

Wprowadzenie:

W Polsce w roku 2012 zostało zdiagnozowanych blisko 17 tysięcy nowych przypadków raka piersi, z czego 1600 w samej Wielkopolsce. Dzięki wczesnemu wykryciu i dobrze dobranemu schematowi leczenia obserwuje się pięcioletnie przeżycie na wysokim, 90% poziomie. Złożona biologia nowotworów złośliwych wymusza zróżnicowane podejście terapeutyczne. Jedną z metod leczenia jest radioterapia, polegająca na napromienianiu guza lub okolicy miejsca pooperacyjnego przy pomocy wiązki o wysokiej energii. Pomimo zastosowanej terapii zdarzają się chore, u których nie dochodzi do odpowiedzi na leczenie lub obserwowane jest rozprzestrzenianie się choroby. Jedną z przyczyn progresji nowotworu jest występowanie różnych populacji komórek wśród komórek guza. Część z nich jest podatna na leczenie, a inne w wyniku dynamicznych wewnętrznych zmian genetycznych, wykształciły mechanizmy oporności przeciwko zastosowanej terapii. Niestety, taka oporność może być przekazywana z komórek niewrażliwych na komórki wrażliwe, m.in. przy pomocy egzosomów. Te struktury są kluczowym elementem w komunikacji między poszczególnymi komórkami i spełniają wiele ważnych funkcji w zdrowym organizmie, takich jak wyciszanie reakcji autoimmunologicznych (odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko zdrowym tkankom), pozbywanie się toksycznych substancji ze środowiska wewnątrzkomórkowego, tolerancja immunologiczna matka-płód. W przypadku choroby nowotworowej, komórki rakowe produkują znacznie więcej egzosomów, wyposażając je w wiele specjalistycznych białek. Umożliwiają one przetrwanie ataku komórek układu immunologicznego, zniwelowanie działania terapii przeciwnowotworowych, czy też pozwalają na zmiany środowiska tkanki, w której doszło do rozwoju nowotworu. Wydzielanie egzosomów oraz związane z nimi różne funkcje są modyfikowane w zależności od czynnika, jakim komórki zostaną potraktowane. Badania nad wpływem radioterapii na biologię nowotworów mózgu (glioblastoma) wykazały uczestnictwo egzosomów w modyfikacji komórek nowotworowych poprzez zwiększenie ich zdolności do migracji. Co więcej, zaobserwowano zwiększony pobór egzosomów indukowanych promieniowaniem jonizującym przez komórki nowotworowe w porównaniu do pęcherzyków uzyskanych z komórek nienapromieniowanych, co może świadczyć o lokalnej modyfikacji mikrośrodowiska guza. Jednakże wpływ egzosomów indukowanych promieniowaniem jonizującym na modyfikacje komórek i tworzenia agresywniejszej formy raka piersi nie został do końca poznany.

Cel projektu:

Głównym celem naukowym projektu jest określenie wpływu egzosomów indukowanych promieniowaniem jonizującym na ukształtowanie bardziej inwazyjnego i agresywnego fenotypu komórek nowotworowych w różnych typach biologicznych raka piersi.

Materialy i metody:

Izolacja egzosomów z pożywki hodowlanej odbędzie się przy pomocy serii ultrawirów. Poziom białek egzosomalnych zostanie zmierzony z wykorzystaniem reakcji kolorymetrycznej BCA. W celu potwierdzenia wyizolowania frakcji egzosomów zostanie wykonana skaningowa mikroskopia elektronowa. Aby określić jakość wyizolowanych pęcherzyków zostanie wykonana analiza kolorymetryczna badająca aktywność rozkładu acetylocholinoesterazy. Ustalone linie raka piersi będą inkubowane z egzosomami indukowanymi promieniowaniem jonizującym w celu określenia ich roli modyfikacji fenotypu komórek. Dla zaobserwowania zmian wywołanych przez pęcherzyki zostaną przeprowadzone następujące testy: test klonogeny, pozwalający ocenić radiooporność; inwazyjności komórek (test zrastania się rany, tzw. „*Wound healing assay*”); inwazję komórek w macierzy zewnątrzkomórkowej oraz test zymografii żelatynowej; ekspresja genów zaangażowanych w migrację, stres komórkowy, apoptozę, angiogenezę, transycje epithelialno-mezenchymalną. Ponadto, zostanie zbadana rola egzosomów w tworzeniu naczyń krwionośnych przy pomocy testu formowania tub przez komórki endotelialne żyły pępowinowej. Dodatkowo zostanie oceniony wpływ egzosomów na proliferację i apoptozę przy użyciu gotowych testów do cytometrii przepływowej.