

**Streszczenie pracy doktorskiej mgr Piotra Szczepaniaka pt. *“Mechanizmy dysfunkcji śródbłonna naczyniowego indukowanej chemioterapią u pacjentek z rakiem gruczołu sutkowego”***

**Wstęp:** Chemioterapia jest najczęstszą terapią stosowaną w leczeniu nowotworów, która znacznie zwiększa zarówno 5-letnie jak i 10-letnie przeżycie pacjentów. Zaobserwowano, iż w tym okresie główną przyczyną zgonów chorych którzy przeżyli chorobę nowotworową są schorzenia sercowo-naczyniowe, w szczególności powiązane z nadciśnieniem tętniczym oraz przyspieszonym rozwojem miażdżycy tętnic. W patofizjologii chorób sercowo-naczyniowych jedną z najważniejszych ról odgrywa dysfunkcja śródbłonna naczyń. Głównym czynnikiem prowadzącym do powstania dysfunkcji śródbłonna naczyń jest stres oksydacyjny, zaś szczególną rolę w powstawaniu reaktywnych form tlenu w naczyniach krwionośnych człowieka w kontekście schorzeń sercowo-naczyniowych pełni oksydaza NADPH. Wytwarzany przez oksydazę NADPH anionorodnik nadadtlenkowy przyczynia się do zaburzeń naczyniowych przez inaktywację tlenu azotu, wytwarzanego przez śródbłonkową syntazę tlenu azotu- eNOS. W rezultacie dochodzi do obniżenia biodostępności NO i zaburzenia relaksacji naczyń. Rola naczyniowych oksydaz NADPH: Nox1, Nox2 i Nox5 została już relatywnie dobrze poznana i jest ona związana z produkcją anionorodnika nadadtlenkowego. Rola Nox4 w biologii naczyniowej nie jest jednoznacznie określona. Podczas gdy szereg badań wskazuje na uszkodzający charakter wolnych rodników tlenowych, badania ostatnich lat wskazują iż w pewnych sytuacjach oksydaza Nox4 może odgrywać rolę ochronną (kompensacyjną). Nadekspresja tego enzymu sprzyja obniżeniu ciśnienia oraz wpływa ochronnie na własności rozkurczowe śródbłonna, jednak należy zauważyć, iż zastąpienie produkcji NO przez  $H_2O_2$  w komórkach śródbłonna, mimo utrzymania prawidłowej aktywności rozkurczowej może długofalowo prowadzić do następstw patologicznych. Podwyższony patologicznie poziom  $H_2O_2$  może doprowadzać do upośledzenia funkcji śródbłonna, poprzez indukcję stresu oksydacyjnego, stymulując szereg redoks- zależnych szlaków prozapalnych, produkcję  $O_2^-$  i aktywując tym samym oksydazę NADPH. Jednym ze schorzeń nowotworowych, w których zaobserwowano szczególną poprawę skuteczności leczenia, a które stanowi bardzo duży problem epidemiologiczny w Polsce i na świecie jest rak gruczołu sutkowego. Składniki

chemioterapii neoadjuwantowej (NACT): docetaksel i paklitaksel szkodzą w różnych warunkach klinicznych.

**Cel:** Głównym celem proponowanego projektu było ustalenie mechanizmu działania chemioterapii (docetaksel, cyklofosfamid, doksorubicyna) na funkcję śródbłonka naczyniowego u pacjentek poddanych chemioterapii neoadjuwantowej raka gruczołu sutkowego.

Cel projektu został osiągnięty poprzez poszukiwanie odpowiedzi na następujące cele szczegółowe:

1. Określenie wpływu chemioterapii neoadjuwantowej (docetaksel, cyklofosfamid, doksorubicyna) na funkcję śródbłonka naczyniowego i określenie efektów poszczególnych leków na naczynia *ex vivo*.
2. Zbadanie wpływu chemioterapii neoadjuwantowej (docetaksel, cyklofosfamid, doksorubicyna) na produkcję wolnych rodników tlenowych w ścianie naczynia krwionośnego.
3. Określenie mechanizmów dysfunkcji śródbłonka naczyniowego spowodowanego działaniem chemioterapii neoadjuwantowej.

**Wyniki:** Pacjentki po NACT miały znacznie upośledzoną funkcję naczyń krwionośnych zależną ( $P < 0.0001$ ) od śródbłonka naczyniowego, w porównaniu do pacjentek bez NACT, która uległa poprawieniu o 45% w obecności zmiatacza wolnych rodników-N-acetylocysteiny ( $P < 0.01$ ). Zaobserwowano także zmiany w funkcji naczyń niezależnej od śródbłonka naczyniowego. NACT indukowała dysfunkcję śródbłonka naczyniowego w ludzkich naczyniach krwionośnych po 24 godzinnej inkubacji z docetaksem, 4-hydroperoksy-cyklofosfamidem oraz doksorubicyną. Docetaksel powodował upośledzenie funkcji śródbłonka naczyniowego w porównaniu z naczyniem kontrolnym, podczas gdy nie zaobserwowano takich różnic po zastosowaniu cyklofosfamidu, 4-hydroperoksy-cyklofosfamidu oraz doksorubicyny. Funkcja śródbłonka naczyniowego upośledzona przez NACT była pogorszona pod wpływem katalazy (enzym rozkładający  $H_2O_2$ ). Rozkurcz tętnic pacjentek bez NACT był regulowany przez inhibitor eNOS (L-NAME) a pozostawał bez zmian w naczyniach pacjentek po NACT. Dodatkowo zaobserwowano podwyższony poziom  $O_2^-$  w naczyniach krwionośnych pochodzących od pacjentek po NACT wytwarzany w stanie podstawowym (17.6 vs. 39.4 RLU/s/mg;  $P < 0.05$ ), jak również w obecności NADPH (1124.4 vs. 2609.4 RLU/s/mg;  $P < 0.05$ ) oraz poziom  $H_2O_2$  (0.99 vs. 2.84  $\mu M$ /mg białka). Aktywność oksydazy NADPH była wyższa u pacjentek leczonych

NACT ( $641 \pm 110$  vs.  $268 \pm 83$  pmol/mg białka;  $P < 0.001$ ). Przeprowadzono również badania ekspresji wybranych genów techniką RT-PCR, spośród których geny: *CYBB*, *NOX4*, *CAT*, *SOD1* oraz *SOD2* wykazywały istotnie znaczący wzrost w naczyniach krwionośnych od pochodzących od pacjentek leczonych NACT co zostało potwierdzone techniką Western blotting na poziomie białka. Podwyższony poziom ekspresji *NOX4* był determinowany obniżoną ilością zmetylowanych par CpG w obrębie promotora. Docetaksel indukował w naczyniach ekspresję: *CYBB* ( $1.55 \pm 0.43$  vs.  $1.00 \pm 0.23$ ), *CAT* ( $1.71 \pm 1.03$  vs.  $1.00 \pm 0.68$ ), *NOX4* ( $1.52 \pm 0.99$  vs.  $1.00 \pm 0.81$ ), *SOD1* ( $1.95 \pm 0.49$  vs.  $1.00 \pm 1.30$ ) oraz *SOD2* ( $1.75 \pm 0.80$  vs.  $1.00 \pm 0.54$ ) w porównaniu do naczyń kontrolnych. Oksydazy NOX2 oraz NOX4 były głównie zlokalizowane w warstwie środkowej naczyń krwionośnych, podczas gdy docetaksel indukował *CYBB* i *NOX4* w komórkach HDMEC a w komórkach HASMC tylko *NOX4*. Poziom  $O_2^-$  indukowany przez NACT był obniżony pod wpływem prekursora tetrahydrobiopteryny-sepiapteryny (o 66%), inhibitora PKC- chelerytryny (o 65%), inhibitora Nox1/4- GKT137831 (o 80%) oraz L-NAME (o 49%), natomiast pozostawał bez zmian po inkubacji z indometacyną (inhibitor cyklooksygenaz). Poziom eNOS oraz fosforylacji S1177 eNOS pozostawał bez zmian, natomiast NACT indukowała aktywność PKCa oraz fosforylację T495 eNOS obniżając aktywność eNOS. Fosforylacja T495 eNOS indukowana przez docetaksel została zahamowana przez Y27632 (inhibitor ROCK), a nie Go6976 (inhibitor PKCa) w warunkach *in vitro*. Nastrzykiwanie docetakselem spowodowało wzrost ciśnienia skurczowego krwi u myszy kontrolnych (WT) (o 19 mmHg). Myszy WT nastrzykiwane docetakselem miały upośledzoną funkcję naczyń krwionośnych, zależną od śródbłonna naczyniowego w porównaniu do myszy WT nastrzykiwanych placebo oraz do myszy *Nox4<sup>-/-</sup>* nastrzykiwanych docetakselem. Myszy *Nox4<sup>-/-</sup>* nastrzykiwane docetakselem miały większy skurcz aort w porównaniu do myszy *Nox4<sup>-/-</sup>* nastrzykiwanych placebo. Aorty myszy WT pod wpływem działania docetakselu produkowały więcej  $O_2^-$  ( $26.62 \pm 12.48$  vs.  $10.83 \pm 6.26$  RLU/s/mg) oraz  $H_2O_2$  w porównaniu do myszy nastrzykiwanych placebo ( $135 \pm 31\%$  vs.  $100 \pm 22\%$ ).

**Wnioski:** Chemioterapia neoadjuwantowa powodowała upośledzenie funkcji naczyń krwionośnych poprzez wzrost poziomu reaktywnych form tlenowych oraz wzrost fosforylacji T495 eNOS obniżającej poziom NO w naczyniach krwionośnych u pacjentek z rakiem gruczołu sutkowego. Docetaksel, jako składnik chemioterapii neoadjuwantowej indukuje upośledzenie funkcji śródbłonna. Oksydaza NAPDH- Nox4

i produkowany przez nią  $H_2O_2$  odgrywają negatywną rolę w dysfunkcji śródbłonka w mysich aortach pod wpływem docetakselu, podczas gdy w ludzkich tętnicach obserwowany jest także mechanizm kompensacyjny  $H_2O_2$  po działaniu chemioterapii neoadjuwantowej.

## Summary

**Introduction:** Chemotherapy is successfully used in cancer treatment as it significantly increases both 5-year and 10-year survival rates of patients with various cancers. It has been observed that the main causes of death in patients who survived cancer are cardiovascular diseases, particularly hypertension and accelerated atherosclerosis, which develop earlier in cancer patients than in the general population. Vascular endothelial dysfunction plays a crucial role in the pathogenesis of cardiovascular diseases. The main factor that causes vascular endothelial dysfunction in human vessels in the setting of atherosclerosis, hypertension and cardiovascular risk is oxidative stress. Superoxide radical ( $O_2^-$ ) produced by NADPH oxidases contributes to cardiovascular disorders by deactivating nitric oxide (NO) produced by endothelial nitric oxide synthase - eNOS. As a result, loss of NO bioavailability and impaired relaxation occur, which are hallmarks of endothelial dysfunction as they indicate loss of protective NO bioactivity. Previous studies confirmed that Nox 1, 2, 4, and 5 are predominant NADPH oxidases in human vascular disease pathophysiology. The role of vascular oxidases Nox1, Nox2, and Nox5 is already relatively well recognized, and it is related to the production of  $O_2^-$ . The role of Nox4 in vascular biology is less clear at present. While a number of studies point to the damaging nature of free radicals, recent studies indicate that in certain situations, Nox4 oxidase may play a protective role (compensatory). In relation to moderate hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) production in the vasculature, the overexpression of Nox4 promotes blood pressure reduction and provides protective effects on the properties of endothelium dependent vasodilatation, which instead of being mediated by NO, is taken over by  $H_2O_2$ . However, it should be noted that the substitution of NO production by  $H_2O_2$  in endothelial cells, despite the maintenance of normal vasodilatory activity could, in the long term lead to pathological consequences such as remodelling dependent on growth and apoptosis or inflammation. Breast cancer represents one of the cancers which constitute a very large epidemiological problem in Poland and worldwide, where there has been a particular improvement in the effectiveness of treatment over recent years, especially with the advent of docetaxel- and paclitaxel- containing chemotherapy protocols. However, these neoadjuvant Chemotherapy (NACT) drugs are negative in various clinical settings.

**Aims:** The main aim of the project was to determine the mechanism of action of chemotherapy (docetaxel, cyclophosphamide, doxorubicin) on endothelial function in patients with breast cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy.

The scientific aim of the project has been achieved by seeking answers to the following specific objectives:

1. Determination of the effect of neoadjuvant chemotherapy (docetaxel, cyclophosphamide, doxorubicin) on vascular endothelial function and determination of the impact of individual drugs on vessels *ex vivo*.
2. Examination of the role influence of neoadjuvant chemotherapy (docetaxel, cyclophosphamide, doxorubicin) in the mechanism of overproduction of free radicals in vessel walls.
3. Understanding the process by which neoadjuvant chemotherapy causes vascular endothelial dysfunction.

**Results:** Patients after NACT had significantly impaired endothelium dependent vascular function ( $P < 0.0001$ ), compared to patients who did not receive NACT, which was improved by 45% in the presence of N-acetylcysteine scavenger ( $P < 0.01$ ). Changes in vascular endothelium independent relaxation were also observed. NACT induced vascular endothelial dysfunction in human blood vessels after 24- hours incubation with docetaxel, 4-hydroperoxy-cyclophosphamide and doxorubicin. Docetaxel caused impairment of vascular endothelial function compared to the control, while no differences were observed after exposure to cyclophosphamide, 4-hydroperoxy-cyclophosphamide and doxorubicin. Vascular endothelial function impaired by NACT was demeged by catalase ( $H_2O_2$  decomposing enzyme). The vessel relaxation of patients without NACT was regulated by eNOS inhibitor (L-NAME) and remained unchanged in the vessels of NACT patients. In addition, elevated  $O_2^-$  levels were obtained in blood vessels from patients after NACT produced by the vessels (17.6 vs. 39.4 RLU/s/mg,  $P < 0.05$ ), as well as the presence of NADPH (1124.4 vs. 2609.4 RLU/s/mg;  $P < 0.05$ ). The NADPH oxidase activity was higher in vessels from patients treated with NACT ( $641 \pm 110$  vs.  $268 \pm 83$  pmol/mg protein,  $P < 0.001$ ). NACT also induced  $H_2O_2$  level (0.99 vs. 2.84  $\mu M$ /mg protein). Studies on the expression of selected genes by RT-PCR have also been performed, of which the *CYBB*, *NOX4*, *CAT*, *SOD1* and *SOD2* genes showed significantly increased levels in blood vessels of patients treated with NACT, which was confirmed by Western blotting at the protein level. Elevated levels of *NOX4* expression were determined by a reduced amount

of methylated CpG counts within the promoter. Docetaxel induced the following genes in vessels: *CYBB* (1.55±0.43 vs. 1.00±0.23), *CAT* (1.71±1.03 vs. 1.00±0.68), *NOX4* (1.52±0.99 vs. 1.00±0.81), *SOD1* (1.95±0.49 vs. 1.00±1.30) and *SOD2* (1.75±0.80 vs. 1.00±0.54) (compared to the control). Oxidases NOX2 and NOX4 were mainly localized in the tunica media of blood vessels, while docetaxel induced *NOX4* in HASMC cells and both *CYBB* and *NOX4* in HDMEC cells.  $O_2^-$  induced by NACT was decreased by the precursor of tetrahydrobiopterin- sepiapterin (by 66%), by PKC inhibitor- cheleritrin (by 65%), Nox1/4 inhibitor- GKT137831 (by 80%), and by L-NAME (by 49%), while it remained unchanged after incubation with indomethacin (cyclooxygenase inhibitor). The level of eNOS and phosphorylation of S1177 eNOS remained unchanged, whereas NACT induced phosphorylation of T495 eNOS and PKC $\alpha$  activity. T495 eNOS phosphorylation induced by docetaxel was inhibited by Y27632 (ROCK inhibitor) and not by Go6976 (PKC $\alpha$  inhibitor) *in vitro*. Docetaxel injections increased systolic blood pressure in the control mice (WT) (by 19 mmHg). WT mice injected with docetaxel had impaired endothelial function dependent as compared to WT injected mice and to the *Nox4*<sup>-/-</sup> mice injected with docetaxel. Investigation the systolic function of the aortas with increasing doses of phenylephrine showed statistically significantly stronger contraction was obtained in the *Nox4*<sup>-/-</sup> mice was injected with docetaxel compared to the *Nox4*<sup>-/-</sup> mice that injected with placebo. The WT mice in the influence of docetaxel produced significantly more  $O_2^-$  (26.62±12.48 vs. 10.83±6.26 RLU/s/mg) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> compared to mice injected with placebo (135±31% vs. 100±22%).

**Conclusions:** Neoadjuvant chemotherapy caused the impairment of blood vessel function by increasing the level of reactive oxygen species and increasing the phosphorylation of T495 eNOS that reduces the level of NO in blood vessels in patients with breast cancer. Docetaxel, as a component of neoadjuvant chemotherapy, induces to impair vascular endothelial function. The NAPDH Nox4 oxidase and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> play a negative role in the endothelial dysfunction in mice aortas under the influence of docetaxel, while in the human blood vessels, the compensatory mechanism of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> after the action of neoadjuvant chemotherapy is observed.