

Streszczenie

Ocena fenotypowej i funkcjonalnej stabilności linii komórkowej RAW 264.7 i wpływ makrofagów oraz analogów migrastatyny na szlak Wnt w komórkach nowotworowych.

Rak jest jedną z najczęstszych przyczyn zgonów na całym świecie. Badania wykonane na przestrzeni ostatnich lat wykazały, że istotnym elementem zrozumienia fizjologii nowotworów jest poznanie interakcji występujących pomiędzy komórkami odpornościowymi, a komórkami nowotworowymi. Jedne z najbardziej oddziałujących komórek odpornościowych na rozwój guza nowotworowego to makrofagi. Udowodniono, że makrofagi mogą wpływać na komórki nowotworowe poprzez aktywację w nich niekanonicznego szlaku Wnt oraz zwiększenie właściwości migracyjnych tych komórek.

W niniejszej pracy wykorzystano unieśmiertelnioną linię komórkową monocytów/makrofagów RAW 264.7 oraz badano jej wpływ na zmiany szlaku Wnt w komórkach nowotworowych. W związku z dużą plastycznością makrofagów oraz możliwością zmiany fenotypu linii komórkowej, w pierwszej kolejności zbadano stabilność fenotypową i funkcjonalną komórek z linii RAW 264.7. Komórki hodowano od pasaży 3 do pasaży 50, a co 5 pasaży testowano ich funkcje. Badano ekspresję genów kodujących markery makrofagów, ekspresję markerów powierzchniowych, zdolność do fagocytozy oraz do produkcji tlenu azotu. Na podstawie ekspresji genów określono ich trzy zbiory, pierwszy w którym ekspresja rośnie wraz z wiekiem komórek, drugi w którym jest stabilna oraz trzeci w którym jest zmienna. Większość badanych genów zachowywała jednolity poziom ekspresji od pasaży 10 do pasaży 30. Poziom ekspresji markerów powierzchniowych na poziomie białkowym był stabilny w całym zakresie badanych pasaży komórek poza małym spadkiem ekspresji CD11c w pasażu 30. Zdolność do fagocytozy oraz produkcji tlenu azotu była również stabilna w zakresie od pasaży 10 do pasaży 30.

W niniejszej pracy przedstawiono również wpływ makrofagów pochodzących z linii RAW 264.7 na zmiany w szlaku Wnt w mysich komórkach raka sutka. Białka wydzielane przez makrofagi do medium hodowlanego w znaczącym stopniu zwiększają ekspresję elementów wchodzących w skład niekanonicznego szlaku Wnt w komórkach nowotworowych. Zwiększonej ekspresji ulega główny receptor niekanonicznego szlaku Wnt, a także kinazy efektorowe Rac1 i Limk2 regulujące cytoszkielet komórek. Efekt ten wpływa na morfologię komórek nowotworowych nadając im fenotyp komórek mezenchymalnych z właściwościami migracyjnymi i inwazyjnymi.

W kolejnym badaniu dokonano syntezy oraz określono wpływ analogów migrastatyny na zdolności migracyjne ludzkich komórek raka piersi z linii komórkowej MDA-MB-361. Wyniki porównywano do makrolaktamu znanego jako silny inhibitor właściwości migracyjnych ludzkich komórek nowotworowych. Po ustaleniu maksymalnej nietoksycznej dawki dla komórek nowotworowych wykonano test gojenia rany. W oparciu o uzyskane wyniki wykazano silny efekt hamowania migracji komórek nowotworowych dla zsyntetyzowanych analogów migrastatyny. Efekt działania był zauważalny oraz statystycznie istotny już po 6 godzinach.

Podsumowując, w przedstawionej pracy określono zalecany wiek użytkowania linii komórkowej RAW 264.7 od pasaży 10 do pasaży 30. Wykazano także wpływ tych komórek na aktywację niekanonicznego szlaku Wnt w komórkach raka sutka, oraz wpływ analogów migrastatyny do hamowania migracji komórek nowotworowych wywołanej działaniem makrofagów (np. poprzez szlak Wnt).