

## Streszczenie

Po upływie dekady od odkrycia i opisania iryzyny (Ir), nasza wiedza o jej roli w procesie kancerogenezy pozostaje nadal niepełna. W chwili obecnej prowadzonych jest wiele badań, mających na celu określenie wpływu Ir na proliferację, migrację i przejście epitelialno- mezenchymalne komórek raka, leżące u podstawy przerzutowania nowotworów. W literaturze dostępne są wyniki badań immunohistochemicznych, molekularnych i w modelu *in vitro* dotyczących roli Ir w najczęściej występujących w populacjach nowotworów (rak płuca, rak gruczołu piersiowego i wielu innych).

Przegląd piśmiennictwa dotyczący budowy Ir, funkcji jaką pełni w procesach metabolicznych, a zwłaszcza rolę jej ekspresji w procesach nowotworzenia został przedstawiony w pracy poglądowej opublikowanej w czasopiśmie *Cells* (Pinkowska i wsp. *The Role of Irisin in Cancer Disease. Cells* 2021, 10, 1479).

Ir jest adipomiocytokiną, zaangażowaną w regulację procesów metabolicznych. Wpływa także na procesy związane ze stanem zapalnym, obserwowanym w wielu chorobach przewlekłych, w tym nowotworowych. Obecność Ir wykazano w komórkach nowotworowych oraz surowicy krwi pacjentów, w różnych typach nowotworów. Wyniki wielu badań wskazują na związki Ir z kancerogenezą nowotworów (m.in.: raka gruczołu piersiowego, narządu rodowego, kości, płuc, gruczołu krokowego czy nowotworów przewodu pokarmowego). Ponadto, dowiedziono, że Ir hamuje proliferację, migrację i inwazję komórek raka gruczołu piersiowego, płuc, kości, gruczołu krokowego w warunkach *in vitro*. Jest także zaangażowana w hamowanie przejścia epitelialno- mezenchymalnego (EMT), które jest związane z powstawaniem przerzutów nowotworowych.

W dostępnej literaturze pojawiło się, jak dotąd, niewiele badań wykazujących związek ekspresji Ir z parametrami kliniczno- patologicznymi w nowotworach człowieka. Ponadto, brakowało danych z badań prowadzonych na materiale raka płaskonabłonkowego krtani. Dlatego przedmiotem mojej pracy doktorskiej była próba określenia roli Ir w procesach kancerogenezy raka płaskonabłonkowego krtani.

Do badań opublikowanych w pracy oryginalnej (Pinkowska i wsp. *Irisin Association with Ki-67, MCM3 and MT-I/II in Squamous Cell Carcinomas of the Larynx. Biomolecules* 2022, 12, 52) zebrano materiał od pacjentów, diagnozowanych i leczonych na oddziale laryngologii

Oddziału Patomorfologii Wojewódzkiego Szpitala im. J. Babińskiego we Wrocławiu i Katedry i Kliniki Otolaryngologii, Chirurgii Głowy i Szyi, Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu w latach 1997- 2003. Materiał do badań obejmował:

- 1) 140 przypadków guzów raka płaskonabłonkowego krtani
- 2) 57 przypadków brodawczaków krtani
- 3) 14 przypadków łagodnych zmian przerostowych (guzy śpiewacze i obrzęki Reinkego)- materiał kontrolny.

Wycinki pobrane od pacjentów zostały utrwalone w postaci bloczków parafinowych. Na podstawie klasyfikacji TNM zatwierdzonej przez Międzynarodową Unię do Walki z Rakiem (ang. UICC- The International Union Against Cancer) został określony stopień złośliwości (G) oraz stadium zaawansowania klinicznego LSCC.

Z bloczków parafinowych wykonano mikromacierze tkankowe (ang. TMA - Tissue microarrays). W celu oceny poziomu ekspresji badanych białek w komórkach raka krtani i zmian łagodnych przeprowadzono na skrawkach parafinowych reakcje immunohistochemiczne (IHC) z wykorzystaniem poliklonalnych przeciwciał króliczych skierowanych przeciwko Ir i mysich monoklonalnych skierowanych przeciwko markerom proliferacji: Ki-67, MT-I/II, MCM2, 3, 5 i 7.

Na wykonanych preparatach obserwowano obecność pozytywnej reakcji IHC przy użyciu mikroskopu świetlnego BX41 (Olympus, Tokyo, Japan). Obecność Ir i MT-I/II zaobserwowano w cytoplazmie. Poziom białek został oceniony przy użyciu metody półilościowej IRS wg. Remele i Stegner. Natomiast ekspresję markerów proliferacji Ki-67, MCM2, 3, 5 i 7 obserwowano w jądrze komórkowym. Do oceny ww. markerów proliferacji użyto skali procentowej. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej i korelacji z danymi kliniczno- patologicznymi.

W celu potwierdzenia wyników badań IHC przeprowadzono badania molekularne w modelu in vitro. Badania ekspresji Ir wykonano przy użyciu:

- 1) komercyjnej linii komórek raka płaskonabłonkowego krtani 2 (HEp-2),
- 2) linii komórkowej ludzkich keratynocytów (HaCaT) - materiał kontrolny.

W celu określenia poziomu ekspresji Ir w wyżej wymienionych komórkach wykorzystano metodę Western blot oraz reakcje immunofluorescencyjne (IF) z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego

Ocena reakcji IHC wykazała ekspresję Ir w obrębie łagodnych zmian przerostowych nabłonka krtani, brodawczaków, a także w cytoplazmie komórek raka płaskonabłonkowego krtani. Poziom ekspresji Ir był wyższy u pacjentów z LSCC w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p=0.001$ ). Ponadto, zaobserwowano także wyższą ekspresję Ir w LSCC niż w brodawczakach ( $p<0.0001$ ). Otrzymane wyniki badań skorelowano z danymi kliniczno-patologicznymi. Średni poziom ekspresji Ir był wyższy w stadium I zaawansowania niż w stadium II guza i ponownie rósł w stadiach III-IV. Jednakże, istotna statystycznie różnica była obserwowana tylko między stadium II, a III-IV ( $p=0.0083$ ). Zaobserwowano również podwyższony poziom ekspresji Ir wraz ze wzrostem wielkości guza (T), a różnica między T1-2 i T3-4 była istotnie statystyczna ( $p=0.0348$ ). Poziom ekspresji Ir w LSCC nieznacznie rósł wraz ze wzrostem złośliwości nowotworu (G). Jednakże, obserwowane różnice nie wykazywały istotności statystycznej. Zauważono także związek między poziomem ekspresji Ir, a przerzutami do węzłów chłonnych. Najwyższą średnią wartość ekspresji Ir zaobserwowano w grupie pacjentów bez przerzutów do węzłów chłonnych (N0). W przypadkach z przerzutami do węzłów chłonnych wnątkowych i śródpiętnych (N1) była ona najniższa i ponownie rosła w przypadkach z przerzutami do węzłów śródpiętnych (N2-3). Istotnie statystycznie były różnice między poziomami Ir w N0 i N1 ( $p=0.0031$ ), a także pomiędzy N0 i N2-3 ( $p=0.0457$ ). Nie zaobserwowano związku między długością przeżycia całkowitego (OS), a poziomem Ir u pacjentów z LSCC. W jądrach komórek LSCC wykazano także ekspresję markerów proliferacji Ki-67, MCM2, 3, 5 i 7, a ekspresję MT-I/II w cytoplazmie komórek LSCC. Średnią dodatnią korelację zaobserwowano pomiędzy poziomem ekspresji Ir, a antygenu Ki-67 ( $r=0.36$ ;  $p<0.0001$ ). Ponadto, słabą dodatnią korelację wykazano między poziomami ekspresji Ir i MCM3 ( $r=0.25$ ;  $p=0.0033$ ). Średnią dodatnią korelację zaobserwowano również między poziomem ekspresji Ir, a MT-I/II ( $r=0.35$ ;  $p<0.0001$ ) w LSCC. Natomiast, prezentowane w pracy badania przeprowadzone w modelu in vitro, za pomocą metody Western blot i reakcji immunofluorescencyjnej, wykazały obecność ekspresji Ir w obu

liniach komórkowych. Wyższy poziom ekspresji Ir odnotowano w komórkach raka krtani HEp-2 niż w kontrolnych komórkach HaCat. Różnica nie była istotna statystycznie.

Przedstawione wyniki badań są pierwszymi badaniami wykazującymi obecność Ir w LSCC. Pokazują wyższą ekspresję Ir u pacjentów z LSCC w porównaniu do grupy kontrolnej (bez zmian nowotworowych). Wykazują także jej związek ze wzrostem guza i proliferacją komórek raka. Ponadto, niezwykle interesujący jest obserwowany wyższy poziom Ir w grupie pacjentów N0 niż w grupie N1. Może to wskazywać na potencjalną rolę Ir w procesie przerzutowania komórek nowotworowych. Porównanie ekspresji Ir z czynnikami kliniczno-patologicznymi oraz uznanymi markerami proliferacji wskazuje, na możliwą rolę Ir zarówno w procesie transformacji nowotworowej, jak również progresji choroby LSCC.

## **Abstract**

One decade after the discovery and description of irisin (Ir), the knowledge of its role in carcinogenesis has still been incomplete. Currently, many studies are conducted to determine the effects of Ir on proliferation, migration and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of cancer cells underlying metastasis. Immunohistochemical, molecular and *in vitro* model study results connected with the role of Ir in the most prevalent cancers (i.e. lung, breast and many other cancers) are available in the literature.

A review of the literature on the structure of Ir, the function it plays in metabolic processes, and particularly the role of its expression in carcinogenesis was presented in a review paper published in *Cells* (Pinkowska et al., The Role of Irisin in Cancer Disease. *Cells* 2021, 10, 1479).

Irisin is an adipomyokine involved in the regulation of metabolic processes. It also influences processes related to inflammation in many chronic diseases, including cancer. The presence of Ir has been demonstrated in cancer cells and the blood serum of patients in various types of cancer. The results of many studies indicate that Ir is associated with the carcinogenesis of cancers (including breast, reproductive organ, bone, lung, prostate or gastrointestinal cancers). In addition, Ir has been proven to inhibit proliferation, migration and invasion of breast, lung, bone and prostate cancer cells under *in vitro* conditions. It is also involved in the inhibition of epithelial-mesenchymal transition (EMT), which is associated with metastasis.

In the available literature, there have been only some studies demonstrating the association of Ir expression with clinical and pathological parameters in human cancers. In addition, there was no data from studies on laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC). Therefore, the subject of the dissertation was an attempt to determine the role of Ir in the processes of carcinogenesis of LSCC.

For the original paper, the material was collected from patients diagnosed and treated at the Department of Pathomorphology of the J. Babinski Regional Hospital of Wroclaw and the Department and Clinic of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Wroclaw Medical University between 1997 and 2003 (Pinkowska et al., Irisin Association with Ki-67, MCM3 and MT-I/II in Squamous Cell Carcinomas of the Larynx. *Biomolecules* 2022, 12, 52).

The study material included:

- 1) 140 cases of LSCC

2) 57 cases of laryngeal papillomas

3) 14 cases of benign hypertrophic changes (vocal cord nodules and Reinke's edema) - control material.

The specimens obtained from patients were fixed in paraffin blocks. Based on the TNM classification approved by the International Union Against Cancer (UICC), the grade (G) and the clinical stage of LSCC were determined.

Tissue microarrays (TMAs) were performed from paraffin blocks. To assess the expression levels of the proteins in laryngeal cancer cells and benign changes, immunohistochemical (IHC) reactions were performed on paraffin sections using polyclonal anti-irisin rabbit antibodies and mouse monoclonal antibodies against proliferation markers, such as Ki-67, MT-I/II, MCM2, 3, 5 and 7.

A positive IHC reaction of Ir was observed using the BX41 light microscope (Olympus, Tokyo, Japan). The presence of Ir and MT-I/II was observed in the cytoplasm. Protein levels were assessed using the semi-quantitative IRS method according to Remele and Stegner. In turn, the expression of proliferation markers, such as Ki-67, MCM2, 3, 5 and 7, was observed in the cell nucleus. A percentage scale was used to evaluate the above proliferation markers. The obtained results underwent statistical analysis and correlation with clinicopathological data.

To confirm the IHC results, molecular studies were performed in an *in vitro* model. Ir expression studies were performed using:

- 1) a commercial laryngeal cancer cell line Hep-2
- 2) human keratinocyte cell line (HaCaT) - control.

Western blot and immunofluorescence (IF) reactions using confocal microscopy were used to determine the level of Ir expression in the above-mentioned cells.

Evaluation of IHC reactions showed Ir expression in benign hypertrophic changes of laryngeal epithelium, papillomas, as well as in the cytoplasm of LSCC cells. The level of Ir expression was higher in LSCC patients compared to controls ( $p=0.001$ ). In addition, higher Ir expression was also observed in LSCC than in papillomas ( $p<0.0001$ ). The obtained findings were correlated with clinicopathological data. The mean level of Ir expression was higher in stage I than in stage II tumors and increased in stages III-IV. However, a statistically significant difference was observed only between stage II and III-IV ( $p=0.0083$ ). Elevated Ir expression

levels were also found with increasing tumor size (T), and the difference between T1-2 and T3-4 was statistically significant ( $p=0.0348$ ). The level of Ir expression in LSCC slightly increased with increasing tumor malignancy (G). However, the differences did not show statistical significance. An association was also found between the level of Ir expression and lymph node metastasis. The highest mean value of Ir expression was noted in the group of patients without lymph node metastasis (N0). It was lowest in cases with hilar and mediastinal lymph node metastasis (N1) and increased again in cases with mediastinal node metastasis (N2-3). There were statistically significant differences between Ir levels in N0 and N1 ( $p=0.0031$ ), as well as between N0 and N2-3 ( $p=0.0457$ ). No association was observed between overall survival (OS) and Ir levels in LSCC patients. The nuclei of LSCC cells also showed expression of the proliferation markers, such as Ki-67, MCM2, 3, 5 and 7, and expression of MT-I/II in the cytoplasm of LSCC cells. The mean positive correlation was observed between the expression level of Ir and Ki-67 antigen ( $r=0.36$ ;  $p<0.0001$ ). In addition, a weak positive correlation was shown between Ir and MCM3 expression levels ( $r=0.25$ ;  $p=0.0033$ ). A moderate positive correlation was also found between Ir expression levels and MT-I/II ( $r = 0.35$ ;  $p<0.0001$ ) in LSCC. In turn, the study conducted in an *in vitro* model using Western blot and immunofluorescence reaction showed the presence of Ir expression in both cell lines. Higher levels of Ir expression were noted in HEP-2 laryngeal cancer cells than in control HaCaT cells. The difference was not statistically significant.

The presented results are the first studies showing the presence of Ir in LSCC. They demonstrate higher Ir expression in LSCC patients compared to controls (without cancer). They also show its association with tumor growth and cancer cell proliferation. In addition, compared to the N1 group, a higher level of Ir in the N0 patient group is extremely interesting. This may indicate a potential role for Ir in the process of cancer cell metastasis. The comparison of Ir expression with clinicopathological factors and proliferation markers indicates a possible role of Ir in the process of tumor transformation and progression of LSCC.