

Streszczenie

Rak gruczołu piersiowego (BC) jest najczęstszym nowotworem u kobiet. Od lat zajmuje wysokie miejsce wśród najczęstszych przyczyn zgonu pacjentek z rozpoznaniem nowotworem złośliwym. Zachorowania na raka gruczołu piersiowego w populacji stanowią duży problem diagnostyczny. Poważnym wyzwaniem pozostaje także leczenie chorych z tym rozpoznaniem, w szczególności w przypadku zaawansowanych stanów choroby. W dalszym ciągu istnieje potrzeba poszukiwania nowych markerów prognostycznych i predykcyjnych raka gruczołu piersiowego. Badania z ostatnich lat przeprowadzone na raku gruczołu piersiowego i innych typach nowotworów wskazują, że jednym z takich potencjalnych markerów może być iryzyna.

Iryzyna została wykryta po raz pierwszy w 2012 roku. Udowodniono, że odgrywa kluczową rolę w procesie przemiany białej tkanki tłuszczowej w brązową. Dotychczasowe badania potwierdziły obecność iryzyny w wielu tkankach i narządach. Podwyższenie jej ekspresji, poza stanami fizjologicznymi, obserwowano również w różnego typu nowotworach m.in. raku płuca, raku przewodu pokarmowego, raku jajnika, raku jasnokomórkowym nerki, raku krtani, kostniakomięsakach. Badania na modelu *in vitro* wskazują, że zwiększony poziom iryzyny może prowadzić do zahamowania proliferacji, migracji i przejścia epitelialno-mezenchymalnego (EMT) przez szlak PI3K/AKT w komórkach raka płuc. Natomiast w raku wątroby zaobserwowano stymulowanie proliferacji i inwazji komórek przez ten sam szlak. W kostniakomięsaku zauważono, że iryzyna hamuje proliferację, migrację i inwazję poprzez odwrócenie działania IL-6 na EMT przez drogę sygnałową STAT3–SNAIL. Dane dostępne w literaturze na temat zależności pomiędzy iryzyną a EMT pozostają niejasne, a niekiedy wręcz sprzeczne. Dodatkowo, dostępne są nieliczne publikacje podejmujące tematykę znaczenia iryzyny w rakach BC. Dlatego przedmiotem mojej pracy doktorskiej zostały badania mające na celu określenie zależności pomiędzy poziomem ekspresji iryzyny a rakami BC.

W pierwszej pracy z cyklu (Cebulski, K.; Nowińska, K.; Jabłońska, K.; Romanowicz, H.; Smolarz, B.; Dzięgiel, P.; Podhorska-Okołów, M. Expression of Irisin/FNDC5 in Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 3530. <https://doi.org/10.3390/ijms23073530>) przeprowadzono badania z wykorzystaniem 541 bloczków parafinowych z fragmentami guzów raka BC, oraz 61 mastopatii jako materiału kontrolnego. Za pomocą reakcji immunohistochemicznych (IHC) oceniono poziom ekspresji iryzyny, PGC1 α i Ki-67. Na materiale mrożonym pod postacią 40 bloczków raka BC, 40 marginesów guza i 16 mastopatii

przeprowadzono badania metodą RT-PCR celem oceny poziomu ekspresji *mRNA* genu *FNDC5* kodującego FNDC5 – prekursor iryzyny. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej.

Ekspresja iryzyny została zaobserwowana w cytoplazmie komórek raka BC, a także w komórkach mastopatii. Natomiast poziom ekspresji tego białka w BC był istotnie wyższy niż w mastopatiach. W publikacji skorelowano również poziom ekspresji iryzyny z danymi kliniczno-patologicznymi. Poziom ekspresji iryzyny był niższy u pacjentek z przerzutami do węzłów chłonnych w porównaniu do pacjentek bez przerzutów. Pomimo widocznego spadku ekspresji iryzyny wraz ze wzrostem wielkości guza (T) różnica ta nie była istotna statystycznie. Natomiast istotną statystycznie zależność zaobserwowano pomiędzy ekspresją iryzyny w guzach o rozmiarze do 10mm (T1a-b) w porównaniu do guzów o wymiarze od ponad 10mm do 20mm (T1c). Poziom iryzyny spadał w kolejnych stadiach zaawansowania klinicznego nowotworu. Różnica była istotna statystycznie pomiędzy stadium I i II. Na podstawie uzyskanych rezultatów wykazano również zależność pomiędzy poziomem ekspresji iryzyny, a całkowitym czasem przeżycia (OS) badanych pacjentek. Pacjentki z wyższym poziomem ekspresji iryzyny charakteryzowały się istotnie dłuższym czasem przeżycia. Ze względu na wpływ czynnika transkrypcyjnego PGC1 α na ekspresję genu *FNDC5*, została przeanalizowana jego korelacja z poziomem iryzyny w komórkach guza. Zaobserwowano dodatnią średnią korelację pomiędzy poziomem ekspresji tych dwóch białek w rakach BC. Ponadto w celu zbadania związku ekspresji iryzyny z nasileniem proliferacji komórek raka BC oceniono jej korelację z ekspresją antygenu Ki-67. Oba białka korelowały ze sobą słabo dodatnio.

W drugiej pracy z cyklu (Cebulski, K.; Piotrowska, A.; Kmiecik, A.; Haczekiewicz-Leśniak, K.; Ciesielska, U.; Grzegorzówka, J.; Jabłońska, K.; Romanowicz, H.; Smolarz, B.; Dzięgiel, P.; Podhorska-Okołów, M.; Nowińska, K. The Role of Irisin/FNDC5 Expression and Its Serum Level in Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 8628. <https://doi.org/10.3390/ijms24108628>) również wykorzystano materiał 541 bloczków parafinowych z fragmentami guzów raka BC. Z wykorzystaniem reakcji immunohistochemicznych (IHC) oceniono poziom ekspresji markerów EMT (E-kadheryna i N-kadheryna, SNAIL, SLUG, TWIST). Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej.

Przedstawione w poprzedniej pracy wyniki ekspresji iryzyny na materiale raka gruczołu piersiowego porównano z wynikami oceny poziomu ekspresji E-kadheryny i N-kadheryny, SNAIL, SLUG i TWIST. Ekspresje E-kadheryny, cytoplazmatycznej i jądrowej SNAIL, wykazywały dodatnią średnią korelację z poziomem ekspresji iryzyny. Poziom ekspresji N-kadheryny nie miał związku z ekspresją iryzyny. Natomiast, w przypadku czynnika

transkrypcyjnego SLUG, zarówno dla ekspresji cytoplazmatycznej, jak i jądrowej zaobserwowano dodatnią słabą korelację poziomem ekspresji iryzyny. Podobnie jak przy wcześniej wymienionych czynnikach transkrypcyjnych, dla TWIST zaobserwowano dodatnią korelację zarówno dla ekspresji cytoplazmatycznej, jak i jądrowej.

W celu potwierdzenia wyników badań immunohistochemicznych ekspresji iryzyny, przeprowadzono dodatkowo badania molekularne na modelu *in vitro*. Poziom iryzyny zbadano przy użyciu reakcji immunofluorescencyjnej (IF) w linii kontrolnej Me16c, oraz linii raków gruczołu piersiowego MCF-7, MDA-MB-231 i MDA-MB-468. Wykorzystując technikę RT-PCR oceniono również poziom ekspresji *mRNA* genu *FNDC5* kodującego FNDC5 – prekursor iryzyny.

Poziom ekspresji *mRNA FNDC5* w prawidłowych komórkach gruczołu piersiowego (Me16c) był istotnie niższy w porównaniu z poziomem obserwowanym w komórkach wszystkich badanych linii raka gruczołu piersiowego. Dodatkowo, poziom ekspresji znacząco różnił się pomiędzy liniami komórkowymi raka gruczołu piersiowego. Najwyższy poziom ekspresji genu *FNDC5* zaobserwowano w komórkach MDA-MB-468. Różnica pomiędzy poziomami *mRNA FNDC5* w pozostałych liniach MCF-7 i MDA-MB-231 była istotna. Tak jak w przypadku badań RT-PCR, w badaniach z wykorzystaniem technik immunofluorescencji (IF) wykazano, że poziom ekspresji iryzyny w prawidłowych komórkach gruczołu piersiowego (Me16c) był istotnie niższy w porównaniu z poziomem obserwowanym w komórkach wszystkich badanych linii raka gruczołu piersiowego. Różnice pomiędzy poziomami ekspresji iryzyny w liniach raka gruczołu piersiowego MDA-MB-231 a MCF-7, oraz MDA-MB-468 były istotne statystycznie.

Podsumowując, przedstawione w obu pracach badania są pierwszymi oceniającymi poziom ekspresji iryzyny na tak dużym materiale raka gruczołu piersiowego. Badania na materiale raka gruczołu piersiowego jak i na liniach komórkowych potwierdzają, że poziom ekspresji iryzyny jest istotnie wyższy w komórkach nowotworowych. Uzyskane dane sugerują również, że iryzyna może być markerem prognostycznym raka gruczołu piersiowego. Ponadto badania potwierdzają, że iryzyna może mieć wpływ na proces przejścia epitelialno-mezenchymalnego. Wskazują jednak na bardzo złożone zależności w tym zakresie, które wymagają dalszych badań.

Summary

Breast cancer (BC) is the most prevalent cancer in women. For many years, it has been ranked high among the most common causes of death in patients with malignant tumors. The incidence of BC in the population poses a major diagnostic problem. The treatment of BC patients also remains a major challenge, particularly in advanced disease stages. There is still a need to search for new prognostic and predictive markers for BC. Recent studies on BC and other types of cancer indicate that irisin (Ir) may be one of such potential markers.

Ir was first detected in 2012. It plays a key role in the conversion of white adipose tissue to brown adipose tissue. Previous studies have confirmed the presence of Ir in many tissues and organs. Apart from physiological conditions, the increase in its expression has also been observed in various types of cancer, including lung, gastrointestinal and ovarian cancer, as well as in clear cell renal cell carcinoma, laryngeal cancer and osteosarcoma. *In vitro* studies indicate that increased Ir levels can lead to the inhibition of proliferation, migration and epithelial-mesenchymal transition (EMT) through the PI3K/AKT pathway in lung cancer cells. In turn, stimulation of proliferation and invasion of cells by the same pathway was observed in liver cancer. In osteosarcoma, Ir was found to inhibit proliferation, migration and invasion by reversing the IL-6-induced EMT through the STAT3-SNAIL signaling pathway. The literature data on the relationship between Ir and EMT remain unclear and even contradictory. In addition, there are only several papers addressing the importance of Ir in BC. Therefore, the subject of this dissertation was related to studies aimed at determining the relationship between Ir expression and BC.

In the first paper of the series (Cebulski, K.; Nowińska, K.; Jabłońska, K.; Romanowicz, H.; Smolarz, B.; Dzięgiel, P.; Podhorska-Okołów, M. Expression of Irisin/FNDC5 in Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 3530. <https://doi.org/10.3390/ijms23073530>), investigations were conducted on 541 paraffin blocks containing sections of BC tissue, along with 61 mastopathy samples serving as controls. The expression levels of PGC1 α and Ki-67 were assessed using immunohistochemical (IHC) reactions. Additionally, the *mRNA* expression level of the *FNDC5* gene, encoding FNDC5, the precursor of Ir, was evaluated using the RT-PCR technique on frozen samples from 40 BC and 40 control tissues taken from tumor margins, as well as 16 mastopathy samples. The obtained results were subjected to statistical analysis.

Ir expression was found in the cytoplasm of BC cells and mastopathy cells. However, the expression level of this protein in BC was significantly higher than in mastopathy samples. Additionally, the expression level of Ir was correlated with the clinicopathological data. The expression level of Ir was lower in patients with lymph node metastases compared to those without metastases. Despite the apparent decrease in Ir expression with increasing tumor size (T), the difference was not statistically significant. In turn, a statistically significant relationship was observed in Ir expression between tumor sizes up to 10mm (T1a-b) and those larger than 10mm but not exceeding 20mm (T1c). Irisin levels decreased in more advanced stages of tumor progression. The difference between stage I and II was statistically significant. Based on the results, the relationship was found between the expression level of Ir and overall survival (OS). Patients with higher Ir expression levels had significantly longer survival. Due to the influence of the transcription factor PGC1 α on the expression of the *FNDC5* gene, its correlation with the level of Ir in tumor cells was analyzed. The moderate positive correlation was observed between the expression levels of these two proteins in BC. In addition, to examine the association of Ir expression with increased proliferation of BC cells, its correlation with the expression of Ki-67 antigen was evaluated. Both proteins were weakly positively correlated.

In the second paper of the series (Cebulski, K.; Piotrowska, A.; Kmiecik, A.; Haczekiewicz-Leśniak, K.; Ciesielska, U.; Grzegorzówka, J.; Jabłońska, K.; Romanowicz, H.; Smolarz, B.; Dzięgiel, P.; Podhorska-Okołów, M.; Nowińska, K. The Role of Irisin/FNDC5 Expression and Its Serum Level in Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 8628. <https://doi.org/10.3390/ijms24108628>), investigations were also conducted on 541 paraffin blocks containing sections of BC tissue. Expression levels of EMT markers (E-cadherin, N-cadherin, SNAIL, SLUG, TWIST) were assessed using immunohistochemical (IHC) reactions. The results of the conducted research were subjected to statistical analysis.

The previously obtained results of Ir expression from BC samples were compared with the results of expression levels of the E-cadherin, N-cadherin, SNAIL, SLUG and TWIST. The expression levels of E-cadherin and both cytoplasmic and nuclear SNAIL showed a moderate positive correlation with the expression level of Ir. The expression level of N-cadherin was not related to Ir expression. In turn, in the case of transcription factor SLUG, a positive weak correlation was found with Ir expression levels for both cytoplasmic and nuclear expression). Similar to the previously mentioned transcription factors, positive correlations were observed for TWIST for cytoplasmic and nuclear expression.

To confirm the immunohistochemical results, molecular studies were additionally performed on an *in vitro* model. The level of Ir was examined using immunofluorescence (IF) in the control line (Me16c) and BC lines (MCF-7, MDA-MB-231 and MDA-MB-468). Using the RT-PCR technique, the *mRNA* expression level of the *FNDC5* gene encoding FNDC5, which is the precursor of Ir, was also assessed.

The expression level of *FNDC5 mRNA* in normal breast cell line (Me16c) was significantly lower compared to the level in the cells of all BC lines. In addition, the expression level differed significantly between BC cell lines. The highest level of *FNDC5* gene expression was observed in MDA-MB-468 cells. The difference between *FNDC5 mRNA* levels in MCF-7 and MDA-MB-231 lines was significant. Similar to RT-PCR studies, immunofluorescence (IF) studies showed that Ir expression levels in normal breast cell line (Me16c) were significantly lower compared to those observed in the cells of all BC lines. Differences between Ir expression levels in MDA-MB-231 and MCF-7 as well as MDA-MB-468 BC cell lines were statistically significant.

In summary, the studies presented in both papers are the first to assess the level of irisin expression on such a large BC sample. Studies on BC samples and BC cell lines confirm that the level of irisin expression is significantly higher in BC cells. The obtained data also suggest that irisin may serve as a prognostic marker for BC. Additionally, the studies confirm that irisin may influence the process of EMT in BC. However, they indicate complex relationships in this regard, which require further research.