

Streszczenie

Rak jelita grubego (CRC) to jeden z najczęstszych nowotworów złośliwych, w którym wczesne rozpoznanie choroby decyduje o losach pacjenta, stąd tak ważne są badania przesiewowe umożliwiające detekcję CRC już na wczesnym etapie rozwoju zmian neoplastycznych. Brak specyficznych objawów choroby oraz częsty przebieg bezobjawowy tego nowotworu, jak również niezadowalająca skuteczność aktualnie dostępnych narzędzi screeningowych wymusza poszukiwanie nowych biomarkerów o potencjale diagnostycznym.

Pęcherzyki pozakomórkowe (EVs) jako produkt egzocytozy należą do ważnych ogniw w komunikacji międzykomórkowej z uwagi na możliwość transportu licznych biomolekuł takich jak białka, lipidy i kwasy nukleinowe w ich aktywnej postaci, co skutkuje zmianami w metabolizmie i aktywności biologicznej komórek docelowych będących ich biorcom.

EVs stanowią niezwykle heterogenną populację, którą w oparciu o różnice w średnicy można podzielić na egzomery (< 50 nm), egzosomy (50-150 nm), mikropęcherzyki (150-1000 nm) i onkosomy (>1000 nm). Poszczególne subpopulacje EVs poza odmiennym zakresem wielkości wykazują także zróżnicowanie czynnościowe poprzez swoje działanie na odpowiedź komórkową. W rakach litych, takich jak CRC, których rozwój jest związany z przewlekłym stanem zapalnym, szczególnie ważną funkcją EVs jest zdolność do regulacji odpowiedzi immunologicznej poprzez immunosupresyjny wpływ na odpowiednie podtypy komórek immunologicznie kompetentnych. Dotychczas nie poznano biomarkerów odpowiedzialnych za transformację nowotworową w kierunku CRC, a pęcherzyki pozakomórkowe uwalniane z tkanek zmienionych patologicznie, poprzez zdolność do modyfikacji parametrów immunologicznych oraz transport onkogenów są potencjalnym czynnikiem sprawczym w procesie onkogenezy do procesu nowotworowego oraz progresji choroby. EVs wydają się wykazywać ważne znaczenie w progresji CRC i tworzeniu przerzutów odległych, a z uwagi na zmiany proteomiczne zachodzące w ich zawartości są rozpatrywane w kategorii nowych biomarkerów tego nowotworu. Uwalniane z komórek nowotworowych EVs są możliwe do wykrycia we krwi oraz w innych płynach ustrojowych, co czyni je potencjalnym kandydatem w screeningu chorób nowotworowych, w tym CRC. Pęcherzyki pozakomórkowe, w zależności od rodzaju komórek je uwalniających wykazują zróżnicowanie morfologiczne w zakresie średnic oraz jakościowe w odniesieniu do składu ich ładunku. Przedstawione powyżej informacje są zawarte w pierwszej pracy poglądowej (Zadka Ł et al., Modeling of the immune response in the pathogenesis of solid tumors and its prognostic significance; **Cellular Oncology**, 2020).

Streszczenie

Poważnym ograniczeniem przeprowadzonych dotychczas badań skupionych na poznaniu roli EVs w patogenezie CRC jest zawężenie analiz do modeli *in vitro* wybranych linii komórkowych oraz płynów ustrojowych takich jak surowica czy osocze. Brakuje natomiast badań przeprowadzonych na pęcherzykach wyizolowanych z tkanki litej, co umożliwiłoby obserwację zjawiska egzocytozy w komórkach nowotworowych oraz w mikrośrodoisku guza. Analizy EVs wyizolowanych z materiału tkankowego stanowiącego tkanki lite są niezwykle rzadko przeprowadzane z uwagi na trudności techniczne wynikające m.in. z braku dostępności skutecznych protokołów umożliwiających taką izolację, jak również rekomendacji, wobec tego typu procedur.

W drugiej publikacji ujętej w cyklu będącym przedmiotem pracy doktorskiej przeprowadzono badanie immunohistochemiczne (IHC) na skrawkach parafinowych. Wykonano je na grupie 109 pacjentów z rozpoznaniem raka jelita grubego o podtypie histopatologicznym gruczolakoraka. Przeprowadzono reakcje IHC obrazujące ekspresję tetraspanin CD9 i CD63 należących do dobrze poznanych biomarkerów egzosomalnych oraz nasilenie ekspresji antygenu proliferacji komórkowej Ki-67. Tkankę kontrolną stanowiło 27 bloczków parafinowych (FFPE) pobranych z marginesów chirurgicznych, stanowiących prawidłową śluzówkę jelita grubego. Przed wykonaniem reakcji IHC tkankę kontrolną zweryfikowano mikroskopowo wykluczając obecność komórek nowotworowych w badanych wycinkach. Do oceny poziomu ekspresji badanych markerów wykorzystano odpowiedni system oceny półilościowej. Reakcje pozytywne oceniano wyłącznie w zakresie komórek nowotworowych, w których zaobserwowano dominującą ekspresję cytoplazmatyczną dla CD9 i CD63 oraz jądrową dla antygenu Ki-67. Wykazano nadekspresję obu tetraspanin w CRC wobec prawidłowej tkanki kontrolnej ($p < 0.001$). Ekspresja CD9 była zależna od przerzutów do węzłów chłonnych (N) i wykazała wyższą ekspresję w węzłach chłonnych zajętych przez komórki nowotworowe ($p = 0.01$). Poziom ekspresji CD63 był istotnie wyższy w stadium N1b aniżeli N1a ($p = 0.002$) oraz w lewostronnym CRC ($p = 0.04$). Obserwowano dodatnią korelację ekspresji z Ki-67 zarówno dla CD9 ($r = 0.55$, $p < 0.001$) jak i CD63 ($r = 0.32$, $p = 0.003$). Niezależnie od reakcji IHC, wykonano pomiary stężenia nanocząstek, odpowiadających morfologicznie EVs wyizolowanych z archiwalnej tkanki mrożonej CRC, w porównaniu z dopasowaną tkanką kontrolną ($n = 20$). W metodzie śledzenia nanocząstek (NTA) potwierdzono istotnie wyższe wartości stężeń pęcherzyków pozakomórkowych w guzie aniżeli w kontroli ($p = 0.01$). Egzosomalny charakter badanych pęcherzyków został potwierdzony badaniami jakościowymi w metodach western blot (WB) oraz immunogold dla transmisyjnej mikroskopii elektronowej. W pracy po raz pierwszy udokumentowano akcelerację zjawiska egzocytozy w

Streszczenie

CRC (Zadka Ł et al., Comparative analysis of exosome markers and extracellular vesicles between colorectal cancer and cancer-associated normal colonic mucosa; **Polish Archives of Internal Medicine**, 2020).

W następnej publikacji z cyklu, przeprowadzono izolację EVs z archiwalnej tkanki mrożonej (n=11) z CRC o zróżnicowanych danych kliniczno-patologicznych takich jak: rozpoznanie histopatologiczne, stopień złośliwości nowotworu G, aktywność proliferacyjna, oraz z osocza pozyskanego w procedurze wirowania świeżej krwi żyłnej pobranej od pacjentów z rozpoznaniem CRC (n=2) i wrzodziejącego zapalenia jelita grubego (n=2) jako zmian *de novo* wykrytych podczas kolonoskopii dolnego odcinka przewodu pokarmowego. Pęcherzyki pozakomórkowe izolowano przy wykorzystaniu ultrawirowania klasycznego i różnicowego na poduszce sacharozy jak również stosując komercyjnie dostępne odczynniki przeznaczone do precypitacji egzosomów. Precypitację EVs przeprowadzono również na wybranych liniach komórkowych reprezentujących komórki nowotworowe CRC o różnej złośliwości biologicznej (HT-29, CaCo-2, LoVo) oraz na liniach kontrolnych nabłonka jelitowego (CCD-18Co) i komórek mieloidalnych (HMEC-1). Do oceny heterogeniczności EVs wykorzystano dwie niezależne metody: holotomografię cyfrową (DHT) i mikroanalizy pierwiastkowe EDS. Oceny dystrybucji pierwiastków metodą EDS przeprowadzono na liofilizowanych pelletach EVs pozyskanych przy wykorzystaniu komercyjnie dostępnych odczynników. W metodzie DHT wykazano zmiany w indeksie refrakcji (RI) badanych EVs zależne od metody izolacji, diagnozy, stopnia G oraz aktywności proliferacyjnej badanych nowotworów. W izolatach EVs pozyskanych z mrożonych tkanek archiwalnych zaobserwowano wzrastające wartości RI wraz ze stopniem G oraz aktywnością proliferacyjną badanych nowotworów. W modelu *in vitro* odnotowano wyższe wartości RI dla linii CRC jak również dla EVs uwalnianych przez komórki nowotworowe. W metodzie DHT wykazano również zmiany w morfometrii EVs ujawniając trend do występowania pęcherzyków o większej średnicy we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego (UC) aniżeli w CRC. Co więcej, w metodzie EDS ujawniono istnienie istotnych różnic w składzie pierwiastkowym między pęcherzykami wyizolowanymi od pacjentów z rozpoznaniem CRC i UC. Egzosomalna natura badanych próbek została zweryfikowana z wykorzystaniem skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM), metody WB oraz z użyciem metody immunofluorescencji w odniesieniu do linii komórkowych, jak również przy zastosowaniu wielokrotnych reakcji immunohistochemicznych z różnokolorowymi znacznikami, przeprowadzonych na bloczkach FFPE odpowiadającym tkankom mrożonym, z których precypitowano EVs (Zadka Ł et al., Label-Free Quantitative Phase Imaging Reveals Spatial Heterogeneity of Extracellular Vesicles in Select Colon Disorders; **American Journal**

Streszczenie

of Pathology, 2021).

Do oceny heterogeniczności EVs opisane wyżej metody DHT i EDS zastosowano po raz pierwszy, a związek EVs z danymi patologicznymi wymaga przeprowadzenia dalszych badań ukierunkowanych na ocenę jakościową składu EVs.

Summary

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common malignant neoplasms in which the early diagnosis of the disease determines the patient's fate, hence the importance of screening tests enabling the detection of CRC at an early stage of neoplastic changes development. The lack of specific symptoms of the disease and the frequent asymptomatic course of this cancer, as well as the unsatisfactory effectiveness of the currently available screening tools necessitate the search for new biomarkers with diagnostic potential.

Extracellular vesicles (EVs) as a product of exocytosis belong to important links in intercellular communication due to the possibility of transporting numerous biomolecules such as proteins, lipids and nucleic acids in their active form, which results in changes in metabolism and biological activity of recipient target cells.

EVs constitute a remarkably heterogeneous population that can be divided into exomers (<50 nm), exosomes (50-150 nm), microbubbles (150-1000 nm) and oncosomes (> 1000 nm) based on differences in diameter. Individual subpopulations of EVs, apart from a different size range, also show functional differentiation through specific effects on the cellular response. In solid cancers such as CRC, the development of which is associated with chronic inflammation, a particularly important function of EVs is the ability to regulate the immune response through immunosuppressive effects on the relevant subtypes of immunologically competent cells. So far, no biomarkers responsible for neoplastic transformation towards CRC have been known, and extracellular vesicles released from pathologically altered tissues through the ability to modify immunological parameters and transport of oncogenes are a potential causative factor in the process of oncogenesis to neoplastic process and disease progression. EVs appear to demonstrate important meaning in the progression of CRC and the formation of distant metastases, and due to proteomic changes in their content, they are considered as new biomarkers of this cancer. The EVs released from cancer cells are detectable in the blood and in other body fluids, making them a potential candidate for cancer screening, including CRC. Extracellular vesicles, depending on the type of cells releasing them show morphological differentiation in terms of diameters and qualitative differences in relation to the composition of their cargo. The information described above is included in the first review work (Zadka Ł et al., Modeling of the immune response in the pathogenesis of solid tumors and its prognostic significance; **Cellular Oncology**, 2020).

A serious limitation of the research conducted so far focused on understanding the role of EVs in the pathogenesis of CRC is narrowing of the analyzes to *in vitro* models of selected

Streszczenie

cell lines and body fluids such as serum or plasma. However, there are no studies carried out on vesicles isolated from solid tissue, which would allow the observation of the phenomenon of exocytosis in neoplastic cells and in the tumor microenvironment. Analyzes of EVs isolated from solid tissue material are extremely rarely carried out due to technical difficulties resulting, among others, from due to the lack of effective protocols enabling such isolation, as well as no recommendations for that kind of procedures.

In the second publication included in the cycle being the subject of the Doctoral dissertation, an immunohistochemical examination (IHC) was carried out on paraffin sections. It was performed on a group of 109 patients diagnosed with colorectal cancer of the histopathological subtype of adenocarcinoma. IHC reactions were performed, showing the expression of the CD9 and CD63 tetraspanins that belong to well-known exosomal biomarkers and the exacerbation of expression of the Ki-67 cell proliferation antigen. The control tissue consisted of 27 formalin fixed paraffin embedded blocks (FFPE) collected from the surgical margins, constituting the normal mucosa of the large intestine. Before performing the IHC reaction, the control tissue was microscopically verified to exclude the presence of cancer cells in the examined sections. An appropriate semi-quantitative scoring system was used to evaluate the expression level of the investigated markers. Positive reactions were assessed only in the range of cancer cells in which the dominant cytoplasmic expression for CD9 and CD63 and nuclear expression for the Ki-67 antigen was observed. Both tetraspanins were shown to be overexpressed in CRC compared to normal tissue control ($p < 0.001$). CD9 expression depended on lymph node metastases (N) and showed higher expression in lymph nodes infiltrated by tumor cells ($p = 0.01$). The level of CD63 expression was significantly higher in the N1b stage than in the N1a stage ($p = 0.002$) and in the left-sided CRC ($p = 0.04$). The positive correlation of expression with Ki-67 was observed for both CD9 ($r = 0.55$, $p < 0.001$) and CD63 ($r = 0.32$, $p = 0.003$). Regardless of the IHC reactions, measurements of the concentration of nanoparticles, morphologically corresponding to EVs isolated from archived frozen CRC tissue, were performed, in comparison with matched control tissue ($n = 20$). The Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) method confirmed significantly higher concentration values of extracellular vesicles in the tumor than in the control ($p = 0.01$). The exosomal nature of the examined vesicles has been confirmed by qualitative examinations using western blot (WB) and the immunogold methods for transmission electron microscopy. This study documented the acceleration of the phenomenon of exocytosis in CRC for the first time (Zadka Ł et al., Comparative analysis of exosome markers and extracellular vesicles between colorectal cancer and cancer-associated normal colonic mucosa; **Polish Archives of Internal Medicine**, 2020).

Streszczenie

In the next publication from the cycle, the isolation of EVs from archived CRC frozen tissue (n = 11) was performed with diverse clinical and pathological data, such as: histopathological diagnosis, tumor grade G, proliferative activity, and from plasma obtained in the centrifugation procedure of fresh venous blood collected from patients diagnosed with CRC (n = 2) and ulcerative colitis (n = 2) as *de novo* lesions detected during colonoscopy of lower gastrointestinal tract. Extracellular vesicles were isolated using classical and differential ultracentrifugation on a sucrose cushion as well as using commercially available reagents for exosome precipitation. EVs precipitation was also performed on selected cell lines representing CRC cells of different biological malignancy (HT-29, CaCo-2, LoVo) and on control lines of intestinal epithelium (CCD-18Co) and myeloid cells (HMEC-1). Two independent methods were used to assess the heterogeneity of EVs: digital holotomography (DHT) and elemental microanalysis EDS. The evaluation of the distribution of elements by the EDS method was carried out on lyophilized EVs pellets obtained with the use of commercially available reagents. The DHT method showed changes in the refractive index (RI) of the examined EVs depending on the method of isolation, diagnosis, G stage and the proliferative activity of the examined tumors. In EVs isolates obtained from frozen archived tissues, increasing RI values were observed along with the G stage and the proliferative activity of the studied neoplasms. In the *in vitro* model, higher RI values were noted for the CRC line as well as for the EVs released by cancer cells. The DHT method also showed changes in EVs morphometry, revealing a trend to the presence of larger vesicles in ulcerative colitis (UC) than in CRC. Moreover, the EDS method revealed the existence of significant differences in the elemental composition between vesicles isolated from patients diagnosed with CRC and UC. The exosomal nature of the examined samples was verified using a scanning electron microscope (SEM), WB method and using an immunofluorescence method in relation to cell lines, as well as using multiple immunohistochemical reactions with different colored markers, carried out on FFPE blocks corresponding to frozen tissues from which EVs were precipitated (Zadka Ł et al., Label-Free Quantitative Phase Imaging Reveals Spatial Heterogeneity of Extracellular Vesicles in Select Colon Disorders; **American Journal of Pathology**, 2021).

The DHT and EDS methods described above were used for the first time to assess the heterogeneity of EVs, and the relationship between EVs and pathological data requires further research aimed at the qualitative assessment of the composition of EVs.

Streszczenie