.

**Aim of the study:** We examined one of the potential causes of microRNAs expression changes – copy number variations of the microRNAs genes. In addition to the most frequently up- and down-regulated microRNAs, we examined two other microRNA genes, potentially associated with lung cancer, and two genes encoding proteins, which belong to the microRNA processing machinery, DICER and DROSHA.

**Material and methods:** We analyzed DNA samples from 216 NSCLC cases, using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). We designed two specific MLPA probes for each microRNA gene-containing region, and three probes for both *DICER1* and *DROSHA*.

**Results:** Performed analysis allows to identify genes undergoing significantly increased (frequently amplified) and decreased (deleted) copy number. Among the genes undergoing gain/amplification most frequently are *miR30D* (42%/16%), *miR30A* (41%/15%), and *DROSHA* (40%/11%). On the other hand, genes undergoing deletion most frequently are *miR31* (13%), and *miR126* (13%).

**Conclusions:** Our study showed, that some of the investigated genes undergo high copy number variation, higher even than the key lung cancer oncogenes, such as *EGFR* or *MET*. Such variation may be the mechanism underlying the changes in their expression, and may confirm oncogenic role of microRNAs.

**Key words:** lung cancer, microRNAs, copy number variation, MLPA.

*Funding:* NCN 2011/01/B/NZ5/02773.

### Streszczenie

**Wstęp:** Rak płuca jest najczęstszą przyczyną zgonów związanych z nowotworem. Wykrywa się go przeważnie w zaawansowanym stadium, podczas gdy przeżywalność dotkniętych nim pacjentów zależy w znaczącym stopniu od wczesnego wykrycia. Z tego względu biomarkery pozwalające na wczesne wykrycie i prognozę stały się obiektem zainteresowania. Wśród nich są cząsteczki mikroRNA – krótkie, niekodujące RNA, regulujące ekspresję innych genów. W ostatnim czasie dwie niezależne metaanalizy wyłoniły grupę mikroRNA, które w raku płuca ulegają największym zmianom ekspresji.

**Cel pracy:** Analizie poddano jeden z potencjalnych powodów zmian ekspresji wybranych mikroRNA – zmiany liczb kopii kodujących je genów. Oprócz mikroRNA podlegających największym zmianom ekspresji, przebadaliśmy dwa inne mikroRNA, potencjalnie związane z rakiem płuca, oraz dwa geny kodujące białka biorące udział w biogenezie mikroRNA, *DICER* i *DROSHA*.

**Materiał i metody:** Przebadaliśmy 216 próbek DNA pochodzących z raka płuca. W badaniu wykorzystaliśmy metodę MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*). Zaprojektowaliśmy po 2 sondy dla każdego regionu zawierającego badany gen mikroRNA i po 3 sondy dla genów *DICER1* i *DROSHA*.

**Wyniki:** Przeprowadzona analiza pozwoliła zidentyfikować geny najczęściej podlegające zmianom liczby kopii. Wśród genów, które najczęściej ulegają zwiększeniu liczby kopii/amplifikacji, można wymienić *miR30D* (42%/16%), *miR30A* (41%/15%) i *DROSHA* (40%/11%). Natomiast genami najczęściej podlegającymi delecji są *miR31* (13%) i *miR126* (13%).

**Wnioski:** Badanie wykazało, iż niektóre z analizowanych genów podlegają częstym zmianom liczby kopii. Zmiany te, częstsze nawet niż jest to w przypadku kluczowych dla raka płuca onkogenów, takich jak *EGFR* czy *MET*, mogą stanowić podłoże zmian ekspresji badanych genów oraz potwierdzać kancerogenną rolę cząsteczek mikroRNA.

**Słowa kluczowe:** rak płuca, mikroRNA, zmiana liczby kopii, MLPA.

*Finansowanie:* NCN 2011/01/B/NZ5/02773.

[102]

## Ekspresja receptora EP3 oraz IL-1 $\beta$ jako wskaźników inwazyjności zmian w raku krtani – badania wstępne

**Marcin Mochocki<sup>1</sup>, Piotr Morawski<sup>1</sup>, Renata Kopta<sup>1</sup>, Iwona Lewy-Trenda<sup>2</sup>, Katarzyna Kolary<sup>3</sup>, Khaliunaa Lkahagva<sup>3</sup>, Joanna Nestorowicz<sup>3</sup>, Ewa Budzisz<sup>3</sup>, Jakub Miazga<sup>3</sup>, Katarzyna Starska<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Stefan Żeromski Hospital, Krakow, Poland

<sup>2</sup>Pathomorphology Department, Medical University of Lodz, Poland

<sup>3</sup>Student's Scientific Society of Laryngological Immunobiology, Medical University of Lodz, Poland

<sup>4</sup>1<sup>st</sup> Chair and Department of Otolaryngology, Medical University of Lodz, Poland

<sup>1</sup>Szpital Specjalistyczny im. Stefana Żeromskiego w Krakowie, Polska

<sup>2</sup>Katedra Patomorfologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Polska

<sup>3</sup>Studenckie Koto Naukowe Immunologii Laryngologicznej, I Katedra i Klinika Otolaryngologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Polska

<sup>4</sup>I Katedra i Klinika Otolaryngologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Polska

### Abstract

**Introduction:** Expression of EP3 protein, the prostaglandin E2 (PGE2) receptor, produced by the tumor microenvironment inflammatory cells as well as tumor cells may promote the cellular proliferation and growth in an autocrine and paracrine fashion. The phenomenon involving these proteins are regulated by interleukin (IL)-1 $\beta$ . Many researchers indicate a connection of EP3 and IL-1 $\beta$  in various types of neoplasms with tumor progression and invasiveness, lymph node metastases and poor prognosis.

**Aim of the study** was to analyze the EP3 expression in the tumor tissue of squamous cell laryngeal carcinoma and IL-1 $\beta$  level in peripheral blood mononuclear cells supernatants and to find relationships between clinico-morphological indicators to estimate tumor aggressiveness degree.

**Material and methods:** A group of 50 patients with verified squamous cell laryngeal carcinoma was analyzed. The pathological evaluation included pTNM classification, depth of invasion according to tumor front grading criteria. Immunohistochemical analysis for membranous staining of EP3 in tumor cells were used. The level of IL-1 $\beta$  expression by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was determined.

**Results:** Increased EP3 expression in cells of carcinoma was confirmed for more advanced tumors (pT3-pT4 vs. pT1-pT2,  $p < 0.0001$  and pN1-3 vs. pN0,  $p = 0.02$ ). Tumors with the highest aggressiveness identified by depth of invasion according to TFG criteria were characterized by the highest expression of EP3 ( $p < 0.0001$ ). In laryngeal carcinomas characterized by lowest differentiation the highest EP3 expression in tumor cells was noted ( $p = 0.009$ ). The relationship between IL-1 $\beta$  expression and lymph node metastases was confirmed (pN1-3 vs. pN0,  $p = 0.04$ ).

**Conclusions:** The study indicates the role of EP3 receptor and IL-1 $\beta$  in determination of tumor progression in laryngeal carcinoma.

**Key words:** laryngeal carcinoma, EP3 receptor, IL-1 $\beta$ , pTNM, depth of invasion.

### Streszczenie

**Wstęp:** Ekspresja białka EP3, receptora dla prostaglandyny E2 (PGE2), wydzielanej przez komórki nacieku zapalnego w podścielisku guza oraz komórki nowotworowe, może odgrywać istotną rolę w promowaniu proliferacji i wzrostu guza na drodze auto- i parakrynej. Zjawiska z udziałem tych białek regulowane są przez interleukinę (IL) 1 $\beta$ . Liczne badania wskazują na związek ekspresji receptora EP3 oraz IL-1 $\beta$  z inwazyjnością zmian nowotworowych, powstawaniem przerzutów oraz gorszą prognozą w rakach różnego pochodzenia.

**Cel pracy:** Ocena ekspresji receptora EP3 w utkanie raka płaskonabłonkowego krtani oraz ocena poziomu IL-1 $\beta$  w nadsączach z hodowli jednojądrzastych komórek krwi obwodowej jako wskaźników stopnia agresywności zmian nowotworowych.

**Materiał i metody:** Badania przeprowadzono na materiale pochodzącym od 50 chorych z rakiem krtani. W analizie patomorfologicznej zastosowano kryteria klasyfikacji pTNM oraz ocenę głębokości naciekania guza według klasyfikacji *tumor front grading* (TFG). Ekspresja odczynu błonowego dla receptora EP3 została oceniona metodą IHC. Poziom IL-1 $\beta$  oznaczono z użyciem techniki ELISA.

**Wyniki:** Zwiększona ekspresja odczynu błonowego dla receptora EP3 w komórkach raka krtani została potwierdzona dla guzów o wyższym stopniu zaawansowania zmian nowotworowych (pT3-pT4 vs pT1-pT2,  $p < 0,0001$  oraz pN1-3 vs pN0,  $p = 0,02$ ). Raki o większej głębokości nacieku według kryteriów klasyfikacji TFG charakteryzowały się większą ekspresją EP3 ( $p < 0,0001$ ). Dla guzów mniej zróżnicowanych wykazano większe nasilenie odczynów błonowych dla EP3 ( $p = 0,009$ ). W badaniach potwierdzono także związek ekspresji IL-1 $\beta$  w nadsączach PBMCs (*peripheral blood mononucleated cells*) z obecnością przerzutów węzłowych (pN1-3 vs pN0,  $p = 0,04$ ).

**Wnioski:** Wyniki badań wskazują na rolę receptora EP3 oraz IL-1 $\beta$  jako czynników istotnych w determinowaniu inwazyjności zmian nowotworowych w raku krtani.

**Słowa kluczowe:** rak krtani, receptor EP3, IL-1 $\beta$ , pTNM, głębokość inwazji.

[103]

## Ekspresja cytokin wydzielanych przez limfocyty Th17 u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym krtani – badania wstępne

Renata Kopta<sup>1</sup>, Marcin Mochocki<sup>1</sup>, Piotr Morawski<sup>1</sup>, Iwona Lewy-Trenda<sup>2</sup>, Ewa Brzezińska-Błaszczak<sup>3</sup>, Anna Pietrzak<sup>3</sup>, Khaliunaa Lkhagva<sup>4</sup>, Katarzyna Kolary<sup>4</sup>, Agnieszka Pomykała<sup>4</sup>, Katarzyna Starska<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Laryngology, Stefan Żeromski Hospital, Krakow, Poland

<sup>2</sup>Pathomorphology Department, Medical University of Lodz, Poland

<sup>3</sup>Department of Experimental Immunology, Medical University of Lodz, Poland

<sup>4</sup>Student's Scientific Society of Laryngological Immunobiology, Medical University of Lodz, Poland

<sup>5</sup>1<sup>st</sup> Chair and Department of Otolaryngology, Medical University of Lodz, Poland

<sup>1</sup>Oddział Laryngologii Szpitala Specjalistycznego im. Stefana Żeromskiego w Krakowie, Polska

<sup>2</sup>Katedra Patomorfologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Polska

<sup>3</sup>Zakład Immunologii Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Polska

<sup>4</sup>Studenckie Koło Naukowe Immunobiologii Laryngologicznej, I Katedra i Klinika Otolaryngologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Polska

<sup>5</sup>I Katedra i Klinika Otolaryngologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Polska

### Abstract

**Introduction:** Activity of lymphocyte Th17 subpopulation as well as production of proinflammatory and regulatory cytokines such as IL-17 and IL-23 can play an essential role in the cancerogenesis and tumor growth by the down-regulation of tumor antigen-activated immune responses. Nevertheless, little is known about the possible function of Th17 lymphocytes in the development and progression of laryngeal cell carcinoma.

**Aim of the study** was to evaluate the potential role of Th17 cell subpopulation on laryngeal cancer invasiveness according to tumor front grading score.

**Material and methods:** The analysis was conducted in 50 patients treated for squamous cell laryngeal carcinoma and 30 healthy volunteers as a control. The morphological criteria included pTNM, stage, G and total TFG score. The expression of Th17 lymphocytes activity markers in supernatants of cultures of purified peripheral blood mononuclear cells by using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was determined.

**Results:** Our work revealed a significant dependence of IL-23 on pT ( $p = 0.04$ ). Advanced tumors with highest invasiveness ( $> 14$  TFG points) were characterized by the elevated average IL-23 expression in peripheral blood mononucleated cells (PBMCs) supernatants ( $p = 0.02$ ). Our data also demonstrated the significant decrease of patient survival in relation to lack of tumor infiltrating lymphocytes according to TFG grading ( $p = 0.04$ ). The relationships between IL-17 level produced by PBMCs and clinico-morphological features were not disclosed.

**Conclusions:** In conclusion, these results suggest an importance of regulatory cytokine IL-23 in determining aggressive potential of laryngeal carcinoma.

**Key words:** laryngeal carcinoma, adhesive molecules, tumor front grading.

### Streszczenie

**Wstęp:** Aktywność subpopulacji limfocytów Th17 oraz wydzielanie prozapalnych i regulatorowych cytokin [interleukina 17 (IL-17) i IL-23] może promować zjawisko kancerogenezy i nasilać wzrost nowotworu poprzez hamowanie odpowiedzi immunologicznej na antygeny guza. Niewiele wiadomo jednak o roli tych cytokin w rozwoju i progresji zmian w raku krtani.

**Cel pracy:** Celem badań była ocena potencjalnej roli limfocytów Th17 w determinowaniu inwazyjności raka płaskonabłonkowego krtani, określonej według punktacji skali *tumor front grading* (TFG).

**Materiał i metody:** Badania dotyczyły grupy 50 chorych z rakiem płaskonabłonkowym krtani oraz grupy kontrolnej 30 zdrowych ochotników. Histologiczna ocena guza nowotworowego uwzględniała kryteria klasyfikacji pTNM i S, stopień zróżnicowania histologicznego, stopień nacieku limfocytnego oraz sumę punktów wg klasyfikacji zmian nowotworowych w obwodowej części guza (TFG). Ekspresję IL-17 i IL-23 w nadśladzku z hodowli jednojądrzastych komórek krwi obwodowej oceniano z zastosowaniem metody immunoenzymatycznej ELISA.

**Wyniki:** W przeprowadzonych badaniach wykazano, że zwiększona ekspresja IL-23 u chorych z rakiem płaskonabłonkowym krtani była wskaźnikiem większego zaawansowania zmian nowotworowych pT ( $p = 0,04$ ). Guzy nowotworowe o większej inwazyjności guza według kryteriów klasyfikacji TFG ( $> 14$  punktów) charakteryzowały się większą ekspresją IL-23 ( $p = 0,02$ ). Nie potwierdzono zależności agresywności wzrostu raka krtani dla IL-17 w badanej grupie chorych. Brak obecności nieznacznego nacieku limfocytnego w utkanie guza nowotworowego według zastosowanej skali TFG wiązał się ze skróceniem czasu przeżycia chorych ( $p = 0,043$ ).

**Wnioski:** Otrzymane wyniki wskazują na potencjalne znaczenie cytokiny regulatorowej IL-23 jako parametru zaawansowania zmian inwazyjnych nowotworowej w raku płaskonabłonkowym krtani.

**Słowa kluczowe:** rak krtani, cząsteczki adhezyjne, skala oceny frontu guza.

[104]

## Analiza metylacji DNA guzów ośrodkowego układu nerwowego – poszukiwanie nowych markerów epigenetycznych

Aleksandra Majchrzak-Celińska<sup>1</sup>, Jarosław Paluszczak<sup>1</sup>, Marlena Szalata<sup>2</sup>, Anna-Maria Barciszewska<sup>3</sup>, Stanisław Nowak<sup>3</sup>, Wanda Baer-Dubowska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Biochemistry, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland

<sup>2</sup>Department of Biochemistry and Biotechnology, Poznan University of Life Sciences, Poznan, Poland

<sup>3</sup>Chair and Department of Neurosurgery and Neurotraumatology, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, Polska

<sup>2</sup>Katedra Biochemii i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy, Poznań, Polska

<sup>3</sup>Katedra i Klinika Neurochirurgii i Neurotraumatologii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, Polska

### Abstract

**Introduction:** In the last decade, the research aimed to find novel epigenetic biomarkers has been intensified. DNA methylation analysis seems to be particularly useful in cancer diagnostics, however as far as central nervous system (CNS) tumors are concerned, this data is limited and often inconsistent.

**Aim of the study** was DNA methylation analysis of *MGMT*, *ERCC1*, *hMLH1*, *ATM*, *p15INK4B*, *p14ARF*, *p16INK4A*, *RASSF1A*, *RUNX3*, *GATA6*, *NDRG2*, *PTEN*, and *RARβ* in CNS tumors of different grades in order to select potential novel epigenetic biomarkers.

**Material and methods:** One hundred and forty tumor samples of CNS cancers were analyzed: 95 gliomas and 45 meningiomas. DNA methylation analysis was performed using MSP and pyrosequencing. The results were correlated with histological grade, according to WHO classification, age, gender, progression free and overall survival time.

**Results:** Gliomas were characterized by higher methylation index (MI) as compared to meningiomas, and their MI was correlated with histological grade and age of the patients. In gliomas, the most frequently methylated genes were *RASSF1A*, *RUNX3*, *GATA6* and *MGMT*, whereas in meningiomas *p14ARF*, *RASSF1A* and *p15INK4B*. *RUNX3* methylation was correlated with histological grade of both gliomas and meningiomas, therefore it can be regarded as a potential biomarker of aggressiveness of those tumors. Moreover in gliomas it correlated with patient's age. In meningioma group *RASSF1A* methylation was relatively more frequent in men than women. Pyrosequencing confirmed significantly higher methylation levels of *MGMT* and *NDRG2* as compared to normal brain tissue, and in the case of *MGMT* it can be regarded as a predictive biomarker.

**Conclusions:** These results indicate that DNA methylation of genes selected in this study can be useful in CNS tumors diagnostics and therapy.

**Key words:** CNS cancers, DNA methylation markers.

### Streszczenie

**Wstęp:** W ostatniej dekadzie zintensyfikowano badania mające na celu poszukiwanie epigenetycznych markerów nowotworowych. Do celów diagnostycznych szczególnie przydatna wydaje się analiza profilu metylacji DNA. Dane na ten temat w guzach ośrodkowego układu nerwowego (OUN) są stosunkowo nieliczne i niespójne.

**Cel pracy:** Ocena profilu metylacji genów: *MGMT*, *ERCC1*, *hMLH1*, *ATM*, *p15INK4B*, *p14ARF*, *p16INK4A*, *RASSF1A*, *RUNX3*, *GATA6*, *NDRG2*, *PTEN* i *RARβ*, w guzach OUN o zróżnicowanej złośliwości oraz wskazanie potencjalnych nowych markerów epigenetycznych.

**Materiał i metody:** Zbadano 140 próbek guzów pobranych od pacjentów z glejakami (95) i oponiakami (45). Metylację genów analizowano przy użyciu techniki MSP oraz pirosekwencjonowania. Oceniano korelację uzyskanych wyników z rozpoznaniem histopatologicznym wg klasyfikacji WHO, wiekiem, płcią, czasem wolnym od wznowy i okresem przeżycia pacjentów.

**Wyniki:** Glejaki charakteryzował wyższy współczynnik metylacji w porównaniu z oponiakami, a jego wartość była powiązana ze stopniem złośliwości guza oraz wiekiem pacjentów. W glejakach najczęstszą metylację stwierdzano w genach *RASSF1A*, *RUNX3*, *GATA6* oraz *MGMT*, natomiast w oponiakach *p14ARF*, *RASSF1A* i *p15INK4B*. Metylacja *RUNX3* była powiązana ze stopniem złośliwości glejaków i oponiaków, co sugeruje, że może być uważana za nowy marker agresywności obu typów guzów. Ponadto w glejakach korelowała również z wiekiem pacjentów. W oponiakach metylacja *RASSF1A* występowała relatywnie częściej u mężczyzn aniżeli u kobiet. Pirosekwencjonowanie potwierdziło znacząco wyższą metylację *MGMT* i *NDRG2* w badanych guzach w porównaniu ze zdrową tkanką mózgu, co w przypadku metylacji *MGMT* może mieć znaczenie predykcyjne.

**Wnioski:** Uzyskane wyniki wskazują, że analizowane geny mogą być pomocne w diagnostyce i terapii chorych z guzami OUN.

**Słowa kluczowe:** nowotwory OUN, markery metylacji.

[105]

## Atorwastatyna uwrażliwia komórki białaczkowe na apoptozę indukowaną przez leki przeciwnowotworowe

Jolanta D. Żołnierczyk<sup>1</sup>, Karolina Przybył<sup>1</sup>, Jerzy Z. Błoński<sup>2</sup>, Małgorzata Misiewicz<sup>2</sup>, Tadeusz Robak<sup>2</sup>, Zofia M. Kiliańska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Cytochemistry, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Poland

<sup>2</sup>Department of Hematology, Medical University of Lodz, Poland

<sup>1</sup>Katedra Cytochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź, Polska

<sup>2</sup>Katedra Hematologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Polska

### Abstract

**Introduction:** Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common leukemia of adults in Europe. Chronic lymphocytic leukemia cells have previously reported to be sensitive to statins used at high concentrations.

**Aim of the study** was to analyze whether a pretreatment of CLL cells with smaller doses of atorvastatin has an impact on the cell susceptibility to conventional chemotherapeutic agents: cladribine + mafosfamide (CM) *in vitro*.

**Material and methods:** The model cells were obtained from peripheral blood of patients with CLL by Histopaque sedimentation. Unsorted CLL cells were preincubated with atorvastatin at concentrations of 0.1  $\mu\text{M}$  and 1  $\mu\text{M}$  or DMSO (vehicle control) for 24 hours. Then, the medium was changed and the model cells were treated with/without CM drug combination for next 48 hours. Simultaneously, untreated CLL cells were exposed to atorvastatin, CM, as well as CM + atorvastatin for 48 hours. High cell density cultures were made to generate survival-inducing conditions as it was previously described (Schulz *et al.* 2011). The pro-apoptotic potential of tested agents and their combinations was assessed by flow cytometry and Western blot.

**Results:** The obtained data has shown that atorvastatin increases the pro-apoptotic potential of CM in CLL cells *in vitro*. The effect of preincubation of CM-treated CLL cells with 1  $\mu\text{M}$  statin was comparable with those observed after their exposure to CM + 10  $\mu\text{M}$  atorvastatin.

**Conclusions:** Actually, the obtained results suggest that the preincubation with atorvastatin essentially sensitizes CLL cells to CM-induced apoptosis *in vitro* and should be considered as therapeutic option for the treatment of patients who are excluded for immunotherapy.

**Key words:** chronic lymphocytic leukemia, atorvastatin, apoptosis, antileukemic treatment.

### Streszczenie

**Wstęp:** Przewlekła białaczka limfocytowa (PBL) jest najczęstszą białaczką dorosłych w Europie. Wykazano, że komórki PBL cechuje wrażliwość na atorwastatynę użytą w dużych stężeniach.

**Cel pracy:** Celem badania było wyjaśnienie, czy preinkubacja komórek białaczkowych z niższymi dawkami tej statyny zmienia wrażliwość badanych komórek na konwencjonalne chemioterapeutyki, tj. kombinację kladrybiny z mafosfamidem (*cladribine + mafosfamide – CM in vitro*).

**Materiał i metody:** Komórki izolowano z krwi obwodowej pacjentów z PBL metodą wirowania na Histopaque'u. Nie-sortowane komórki PBL poddawano działaniu atorwastatyny w stężeniach 0,1 i 1  $\mu\text{M}$  lub dimetylosulfotlenku (DMSO) (kontrola) przez 24 godziny. Następnie podłoże usuwano, a komórki inkubowano w obecności kombinacji CM przez kolejne 48 godzin. Równolegle komórki PBL nietraktowane uprzednio statynami eksponowano na atorwastatynę, CM oraz kombinację CM + atorwastatyna przez 48 godzin. Komórki kulturowano w dużej gęstości w celu wywołania zależnej od mikrośrodowiska oporności na apoptozę (wg Schulz i wsp. 2011). Proapoptotyczny potencjał testowanych związków oceniano cytometrycznie oraz techniką Western blot.

**Wyniki:** Uzyskane wyniki wskazują, że atorwastatyna zwiększa proapoptotyczną aktywność kombinacji CM w komórkach PBL *in vitro*. Preinkubacja komórek z 1  $\mu\text{M}$  atorwastatyny, z następczym ich traktowaniem kombinacją CM, wywoływała efekt porównywalny do łącznego działania CM i 10  $\mu\text{M}$  atorwastatyny przez 48 godzin.

**Wnioski:** Na obecnym etapie badań wydaje się, że preinkubacja komórek białaczkowych z atorwastatyną może uwrażliwiać je na apoptozę indukowaną konwencjonalną chemioterapią CM. Stosowanie atorwastatyny powinno być rozważone w leczeniu pacjentów z PBL, którzy nie będą poddani immunoterapii.

**Słowa kluczowe:** przewlekła białaczka limfocytowa, atorwastatyna, apoptoza, terapia przeciwbiałaczkowa.

[106]

## Molecular characteristics of cancer vaccine based on murine B16F10 melanospheres

*Charakterystyka molekularna szczepionki przeciwnowotworowej opartej o melanosfery mysiego czerniaka B16F10*

Jakub Jankowski<sup>1</sup>, Agnieszka Gąbka<sup>1</sup>, Eliza Kwiatkowska-Borowczyk<sup>1,2</sup>, Andrzej Mackiewicz<sup>1,2</sup>, Anna Kozłowska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Biotechnology, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland

<sup>2</sup>Great Poland Cancer Centre, Poznan, Poland

<sup>1</sup>Katedra Biotechnologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, Polska

<sup>2</sup>Wielkopolskie Centrum Onkologii, Poznań, Polska

### Abstract

**Introduction:** Melanoma is one of the most aggressive human malignancies. It is characterized by rapid growth, frequent and early metastasis, and poor response to conventional therapies. Immunotherapy using cancer vaccines is currently the subject of intense research and clinical trials. A possible reason for limited efficacy of currently used therapies including anticancer vaccines can be disability to eliminate cancer stem cells (CSC). Cancer stem cells are characterized by a low degree of differentiation, expression of different tumor marker molecules than differentiated cells, and potential for rapid restoration of tumor cells pool.

**Aim of the study** is to create an immunogenic cell-based vaccine that display features of cancer stem cells and thus might target and eliminate cells resistant to conventional therapies.

**Material and methods:** Murine melanoma cells were grown under conditions inducing cancer stem cells phenotype. Obtained melanospheres were then compared with the parental cells. We analyzed levels of various cancer stem cell markers using real-time PCR, flow cytometry and Western blot.

**Results:** We observed decreased *Mitf* expression in melanospheres compared to parental cell, as well as reduced level of tyrosinase – the enzyme responsible for melanin production. Melanospheres had higher activity of melanoma cancer stem cells marker – ALDH, as well as increased level of STAT3 Tyr705 phosphorylation. We also observed higher expression of vascular endothelial growth factor (VEGFa) and Nanog transcription factor.

**Conclusions:** These results show that obtained melanospheres have features of cancer stem cell model and can be used to create a vaccine able to target tumor stem cells.

**Key words:** cancer, cancer stem cells, immunotherapy, cancer vaccine.

### Streszczenie

**Wstęp:** Czerniak należy do najbardziej złośliwych nowotworów człowieka. Charakteryzuje się szybkim wzrostem, występowaniem wczesnych i licznych przerzutów oraz wielką podatnością na chemio- i radioterapię. Jedną z przyczyn ograniczonej skuteczności obecnie stosowanych terapii, w tym szczepionek rakowych, może być brak eliminacji macierzystych komórek nowotworowych (*cancer stem cells* – CSC). Macierzyste komórki nowotworowe charakteryzują się mniejszym stopniem zróżnicowania, co pociąga za sobą odmienną ekspresję markerów nowotworowych, oraz potencjałem do szybkiej odbudowy puli komórek guza.

**Cel pracy:** Celem prezentowanych badań jest stworzenie immunogennej szczepionki dostarczającej antygeny CSC i celującej w tą oporną na konwencjonalne terapie populację.

**Materiał i metody:** Komórki mysiego czerniaka hodowano w warunkach indukujących fenotyp macierzysty. W uzyskanych melanosferach, jak i w komórkach linii wyjściowej sprawdzano poziom markerów charakterystycznych dla nowotworowych komórek macierzystych z zastosowaniem metod: PCR w czasie rzeczywistym, cytometrii przepływowej oraz Western blot.

**Wyniki:** W melanosferach stwierdzono obniżoną względem komórek wyjściowych ekspresję genu kodującego czynnik transkrypcyjny *Mitf* oraz tyrozynazy – enzymu odpowiedzialnego za wytwarzanie melaniny. Melanosfery miały wyższą aktywność ALDH – markera czerniakowych komórek macierzystych, a także zwiększony poziom fosforylacji białka STAT3 w pozycji Tyr 705. W melanosferach zaobserwowano również wyższy poziom transkryptów czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (*vascular endothelial growth factor* – VEGFa) oraz czynnika transkrypcyjnego Nanog.

**Wnioski:** Wyniki te wskazują, że uzyskane melanosfery mają cechy charakterystyczne dla komórek niezróżnicowanych. Mogą one zatem posłużyć jako model nowotworowych komórek macierzystych i być wykorzystane do skonstruowania szczepionki celującej w nowotworowe komórki macierzyste.

**Słowa kluczowe:** nowotwór, nowotworowe komórki macierzyste, immunoterapia, szczepionka przeciwnowotworowa.



[107]

## STAT6 and SOCS3 expression levels as new diagnostic marker in non-small cell lung cancer (NSCLC) – preliminary study

*Ekspresja STAT6 i SOCS3 jako nowy marker diagnostyczny w niedrobnokomórkowym raku płuca – badania wstępne*

**Daria Domańska, Adam Antczak, Dorota Pastuszek-Lewandoska, Paweł Górski, Karolina H. Czarnicka, Jacek Kordiak, Monika Migdańska-Sęk, Ewa Nawrot, Justyna Kiszalkiewicz, Ewa Brzezińska**

Medical University of Lodz  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

### Abstract

**Introduction:** *STAT6* gene is related to survival, proliferation, metastasis and angiogenesis during carcinogenesis. The family of SOCS proteins is a group of negative regulators of the JAK/STAT pathway. Despite the proven feedback regulation of *STAT6* and *SOCS3* in immune cell regulation, the studies on those genes significance in cancer development – including lung cancer – are rare.

**Aim of the study:** Analysis of expression levels of *STAT6* and *SOCS3* and their mutual associations in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC).

**Material and methods:** RNA was isolated from lung tissue samples obtained from NSCLC patients ( $n = 71$ ), including the following histotypes: squamous cell carcinoma (SCC) ( $n = 41$ ), adenocarcinoma (AC) ( $n = 23$ ), and large cell carcinoma (LCC) ( $n = 7$ ). RNA isolated from macroscopically unchanged lung tissue samples served as control. *STAT6* and *SOCS3* relative expression was assessed using TaqMan® probes.

**Results:** Statistical analysis revealed the differences in expression levels (RQ values) between *STAT6*, *SOCS3* in all studied histopathological NSCLC subtypes: SCC, AC, LCC (*STAT6*  $P = 0.037$ ; *SOCS3*  $P = 0.0297$ ). The increased expression (RQ  $> 1$ ) of *STAT6* was found in 71–83% of the studied samples in all histotypes. The expression of *SOCS3* was decreased (RQ  $< 1$ ) in 93–96% samples in SCC and AC, and increased (RQ  $> 1$ ) in LCC group in 57% samples. Statistical analysis didn't reveal any associations between the expression levels and tumor staging (pTNM classification), and the clinical features of the studied NSCLC patients, i.e., age, gender and history of smoking.

**Conclusions:** Increased *STAT6* and decreased *SOCS3* expression in SCC, and lack of such association in LCC group may indicate the usefulness of the assessment of their expression in the differentiation of LCC subtype within NSCC. However, it needs further investigation on a larger group of NSCLC patients to confirm this observation.

**Key words:** *STAT6*, *SOCS3*, non small cell lung cancer.

### Streszczenie

**Wstęp:** Gen *STAT6* powiązany jest z przeżyciem, proliferacją, metastazą oraz angiogenezą procesu nowotworzenia. Rodzina białek SOCS to grupa negatywnych regulatorów szlaku JAK/STAT. Pomimo udowodnienia występowania wzajemnej regulacji typu *feedback* pomiędzy *STAT6* i *SOCS3* w immunologicznej regulacji komórek, dotychczasowe badania nad ich znaczeniem w rozwoju nowotworów – w tym płuca – są nieliczne.

**Cel pracy:** Analiza poziomu ekspresji *STAT6* i *SOCS3* oraz ich wzajemnej zależności u pacjentów z NSCLC.

**Materiał i metody:** RNA wyizolowany z fragmentów tkanek płuca (100–150 mg) pobranych śródoperacyjnie od pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca (*non-small cell lung cancer* – NSCLC) ( $n = 71$ ) z rozpoznanymi podtypami histopatologicznymi: rak płaskonabłonkowy (*squamous cell carcinoma* – SCC) ( $n = 41$ ), gruczolakorak (*adenocarcinoma* – AC) ( $n = 23$ ) oraz rak wielkokomórkowy (*large cell carcinoma* – LCC) ( $n = 7$ ). Kontrolę w badaniu stanowiło RNA wyizolowane z tkanek niezmiennych makroskopowo. Przeprowadzono reakcję RT-qPCR z użyciem sond TaqMan® (metoda  $\Delta\Delta$ CT).

**Wyniki:** Analiza statystyczna wykazała różnice w poziomie ekspresji (wartości RQ) między *STAT6* i *SOCS3* we wszystkich badanych podtypach histopatologicznych NSCLC: SCC, AC, LCC (*STAT6*  $P = 0,037$ ; *SOCS3*  $P = 0,0297$ ). Wykazano podwyższoną ekspresję (RQ  $> 1$ ) *STAT6* w 71–83% badanych próbek we wszystkich histotypach. Ekspresja *SOCS3* była obniżona (RQ  $< 1$ ) w 93–96% próbek w SCC i AC, ale podwyższona (RQ  $> 1$ ) w LCC w 57% próbek. Analiza statystyczna nie wykazała związku pomiędzy poziomem ekspresji a stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu w skali pTNM, cechami klinicznymi, tj. wiekiem pacjenta, płcią i historią palenia (liczba paczkałat) ( $P > 0,05$ ).

**Wnioski:** Wzrost ekspresji *STAT6* i obniżona ekspresja *SOCS3* w SCC, ale brak tej zależności w LCC może wskazywać na użyteczność oceny ich ekspresji w różnicowaniu podtypu LCC w obrębie NSCC. Potwierdzenie tej obserwacji wymaga jednak przeprowadzenia badań w większej grupie pacjentów.

**Słowa kluczowe:** *STAT6*, *SOCS3*, niedrobnokomórkowy rak płuca.

[108]

## Analysis of *STAT5A*, *STAT5B*, *COX-2* and *PIAS3* expression patterns in correlation with non-small cell lung cancer (NSCLC) histopathological features

Ocena profilu ekspresyjnego genów *STAT5A*, *STAT5B*, *COX-2* i *PIAS3* w niedrobnokomórkowym raku płuca

Daria Domańska, Dorota Pastuszek-Lewandoska, Adam Antczak, Paweł Górski, Jacek Kordiak, Karolina H. Czarnecka, Monika Migdalska-Sęk, Justyna Kiszatkiwicz, Ewa Nawrot, Ewa Brzeziańska

Medical University of Lodz, Poland  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Polska

### Abstract

**Introduction:** STAT proteins and their inhibitors play significant role in carcinogenesis. Together with COX-2 they regulate cell proliferation and apoptosis, being mainly involved in tumor promotion.

**Aim of the study:** Analysis of correlations of *STAT5A/B*, *COX-2* and *PIAS3* mRNA expression patterns.

**Material and methods:** RNA extracted from lung tissue samples obtained from NSCLC patients ( $n = 71$ ). Material included subtypes: squamous cell carcinoma (SCC) ( $n = 41$ ), nonsquamous cell carcinoma (NSCC) ( $n = 30$ ). RNA from macroscopically unchanged tissue served as calibrator. Analysis of gene relative expression using TaqMan® probes.

**Results:** The expression levels of *STAT5A*, *STAT5B* and *COX-2* genes were increased in 69%, 79% and 71% NSCLC samples respectively, while *PIAS3* expression was decreased in 70% of the studied tissues. Statistically differences were observed between expression levels of STAT5 isoforms ( $P = 0.0008$ ), with higher expression of STAT5B. Significant positive correlation between STAT5B and COX-2 ( $\rho = 0.045$ ) was found, as well as negative correlation between STAT5B and PIAS3 ( $\rho = -0.049$ ). The negative correlation between STAT5B and PIAS3 ( $\rho = -0.43$ ) was also observed in T2A + T2B tumors. STAT5B and COX-2 expression levels were significantly different between T1A + T1B and T2A + T2B tumors ( $P = 0.002$  vs.  $P = 0.041$ ), with higher expression of both genes in T2 tumor stage. PIAS3 expression was significantly lower in NSCC as compared with SCC ( $P = 0.017$ ). There were no statistically significant associations between expression levels of the studied genes and patients' characteristics: age, gender, tobacco addiction and consumption.

**Conclusions:** Increased expression of STAT5A/B and COX-2 with an increase in tumor size can indicate a potential diagnostic and prognostic value, while the level of PIAS3 expression may be useful in distinguishing the histological NSCLC subtypes.

**Key words:** STAT5A, STAT5B, COX-2, PIAS3.

### Streszczenie

**Wstęp:** Białka STAT oraz ich inhibitory odgrywają istotną rolę w procesie nowotworzenia. Wraz z cyklooksygenazą 2 (COX-2) regulują proliferację i apoptozę komórek, uczestnicząc w fazie promocji guza.

**Cel pracy:** Analiza zależności profilu ekspresyjnego genów *STAT5A*, *STAT5B*, *COX-2* i *PIAS3* z cechami klinicznymi i oceną histopatologiczną guza u pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca (*non-small cell lung cancer* – NSCLC).

**Materiał i metody:** RNA wyizolowany z fragmentów tkanek płuca od pacjentów z NSCLC ( $n = 71$ ), w tym podtypy: rak płaskonabłonkowy (*squamous cell carcinoma* – SCC) ( $n = 41$ ) i niepłaskonabłonkowy (*nonsquamous cell carcinoma* – NSCC) ( $n = 30$ ). RNA z tkanek niezmiennych makroskopowo stanowi kontrolę. Analizę względnej ekspresji genów przeprowadzono przy użyciu sond TaqMan®.

**Wyniki:** Ekspresja genów *STAT5A*, *STAT5B* i *COX-2* była podwyższona odpowiednio w 69%, 79% i 71% próbkach NSCLC, natomiast ekspresja *PIAS3* była obniżona w 70% badanych tkanek. Statystycznie istotne różnice zaobserwowano pomiędzy poziomami ekspresji izoform A/B STAT5 ( $P = 0,0008$ ), z wyższą ekspresją STAT5B. Statystycznie istotną dodatnią korelację pomiędzy poziomami ekspresji uzyskano dla *STAT5B* i *COX-2* ( $\rho = 0,045$ ); a ujemną korelację dla *STAT5B* i *PIAS3* ( $\rho = -0,049$ ). Ujemną korelację pomiędzy *STAT5B* i *PIAS3* zaobserwowano również w grupie T2A + T2B ( $\rho = -0,43$ ). Poziomy ekspresji były znacząco różne dla genów *STAT5B* i *COX-2* pomiędzy grupami T1A + T1B vs T2A + T2B ( $P = 0,002$  vs  $P = 0,041$ ), z wyższą ekspresją obu genów w grupie T2A + T2B. Ekspresja genu *PIAS3* była znacznie niższa w NSCC w porównaniu z SCC ( $P = 0,017$ ). Nie wykazano związku pomiędzy poziomami ekspresji badanych genów a cechami klinicznymi, tj. wiekiem pacjenta, płcią i historią palenia.

**Wnioski:** Wzrost ekspresji genów *STAT5B* i *COX-2* wraz ze wzrostem wielkości guza może wskazywać na wartość diagnostyczną i prognostyczną tych genów. Natomiast wartość ekspresji genu *PIAS3* może być przydatna w różnicowaniu podtypów histopatologicznych NSCLC.

**Słowa kluczowe:** STAT5A, STAT5B, COX-2, PIAS3.

[109]

## Obniżenie ekspresji $\beta$ -kateniny i E-kadheryny w raku wątrobowokomórkowym

Karol Rogacki<sup>1</sup>, Aldona Kasprzak<sup>1</sup>, Karolina Sterzyńska<sup>1</sup>, Wiesława Przybyszewska<sup>1</sup>, Agnieszka Seraszek-Jaros<sup>2</sup>, Agnieszka Adamek<sup>3</sup>, Przemysław Pyda<sup>4</sup>, Tomasz Kościński<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Chair of Histology and Embryology, Poznan University of Medical Sciences

<sup>2</sup>Department of Bioinformatics and Computational Biology, Chair of Pathology, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland

<sup>3</sup>Department of Infectious Diseases, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland

<sup>4</sup>Chair and Department of General, Gastroenterological and Endocrine Surgery, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, Polska

<sup>2</sup>Zakład Bioinformatyki i Biologii Obliczeniowej Katedry Patomorfologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, Polska

<sup>3</sup>Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, Polska

<sup>4</sup>Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej, Chirurgii Onkologii Gastroenterologicznej i Chirurgii Plastycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, Polska

### Abstract

**Introduction:**  $\beta$ -catenin plays a double role in carcinogenesis. Within the Wnt/Frizzled signaling pathway it plays a role of oncogene. As a component of cadherin/catenin complex it is active in inducing epithelial-mesenchymal transformation. Metastases of hepatocellular carcinoma (HCC) are accompanied by cadherin switch. Role of expression manifested by adhesion proteins as markers of HCC progression in clinical specimen is unclear.

**Aim of the study:** Localization and quantitative analysis of tissue expression of  $\beta$ -catenin, E-cadherin and N-cadherin in HCC and in control.

**Material and methods:** Tissue microarrays with HCC ( $n = 57$ ), 4 fragments of HCC from patients and control liver specimens ( $n = 8$ ). Immunocytochemistry (IHC) with ImmunoMax technique. Morphometry using Filter HSV software.

**Results:** Positive expression of  $\beta$ -catenin, E-cadherin and N-cadherin was detected in, respectively, 92%, 58%, 17% HCC. A significantly lower expression of  $\beta$ -catenin and E-cadherin in HCC as compared to the control were observed. Expression of  $\beta$ -catenin/E-cadherin/N-cadherin was detected in, respectively, cell membranes and in membranous-cytoplasmic region (86%, 86%, 100%) and exclusively in cytoplasm of HCC cells (14%, 14%, 0%). Individual cells manifested nuclear location of  $\beta$ -catenin. A significant prevalence was noted of  $\beta$ -catenin expression over expression of both cadherins. No alteration was noted in cadherin phenotypes. A significant positive correlation was detected between expressions of  $\beta$ -catenin and two cadherins. Expression of studied proteins didn't depend on histological grading of HCC, age or sex of patients.

**Conclusions:** Cellular location of  $\beta$ -catenin and E-cadherin with a reduced expression of the two proteins in hepatic cancers as compared to the control suggest disturbances of cadherin/catenin complex formation and lack of  $\beta$ -catenin activation in most HCCs.

**Key words:** cadherin/catenin complex, hepatocellular carcinoma, immunohistochemistry.

### Streszczenie

**Wstęp:**  $\beta$ -katenina odgrywa podwójną rolę w kancerogenezie. W szlaku sygnałowym Wnt/Frizzled spełnia funkcję onkogenu. Jako składnik kompleksu kadheryna/katenina aktywnie uczestniczy w transformacji nabłonkowo-mesenchymalnej. Przerzutowaniu raka wątrobowokomórkowego (*hepatocellular carcinoma* – HCC) towarzyszy przełączanie kadheryn. Rola ekspresji białek adhezyjnych jako markerów progresji HCC w materiale klinicznym jest niejasna.

**Cel pracy:** Lokalizacja i ilościowa analiza tkankowej ekspresji  $\beta$ -kateniny, E-kadheryny i N-kadheryny w grupie HCC i kontrolnej.

**Materiał i metody:** Materiał stanowiły tkankowe mikromacierze (TMA) z HCC ( $n = 57$ ), 4 fragmenty HCC od pacjentów i fragmenty wątroby kontrolnej ( $n = 8$ ). Badania immunocytochemiczne (IHC) przeprowadzono z zastosowaniem techniki ImmunoMax. Nasilenie ekspresji IHC oszacowano morfometrycznie za pomocą programu Filtr HSV.

**Wyniki:** Pozytywną ekspresję  $\beta$ -kateniny, E-kadheryny i N-kadheryny obserwowano w odpowiednio 92%, 58% i 17% HCC. Ilościowa analiza wykazała znamienne niższą ekspresję  $\beta$ -kateniny i E-kadheryny w grupie osób HCC w porównaniu z grupą kontrolną. Ekspresję  $\beta$ -kateniny, E-kadheryny, N-kadheryny wykrywano odpowiednio na błonach komórkowych i w obszarze błonowo-cytoplazmatycznym (86%, 86%, 100%) oraz wyłącznie w cytoplazmie komórek HCC (14%, 14%, 0%). Pojedyncze komórki demonstrowały jądrową lokalizację  $\beta$ -kateniny. Obserwowano znamienne przewagę ekspresji  $\beta$ -kateniny nad ekspresją obu kadheryn. Nie obserwowano istotnej zmiany fenotypu kadheryn w HCC. Wykazano istotną pozytywną korelację pomiędzy wzajemną ekspresją  $\beta$ -kateniny i obu kadheryn. Ekspresja badanych białek nie była zależna od złośliwości histologicznej HCC, wieku i płci pacjenta.

**Wnioski:** Komórkowa lokalizacja  $\beta$ -kateniny i E-kadheryny z obniżeniem ekspresji obu białek w raku wątroby w porównaniu z kontrolą wskazuje na zaburzenia tworzenia kompleksu kadheryna/katenina oraz brak aktywacji  $\beta$ -kateniny w większości HCC.

**Słowa kluczowe:** kompleks kadheryna/katenina, rak wątrobowokomórkowy, immunohistochemia.

[110]

## Kliniczno-morfologiczne znaczenie ekspresji cząsteczek adhezyjnych w raku płaskonabłonkowym krtani – analiza wstępna

Piotr Morawski<sup>1</sup>, Renata Kopta<sup>1</sup>, Marcin Mochocki<sup>1</sup>, Iwona Lewy-Trenda<sup>2</sup>, Ewa Brzezińska-Błaszczak<sup>3</sup>, Anna Pietrzak<sup>3</sup>, Agnieszka Pomykała<sup>4</sup>, Khaliunaa Lkhagva<sup>4</sup>, Joanna Nestorowicz<sup>4</sup>, Katarzyna Starska<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Szpital Specjalistyczny im. Stefana Żeromskiego w Krakowie

<sup>2</sup>Katedra Patomorfologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

<sup>3</sup>Zakład Immunologii Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

<sup>4</sup>Studenckie Koło Naukowe Immunobiologii Laryngologicznej, I Katedra i Klinika Otolaryngologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

<sup>5</sup>I Katedra i Klinika Otolaryngologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

<sup>1</sup>Szpital Specjalistyczny im. Stefana Żeromskiego w Krakowie

<sup>2</sup>Katedra Patomorfologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

<sup>3</sup>Zakład Immunologii Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

<sup>4</sup>Studenckie Koło Naukowe Immunobiologii Laryngologicznej, I Katedra i Klinika Otolaryngologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

<sup>5</sup>I Katedra i Klinika Otolaryngologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

### Abstract

**Background:** Intercellular adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 are the surface glycoproteins present in immunocompetent cells as well as endothelium and tumor cells. These molecules can be important in tumor invasion by the regulation of cell migration, angiogenesis, apoptosis, proliferation and metastases in solid tumors. However, studies indicate ambiguous role of ICAM-1 and VCAM-1 in squamous cell carcinoma of the larynx in terms of clinical significance.

**Aim of the study** was to analyze the expression of sICAM-1 and sVCAM-1 in supernatants of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) cultures, and find relationships between the clinical and morphological characteristics (pT, stage, G, type of invasion) and adhesion molecules expression in squamous cell carcinoma of the larynx.

**Material and methods:** The analysis included a group of 50 patients with verified squamous cell carcinoma of the larynx. Control group constituted 30 healthy volunteers. The pathological assessment criteria included pTNM, stage, histological grade, and type of invasion according to the tumor front grading (TFG). The expression of adhesion markers were assessed using the enzyme-linked immunosorbent assay techniques.

**Results:** Increased expression of sVCAM-1 in patients with carcinoma of the larynx was an indicator of more advanced cancerous local changes evaluated on the pT feature ( $p = 0.017$ ). The presence of lymph node metastases correlated with highest expression of adhesion molecules ( $p = 0.012$  and  $p = 0.003$ , for sICAM and sVCAM, respectively). Tumors with more diffuse growth and infiltrating with small cell groups ( $< 15$  hpf) characterized by the highest expression of soluble fraction of adhesive molecules ( $p = 0.001$  and  $p = 0.02$  for sICAM and sVCAM, respectively).

**Conclusions:** The study indicates the importance of the sICAM and sVCAM expression as a indicator of advanced changes and progression in patients with laryngeal carcinoma.

**Key words:** laryngeal carcinoma, adhesive molecules.

### Streszczenie

**Wstęp:** Cząsteczki adhezyjne ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) i VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) są powierzchniowymi glikoproteinami obecnymi na komórkach immunokompetentnych i endotelium oraz w utkaniu guza nowotworowego. Mogą determinować proces inwazji nowotworowej poprzez regulację zjawiska migracji komórek, angiogenezy, apoptozy i powstawanie przerzutów w nowotworach litych. Publikacje niejednoznacznie jednak wskazują na rolę cząsteczek ICAM-1 i VCAM-1 w raku płaskonabłonkowym krtani w aspekcie znaczenia klinicznego.

**Cel pracy:** Ocena ekspresji cząsteczek sICAM i sVCAM w nadsączu jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMCs) oraz wskazanie zależności między cechami kliniczno-morfologicznymi (pTN, stage S, G, typ inwazji) a ekspresją analizowanych markerów w raku krtani.

**Materiał i metody:** Analizą objęto grupę 50 chorych ze zweryfikowanym rakiem płaskonabłonkowym krtani. Grupę kontrolną stanowiło 30 zdrowych ochotników. W morfologicznej ocenie uwzględniono kryteria klasyfikacji pTNM i S, stopień zróżnicowania histologicznego oraz typ inwazji nowotworowej wg klasyfikacji nasilenia zmian we froncie guza (TFG). Ekspresję cząsteczek adhezyjnych CAM oceniano z zastosowaniem metody immunoenzymatycznej ELISA.

**Wyniki:** Zwiększona ekspresja cząsteczki sVCAM w nadsączach komórek krwi obwodowej u chorych z rakiem krtani była wskaźnikiem większego zaawansowania miejscowych zmian nowotworowych pT ( $p = 0,017$ ). Obecność przerzutów w węzłach chłonnych korelowała ze zwiększoną ekspresją badanych wskaźników adhezji ( $p = 0,012$  i  $p = 0,003$  dla sICAM i sVCAM). Guzy nowotworowe o bardziej rozproszonym wzroście i naciekające małymi grupami komórek ( $< 15$  wpw) charakteryzowały się większą ekspresją badanych cząsteczek adhezyjnych ( $p = 0,001$  i  $p = 0,02$  dla sICAM i sVCAM).

**Wnioski:** Przeprowadzone badania wskazują na znaczenie oceny ekspresji cząsteczek adhezyjnych jako wskaźników zaawansowania zmian i sposobu inwazji guza nowotworowego w raku krtani.

**Słowa kluczowe:** rak krtani, cząsteczki adhezyjne.

[111]

## Stereotaktyczna radioterapia niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC) we wczesnym stadium zaawansowania – czy napromienianie może zastąpić chirurgię?

Piotr Janiga

Zakład Radioterapii I, Wielkopolskie Centrum Onkologii im. Marii Curie-Skłodowskiej w Poznaniu  
Zakład Radioterapii I, Wielkopolskie Centrum Onkologii im. Marii Curie-Skłodowskiej w Poznaniu

### Abstract

Lobectomy with mediastinal lymph node dissection is a standard of care of NSCLC. Up to 25% patients are considered to be medically inoperable. Stereotactic body radiation therapy (SBRT) is a milestone in treating this group.

An idea of SBRT, implementation, outcomes, toxicity, outlook and research issues are presented in this work. Technical advance in under two decades enabled focusing radiation dose within treating target, sparing normal tissues at the same time. Stereotactic body radiation therapy in lung cancer was primarily explored by Timmerman in 2005. The outcomes were encouraging. Reported toxicity was modest except of centrally located tumors. Long follow-up series revealed extremely good outcomes, comparable to those in surgical cohorts. Low accrual unfortunately led to the premature closure of trials of lobectomy vs. SBRT. However in two phase II trials the feasibility of SBRT in operable patients was assessed, disclosing 80% 2-year local control (LC) and 70% overall survival (OS). Retrospective analysis in patients that withdrawn consent from surgery displayed 73-92% of 5-y LC and 62-72% OS. An optimal radiation dose and fractionation in centrally located tumors is a goal of ongoing trials – RTOG 0813 and LungTech – as well as peripherally (RTOG 0915, JCOG 0702). SPACE and TROG 09.02 trials compare conventional radiation therapy with SBRT. Proper fractionation schedules, late complications, surprisingly low local and locoregional failure rate and combining SBRT with chemotherapy or targeted therapy constitute research issues related to SBRT.

Stereotactic body radiation therapy is a new treatment modality in medically inoperable NSCLC. Limitations are: lack of pathologic examination, difficulties in response evaluation, lack of long follow-up, complications. SBRT could be an alternative for operable patients, however surgery is still a standard of care.

**Key words:** lung cancer, stereotactic body radiation therapy, SBRT, radiosurgery.

### Streszczenie

**Wstęp:** Standardem leczenia pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca (*non-small cell lung cancer* – NSCLC) we wczesnym stadium zaawansowania jest lobektomia z oceną węzłów chłonnych śródpiersia. Około 25% chorych nie jest kwalifikowanych do operacji. Przetomem w leczeniu tej grupy stała się wysokodawkowa radioterapia stereotaktyczna (*stereotactic body radiation therapy* – SBRT).

**Cel pracy:** W pracy przedstawiono koncepcję SBRT raka płuca, jej realizację, wyniki, toksyczność, porównanie z leczeniem operacyjnym, perspektywy rozwoju i problemy badawcze.

**Materiał i metody:** Postęp technologiczny ostatnich dekad umożliwił ścisłe ogniskowanie promieniowania na leczonej zmianie z równoczesnym wykluczeniem tkanek zdrowych. Wysokodawkowa radioterapia stereotaktyczna raka płuca po raz pierwszy została oceniona przez Timmermana w 2005 r. Uzyskano zachęcające wyniki. Raportowano zadowalającą toksyczność z wyjątkiem guzów położonych centralnie. W długotrwałych obserwacjach otrzymano zaskakująco dobre wyniki, porównywalne z obserwacjami chirurgów. Na pytanie, czy można wprost porównać SBRT do chirurgii, nie uzyskano odpowiedzi – zainicjowane badania przerwano z powodu słabego naboru. Udało się ocenić skuteczność SBRT we wczesnym NSCLC u chorych operacyjnych w badaniach II fazy – RTOG 0618 i JCOG 0403. Uzyskano 80-procentowe 2-letnie kontrole miejscowe (*local control* – LC) i 70-procentowe przeżycia całkowite (*overall survival* – OS). Retrospektywna analiza pacjentów odmawiających resekcji (Onishi) wykazała 73–92-procentową 5-letnią LC i 62–72-procentową OS.

Obecnie zmierza się do ustalenia optymalnej dawki i sposobu frakcjonowania w SBRT guzów położonych centralnie (badania RTOG 0813 i LungTech) i obwodowo (RTOG 0915, JCOG 0702), porównuje się rezultaty leczenia SBRT z klasyczną radioterapią (SPACE; TROG 09.02).

Problemy badawcze związane z SBRT obejmują: frakcjonowanie dawki promieniowania, powikłania późne, zaskakująco niski odsetek wznów miejscowych i regionalnych, kojarzenie SBRT z chemioterapią lub lekami celowanymi.

**Wyniki i wnioski:** Wysokodawkowa radioterapia stereotaktyczna to nowa metoda leczenia NSCLC. Ograniczenia obejmują: brak oceny patologicznej, trudności w analizie wyników, brak wieloletnich obserwacji, powikłania. Resekcja stanowi standard leczenia, jednak SBRT może być obiecującą alternatywą również dla pacjentów operacyjnych.

**Słowa kluczowe:** rak płuca, radioterapia stereotaktyczna, stereotaksja, radiochirurgia, SBRT.

[112]

## Efekt ekspresji podoplaniny w mikrośrodkowisku raka piersi

Anna Tejchman<sup>1,2</sup>, Marek Chadalski<sup>2</sup>, Mahdi Nadim<sup>1</sup>, Catherine Grillon<sup>1</sup>, Claudine Kieda<sup>1</sup>, Maciej Ugorski<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Glikobiologii i Oddziaływań Komórkowych, Centrum Biofizyki Molekularnej CNRS UPR 4301, France

<sup>2</sup>Laboratorium Glikobiologii i Oddziaływań Międzykomórkowych, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, Wrocław, Polska

<sup>1</sup>Laboratorium Glikobiologii i Oddziaływań Komórkowych, Centrum Biofizyki Molekularnej CNRS UPR 4301, France

<sup>2</sup>Laboratorium Glikobiologii i Oddziaływań Międzykomórkowych, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, Wrocław, Polska

### Abstract

Podoplanin, a highly O-glycosylated transmembrane protein is expressed in many cell types and cancers [1] involved in platelet aggregation [2] and in metastasis [3]. Tumor stroma, composed of cancer, immune, endothelial cells (EC) and cancer-associated fibroblasts (CAFs) in an extracellular matrix, promotes cancer progression. The angiogenic switch starts malignant stroma development. Fibroblasts activated into CAFs get a distinct gene profile and properties [4]. They induce tumor growth, endothelial progenitor cells recruitment and cooperate to angiogenesis [5]. Cancer-associated fibroblasts express podoplanin [6, 7], the activity and control of which are poorly known. Mediation of adhesion by CCL21/CCR7+ axis [8] and control by miRNAs, as miR-21 an oncomiR targeting PTEN, tumor suppressor and key regulator of angiogenesis [9] are hypothesized. By mimicking tumor hypoxia, we show the effect of miRs on podoplanin expression by CAFs and its role in angiogenesis and recognition of cancer cells.

**Aim of the study:** Podoplanin in CAFs impacts on:

- angiogenesis in hypoxia vs. normoxia;
- miRs control;
- adhesion and migration of cancer cells.

**Material and methods:** MSU1.1 cells transduction to CAF-like fibroblasts. Adhesion assesment by BioFluxTM. Angiogenesis of ECs with CAFs in Matrigel™ miRNAs quantification by qPCR.

**Results and conclusions:** Hypoxia-induced podoplanin in CAFs accelerates tumor angiogenesis and mediates CCR7+/CCL21 breast cancer cell adhesion. Higher expression of miR-21, miR-210 and miR-29b in CAFs in hypoxia accompanied podoplanin up regulation and PTEN down regulation. We propose miR-21 as control factor of podoplanin that decrease PTEN expression in tumor microenvironment affected by hypoxia.

**Key words:** podoplanin, breast cancer, cancer microenvironment, CAF, miRNA, hypoxia.

### References

1. Schacht V, Ramirez MI, Hong YK, et al. T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J* 2003; 22: 3546-3556, doi: 10.1093/emboj/cdg342.
2. Fujita N, Takagi S. The impact of Aggrus/podoplanin on platelet aggregation and tumour metastasis. *J Biochem* 2012; 152: 407-413, doi: 10.1093/jb/mvs108.
3. Cueni LN, Hegyi I, Shin JW, Albinger-Hegy A, Gruber S, Kunstfeld R, Moch H, Detmar M. Tumor lymphangiogenesis and metastasis to lymph nodes induced by cancer cell expression of podoplanin. *Am J Pathol* 2010; 177: 1004-1016, doi: 10.2353/ajpath.2010.090703.

### Streszczenie

Podoplanina jest silnie O-glikozylowaną transbłonową proteiną, ekspresjonowaną w wielu typach komórek i nowotworów [1], zaangażowaną w agregację płytek krwi [2] i metastazę [3]. Podścielisko guza składające się z komórek nowotworowych, odpornościowych, endotelialnych oraz fibroblastów towarzyszących nowotworom (*cancer associated fibroblasts* – CAFs) wspomaga rozwój nowotworu. Ponadto rozpoczęcie angiogenezy powoduje zmiany w tym mikrośrodkowisku. Fibroblasty ulegają aktywacji do CAFs, które mają inne od normalnych właściwości i profil genetyczny [4]; indukują wzrost guza, rekrutację endotelialnych komórek progenitorowych i angiogenezę [5]. Fibroblasty towarzyszące nowotworom ekspresjonują podoplaninę [6, 7], a jej aktywność i mechanizmy kontroli są słabo poznane. Sugeruje się, że miRs, takie jak miR-21, który degraduje mRNA supresora nowotworów i kluczowy regulator angiogenezy (PTEN) [9], kontrolują ekspresję podoplaniny. Uzyskana w ten sposób nadekspresja podoplaniny może wpływać na adhezję zachodzącą na osi CCL21/CCR7+8. W badaniach wykazaliśmy efekt miRs na ekspresję podoplaniny w CAFs oraz jej rolę w angiogenezie oraz rozpoznawaniu komórek nowotworowych w warunkach hipoksji.

**Cel pracy:** Wpływ podoplaniny w CAFs na:

- angiogenezę w hipoksji vs normoksji;
- ekspresję miR;
- adhezję i migrację komórek nowotworowych.

**Materiał i metody:** Komórki MSU1.1 stransdukowano do fibroblastów CAF-like. Ocena adhezji – BioFluxTM. Angiogeneza z ECs i CAFs w Matrygelu™. Ocena ekspresji miRs metodą qPCR.

**Wyniki i wnioski:** Indukowana w hipoksji ekspresja podoplaniny w CAFs przyspiesza angiogenezę i pośredniczy w adhezji komórek raka piersi na osi CCL21/CCR7+. Wzrost ekspresji miR-21, miR-210 i miR-29b w CAFs w hipoksji towarzyszy nadekspresji podoplaniny i zmniejszeniu ekspresji PTEN. Uważamy, że miR-21 może kontrolować ekspresję podoplaniny poprzez inhibicję ekspresji PTEN w mikrośrodkowisku nowotworu.

**Słowa kluczowe:** podoplanina, rak piersi, mikrośrodkowisko nowotworu, CAF, miRNA, hipoksja.

### Piśmiennictwo

1. Schacht V, Ramirez MI, Hong YK, et al. T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J* 2003; 22: 3546-3556, doi: 10.1093/emboj/cdg342.
2. Fujita N, Takagi S. The impact of Aggrus/podoplanin on platelet aggregation and tumour metastasis. *J Biochem* 2012; 152: 407-413, doi: 10.1093/jb/mvs108.

4. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 2001; 411: 375-379, doi: 10.1038/35077241.
5. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 392-401, doi: 10.1038/nrc1877.
6. Kawase A, Ishii G, Nagai K, et al. Podoplanin expression by cancer associated fibroblasts predicts poor prognosis of lung adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2008; 123: 1053-1059, doi: 10.1002/ijc.23611.
7. Pula B, Jethon A, Piotrowska A, et al. Podoplanin expression by cancer-associated fibroblasts predicts poor outcome in invasive ductal breast carcinoma. *Histopathology* 2011; 59: 1249-1260.
8. Kerjaschki D, Regele HM, Moosberger I, et al. Lymphatic neoangiogenesis in human kidney transplants is associated with immunologically active lymphocytic infiltrates. *J Am Soc Nephrol* 2003; 15: 603-612, doi: 10.1097/O1.ASN.0000113316.52371.2E.
9. Kieda C, El Hafny-Rahbi B, Collet G, et al. Stable tumor vessel normalization with pO<sub>2</sub> increase and endothelial PTEN activation by inositol trispyrophosphate brings novel tumor treatment. *J Mol Med* 2013; 91: 883-899, doi:10.1007/s00109-013-0992-6.
3. Cueni LN, Hegyi I, Shin JW, Albinger-Hegy A, Gruber S, Kunstfeld R, Moch H, Detmar M. Tumor lymphangiogenesis and metastasis to lymph nodes induced by cancer cell expression of podoplanin. *Am J Pathol* 2010; 177: 1004-1016, doi: 10.2353/ajpath.2010.090703.
4. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 2001; 411: 375-379, doi: 10.1038/35077241.
5. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 392-401, doi: 10.1038/nrc1877.
6. Kawase A, Ishii G, Nagai K, et al. Podoplanin expression by cancer associated fibroblasts predicts poor prognosis of lung adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2008; 123: 1053-1059, doi: 10.1002/ijc.23611.
7. Pula B, Jethon A, Piotrowska A, et al. Podoplanin expression by cancer-associated fibroblasts predicts poor outcome in invasive ductal breast carcinoma. *Histopathology* 2011; 59: 1249-1260.
8. Kerjaschki D, Regele HM, Moosberger I, et al. Lymphatic neoangiogenesis in human kidney transplants is associated with immunologically active lymphocytic infiltrates. *J Am Soc Nephrol* 2003; 15: 603-612, doi: 10.1097/O1.ASN.0000113316.52371.2E.
9. Kieda C, El Hafny-Rahbi B, Collet G, et al. Stable tumor vessel normalization with pO<sub>2</sub> increase and endothelial PTEN activation by inositol trispyrophosphate brings novel tumor treatment. *J Mol Med* 2013; 91: 883-899, doi:10.1007/s00109-013-0992-6.

[113]

## Interaction of MNPs with biological model systems for potential cancer treatment.

Sylwia Haracz<sup>1\*</sup>, Monika Kręcisz<sup>1\*</sup>, Aleksander Jan Strugała<sup>1,2\*</sup>, Jakub Dalibor Rybka<sup>1</sup>, Anna Urbanowicz<sup>2</sup>, Bohdan Skalski<sup>1</sup>, Marek Figlerowicz<sup>2</sup>, Maciej Kozak<sup>3</sup>, Michael Giersig<sup>1,4</sup>

\* These authors contributed equally to this work.

<sup>1</sup>Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, Poznan, Poland

<sup>2</sup>Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland

<sup>3</sup>Faculty of Physics, Adam Mickiewicz University, Poznan, Poland

<sup>4</sup>Institut für Experimentalphysik, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

### Abstract

Magnetic nanoparticles (MNPs) have been widely investigated due to their potential use in multiple biomedical applications such as cancer therapy, especially as components of drug delivery systems, contrasting agents in medical imaging or in hyperthermia [1]. Biological templating of inorganic nanoparticles provides promising opportunities for medicine. The most promising carriers for the synthesis of magnetic nanoparticles are plant viruses, such as the Brome Mosaic Virus (BMV) and the Red Clover Necrotic Mosaic Virus (RCNMV). Both mentioned viruses can be utilized also as excellent delivery vehicles. Here we report on the structural transition of BMV at pH ranging from 4.5 to 8.5 using circular dichroism (CD) and dynamic light scattering (DLS) techniques.

We have investigated the impact of magnetic nanoparticles with three different core sizes (10, 13, 15 nm) on biomembrane model systems based on 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC). Samples with 10% (w/w) DMPC and four concentrations of MNP's were examined by Attenuated Total Reflectance – Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR) and Differential Scanning Calorimetry (DSC), to define the phase behaviour of phospholipids under the influence of magnetic nanoparticles. The size of the nanoparticles core has the greatest impact on the biomembrane model, but the concentration of MNP's in this interaction is also meaningful. These aspects are directly connected to the toxicity of nanoparticles and therefore stand in the focus of our study.

**Key words:** magnetic nanoparticles, Brome Mosaic Virus (BMV), DMPC.

### References

1. Figuerola A, Di Corato R, Manna L, Pellegrino T. From iron oxide nanoparticles towards advanced iron- based inorganic materials designed for biomedical applications. *Pharmacol Res* 2010; 62: 128-43.

### Streszczenie

Z uwagi na liczne potencjalne zastosowania biomedyczne, w tym w terapii nowotworowej, jako nośniki leków, środków kontrastujące w obrazowaniu, czy w terapii hipertermicznej, nanocząstki magnetyczne są obiektem szeroko zakrojonych badań [1]. Wykorzystanie matryc biologicznych do enkapsulacji nanocząstek nieorganicznych stwarza dodatkowo wiele obiecujących możliwości zastosowania ich w medycynie. Jednymi z najbardziej obiecujących matryc do syntezy i enkapsulacji nanocząstek magnetycznych są wirusy roślinne, takie jak wirus mozaiki stokłosa (BMV) oraz wirus nekrotycznej mozaiki koniczyny czerwonej (RCNMV). Za pomocą metod dichroizmu kołowego (CD) i dynamicznego rozpraszania światła (DLS) scharakteryzowaliśmy zmiany strukturalne wirusa BMV w zależności od pH w zakresie od 4,5 do 8,5.

Zbadaliśmy także wpływ nanocząstek magnetycznych o trzech wielkościach rdzenia (10, 13 oraz 15 nm) na układ modelowy błon biologicznych zbudowany z cząsteczek 1,2-dimyristoylo-sn-glycero-3-fosfatydylocholino (DMPC). W celu określenia wpływu nanocząstek na przemiany fazowe fosfolipidów, przebadaliśmy za pomocą spektroskopii w podczerwieni (ATR-FTIR) oraz kalorymetrycznie (DSC) roztwory 10% DMPC z dodatkiem nanocząstek (w czterech stężeniach). Największy wpływ na modelowy układ błon biologicznych ma rozmiar rdzenia nanocząstek, ale również ich stężenie jest znaczące. Wymienione czynniki ściśle wiążą się z toksycznością nanocząstek i dlatego też są przedmiotem naszych badań.

**Słowa kluczowe:** magnetyczne nanocząstki, wirus mozaiki stokłosa (BMV), DMPC.

### Piśmiennictwo

1. Figuerola A, Di Corato R, Manna L, Pellegrino T. From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications. *Pharmacol Res* 2010; 62: 128-43.



[114]

## Immunohistochemical analysis of Hsp27 and SNAIL expression in breast cancer and mastopathies

*Immunohistochemiczna analiza ekspresji białka Hsp27 i SNAIL w rakach gruczołu piersiowego oraz mastopatiach*

**Jędrzej Grzegorzówka<sup>1</sup>, Martyna Biała<sup>1</sup>, Patrycja Wojtyra<sup>1</sup>, Christopher Kobierzycki<sup>1</sup>, Bartosz Puła<sup>1,2</sup>, Aleksandra Piotrowska<sup>1,2</sup>, Janusz Ryś<sup>3</sup>, Marzena Podhorska-Okołów<sup>1,2</sup>, Piotr Dziegielel<sup>1,2,4</sup>**

<sup>1</sup>Department of Histology and Embryology, Medical University, Wrocław, Poland

<sup>2</sup>Regional Specialist Hospital, Research and Development Centre, Wrocław, Poland

<sup>3</sup>Department of Tumor Pathology, Center of Oncology, Maria Skłodowska-Curie Memorial Institute, Krakow, Poland

<sup>4</sup>Department of Physiotherapy, Wrocław University School of Physical Education, Wrocław, Poland

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Polska

<sup>2</sup>Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej, Wojewódzki Szpital Specjalistyczny we Wrocławiu, Polska

<sup>3</sup>Zakład Patomorfologii Centrum Onkologii Instytutu im. Marii Curie-Skłodowskiej, Kraków, Polska

<sup>4</sup>Katedra Fizjoterapii i Terapii Zajęciowej w Medycynie Zachowawczej i Zabiegowej, Akademia Wychowania Fizycznego we Wrocławiu, Polska

### Abstract

Expression of heat shock protein 27 (Hsp27) increases during cellular stress conditions. Hsp27 regulates the expression of steroid receptors and modulates extracellular matrix homeostasis. Hsp27 was shown to be overexpressed also in neoplastic cells of breast, prostate cancers and increases with higher malignancy grade. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) is a process in which cancer cells lose E-cadherin expression and start to express markers characteristic for cells of mesenchymal origin (e.g. N-cadherin, vimentin). The transcription factor SNAIL is involved in this process.

The aim of the study was to examine the intensity of Hsp27 and SNAIL expression as well their reciprocal correlations and with clinico-pathological data of invasive ductal breast cancer (IDC), invasive lobular breast cancer (ILC) and mastopathies.

The study was conducted on 148 cases of IDC, 31 cases of ILC and 19 mastopathies. We performed immunohistochemical (IHC) reactions using Dako Autostainer Link 48. Cytoplasmic Hsp27 expression was evaluated with Immunoreactive Score (IRS) of Remmele and Stegner, whereas SNAIL nuclear expression was evaluated semiquantitatively based on the percentage of cancer cells with reaction product.

Statistical analysis showed higher Hsp27 expression in IDC and ILC cells as compared to mastopathies ( $p < 0.001$  and  $p < 0.01$  respectively). In IDC, a weak positive correlation between Hsp27 and SNAIL ( $r = 0.241$ ,  $p < 0.01$ ), as well as a weak positive correlation of Hsp27 with estrogen (ER) and progesterone (PR) receptors ( $r = 0.268$ ,  $p < 0.01$ ;  $r = 0.248$ ,  $p < 0.05$ , respectively) was found. Nuclear SNAIL expression was positively correlated with ER ( $r = 0.376$ ,  $p < 0.0001$ ) and PR ( $r = 0.352$ ,  $p < 0.0001$ ) in IDC.

Higher Hsp27 expression in IDC and ILC in comparison to mastopathies may suggest its role in carcinogenesis. Furthermore, the observed positive correlation of Hsp27 and SNAIL expression might suggest a possible role of Hsp27 in EMT process in IDC.

### Streszczenie

Ekspresja białka szoku termicznego-27 (Hsp27) wzrasta w komórkach narażonych na warunki stresowe. Wykazano, że Hsp27 reguluje ekspresję receptorów hormonów steroidowych oraz homeostazę macierzy zewnątrzkomórkowej. Ponadto nadekspresja Hsp27 występuje m.in. w komórkach nowotworowych raków gruczołu piersiowego oraz prostaty i wzrasta wraz ze stopniem złośliwości ww. guzów. Przejście epitelialno-mezenchymalne jest procesem, podczas którego komórki nowotworowe tracą ekspresję E-kadheryny, a zaczynają ekspresjonować białka charakterystyczne dla fenotypu mezenchymalnego (np. N-kadherynę, wimentynę). Ponadto zjawisko EMT zachodzi przy udziale czynnika transkrypcyjnego SNAIL.

Celem pracy było określenie stopnia nasilenia ekspresji Hsp27 oraz SNAIL, zbadanie ich wzajemnej korelacji oraz związku z danymi kliniczno-patologicznymi w rakach przewodowych gruczołu piersiowego (IDC), rakach zrazikowych gruczołu piersiowego (ILC) oraz mastopatiach.

Do badań użyto 148 przypadków IDC, 31 przypadków ILC oraz 19 mastopatii. Z wykorzystaniem Dako Autostainer Link 48 przeprowadzono reakcje immunohistochemiczne (IHC). Cytoplazmatyczną ekspresję Hsp27 oceniano za pomocą skali IRS wg Remmele i Stegnera, natomiast jądrową ekspresję SNAIL za pomocą półilościowej, skali uwzględniającej odsetek komórek wykazujących reakcję barwną.

Analiza statystyczna uzyskanych wyników wykazała wyższą ekspresję Hsp27 w komórkach IDC oraz ILC w porównaniu z mastopatią (odpowiednio:  $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$ ). W IDC wykazano słabą dodatnią korelację pomiędzy ekspresją Hsp27 i SNAIL ( $r = 0,241$ ,  $p < 0,01$ ), jak również ekspresją receptorów estrogenowych (ER;  $r = 0,26$ ,  $p < 0,01$ ) oraz progesteronowych (PR;  $r = 0,24$ ,  $p < 0,05$ ). Jądrowa ekspresja SNAIL korelowała dodatnio z ekspresją ER ( $r = 0,37$ ,  $p < 0,0001$ ) i PR ( $r = 0,35$ ,  $p < 0,0001$ ).

Wyższa ekspresja Hsp27 w komórkach IDC i ILC w porównaniu z mastopatią może sugerować rolę tego białka w procesie kancerogenezy. Dodatkowo uzyskane rezultaty korelacji ekspresji Hsp27 z SNAIL mogą wskazywać na rolę Hsp27 w procesie EMT w IDC.