

Warszawa 04.01.2016

Prof. dr hab. Janusz Siedlecki
Zakład Onkologii Molekularnej
i Translacyjnej,
Centrum Onkologii-Instytut,
ul. Roentgena 5, 02-784 Warszawa

Recenzja rozprawy doktorskiej pt.

**„Rola oksygenazy hemowej-1 w raku płaskonabłonkowym: wpływ na karcynogenezę,
wzrost nowotworu oraz mobilizację komórek układu immunologicznego”**

Autor: *mgr Agata Szade*

Kancerogeneza jest procesem o bardzo skomplikowanej sekwencji zdarzeń..Trudność w zdefiniowaniu tego procesu jest wynikiem faktu, że sekwencja ta może się różnić nawet dla tej samej jednostki chorobowej. Obecna wiedza pozwala na zdefiniowanie jedynie w nielicznych typach nowotworu tzw. zmian kierujących. Są to zwykle zmiany prowadzące do poważnego zaburzenia homeostazy komórkowej. Ich konsekwencją jest cały szereg zmian nazywanych towarzyszącymi, które wpływają na fenotyp guza. Ponieważ nawet w obrębie tego samego guza mamy do czynienia z rozrostem co najmniej oligoklonalnym, co oznacza heterogenność klonalną, końcowy fenotyp guza jest wynikiem pewnego uśrednienia wynikającego z wielości genotypów. Stąd ustalenie roli uszkodzenia w pojedynczym genie to bardzo ambitne przedsięwzięcie.

Dotychczasowe badania nad rolą produktu genu HO-1 wskazują, że pełni on istotną rolę nie tylko w metabolizmie hemu. HO-1 katalizuje enzymatyczny rozkład hemu do jonów żelaza, tlenku węgla i biliwerdyny, która następnie redukowana jest do bilirubiny. Powstające w wyniku rozkładu hemu produkty mają własności antyproliferacyjne, przeciwutleniające i antyapoptyczne. Co ważniejsze, wykazują też działanie immunomodulujące, w tym szczególnie indukują zwiększoną ekspresję cytokin prozapalnych. To z kolei może sprzyjać

zwiększeniu agresywności nowotworu i zdolności do przerzutowania. Przedstawiona do recenzji praca mgr Agaty Szade dotyczy badania roli oksygenazy hemowej pierwszej (HO-1) oraz efektów indukowanych przez produkty rozpadu hemu w procesie kancerogenezy płaskonabłonkowego raka jamy ustnej.

Praca ma układ typowy dla tego typu opracowań. Liczy aż 160 stron. Jest napisana w języku angielskim. Pod względem językowym i edytorskim praca jest przygotowana z dużą starannością. Ryciny są przejrzyste, choć czasami recenzent ma wrażenie, że opisy do nich są zbyt skąpe.

Celem pracy była weryfikacja dwóch podstawowych hipotez przedstawionych przez autorkę. Pierwsza z nich zakładała, że indukowana oksygenaza hemowa pierwsza (HO-1) może chronić przed rozwojem wywoływanego przy pomocy czynnika chemicznego (4NQO) płaskonabłonkowego raka jamy ustnej. Druga hipoteza sugerowała, że nadekspresja HO-1 w komórkach nowotworowych wpływa na ich szybszy wzrost, angiogenezę a także na infiltrację guza przez komórki układu immunologicznego. W trakcie badań nad efektem farmakologicznej indukcji HO-1 przez CoPP ujawniono nieoczekiwanie wpływ tego związku na mobilizację komórek układu immunologicznego ze szpiku do krwi obwodowej. Próba wyjaśnienia tego zjawiska stała się trzecim celem przedstawionej pracy.

W pracy wykorzystano dwa badawcze modele zwierzęce. W pierwszym płaskonabłonkowy nowotwór jamy ustnej (języka) był indukowany przez podanie wraz z wodą pitną chemicznego kancerogenu 4NQO myszom o genotypie HO-1^{-/-}, HO-1^{+/-} i HO-1^{+/+}. Obserwowano różnice w zewnętrznych objawach charakterystycznych dla procesu nowotworowego takich jak utrata wagi i obecność zmian nowotworowych. W prowadzonych badaniach obserwowano zmiany obecne na języku i w przetyku. W drugim wprowadzono

podskórnio do syngenicznych myszy komórki linii raka płaskonabłonkowego SCC-VII, w których HO-1 ulegał nadekspresji lub był na normalnym poziomie (kontrola).

Niezależnie od genotypu, myszy, którym podawano 4NQO w końcowym stadium eksperymentu nie różniły się pod względem wagi. Ich waga była jednak mniejsza niż myszy kontrolnych. Również liczba zmian nowotworowych na języku i w przełyku w obu przypadkach była podobna. U myszy HO-1^{-/-}, którym podano 4NQO doktorantka, co prawda obserwowano powstawanie nowotworów szybciej, ale były to przeważnie zmiany łagodne. Przeciwnie, u zwierząt HO-1^{+/+} wszystkie powstałe zmiany miały charakter silnie inwazyjny. Dalo się natomiast zauważyć zróżnicowanie w ekspresji cytokeratyn 5, 8 i 14, co wskazuje na brak pełnego różnicowania nabłonka w liniach myszy, którym podawano 4NQO.

Ponieważ HO-1 jest czynnikiem modulującym aktywność układu immunologicznego poprzez indukcję aktywności niektórych cytokin doktorantka zmierzyła stężenie niektórych cytokin w surowicy myszy traktowanych 4NQO i myszy kontrolnych. U myszy z deficytem HO-1 obserwowano zwiększone stężenie IL6, a podanie 4NQO jeszcze bardziej zwiększało stężenie tej cytokiny. Podwyższone stężenie IL7 obserwowano jedynie u myszy o genotypie HO-1^{-/-}pojęnych 4NQO. Podobny efekt obserwowano dla IL10, chociaż w tym wypadku stężenie IL10 jedynie w niewielkim stopniu zależało od podania 4NQO. Wiele innych cytokin i chemokin wykazywało różnice w stężeniach w surowicy związane z genotypem. W większości przypadków były one związane z genotypem niedoboru HO-1. W sumie zebrane dane pozwalają na stwierdzenie, że poziom ekspresji HO-1 ma wpływ na odpowiedź układu immunologicznego. Nie wydaje się jednak, aby podanie 4NQO miało jakikolwiek wpływ na stężenie większości badanych cytokin w tych przypadkach, gdy poziom HO-1 jest prawidłowy. W tym miejscu warto wspomnieć, że opisane powyżej wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie anglojęzycznym w artykule, którego pierwszym autorem jest doktorantka.

Z przeprowadzonych badań wynika, że HO-1 przeciwdziała indukcji procesu nowotworowego u zwierząt doświadczalnych. Efekt ten nie ma jednak charakteru bezpośredniego, a jest raczej wynikiem wpływu na odpowiedź ze strony układu immunologicznego.

Ponieważ wiadomo było, że przynajmniej część nowotworów wykazuje nadekspresję HO-1 autorka uznała za celowe sprawdzenie czy rzeczywiście nadekspresja HO-1 odgrywa istotną rolę w procesie wzrostu guza. Aby łatwiej ocenić wpływ HO-1 linię komórkową ludzkiego płaskonabłonkowego raka SSC VII transformowano przy pomocy genu kodującego HO-1 pod silnym promotorem, co prowadziło do nadekspresji HO-1. Tak uzyskane komórki wprowadzano śródskórnym myszom. Zaobserwowano, że guzy wykazujące nadekspresję HO-1 były mniejsze. Jednak w porównaniu do kontroli nadekspresja HO-1 nie powodowała zwiększenia proliferacji, nie miała też wpływu na migrację i inwazyjność komórek raka. Nie obserwowano też znaczących różnic w stężeniach badanych cytokin i czynników wzrostu. Natomiast zaobserwowano różnice w typie komórek układu immunologicznego naciekających zmiany nowotworowe. U myszy, których nowotwór wykazywał nadekspresję HO-1 większość naciekających nowotwór leukocytów miała fenotyp mieloidalny. Te obserwacje stały się podstawą do podjęcia próby indukowania lub hamowania ekspresji HO-1 za pomocą czynników chemicznych. W tym celu wykorzystano pochodne protoporfiryny – kobaltu (CoPP) będąca aktywatorem i cyny (SnPP) będąca inhibitorem ekspresji HO-1. Analizowano populacje komórek mieloidalnych we krwi, szpiku kostnym i w śledzionie.


Farmakologiczna indukcja ekspresji HO-1 w komórkach nowotworowych nie prowadziła, co prawda do wzrostu naciekania guza przez komórki układu immunologicznego, chociaż zaobserwowano wyraźną zmianę w typie naciekających komórek. Znacznemu zwiększeniu ulega procentowa zawartość granulocytów i monocytów, podczas, gdy maleje procentowa zawartość limfocytów oraz proporcja limfocytów CD4⁺ do CD8⁺. Wśród

komórek naciekających guz wykazujący nadekspresję HO-1 mniej też było limfocytów regulatorowych. Mobilizacja komórek hematopoetycznych, w tym głównie komórek linii mieloidalnej (granulocytów i neutrofilii) przez CoPP związana jest ze zmianą stężenia niektórych cytokin, takich jak IL5, IL6 i przede wszystkim G-CSF. Autorka sugeruje, że wzrost poziomu G-CSF indukowany przez CoPP prowadzi do mobilizacji komórek ze szpiku kostnego. Aby to sprawdzić wykonuje bezpośrednie porównanie skutków mobilizacji przez oba czynniki: G-CSF i CoPP. Bliższe badania składu mobilizowanych komórek z wykorzystaniem cytometrii przepływowej wskazują, że chociaż efekt stymulacji komórek wykazujących nadekspresję HO-1 jest częściowo podobny, to obserwowane różnice wydają się wskazywać, że mechanizm stymulacji nie jest identyczny.

Dyskusja tej pracy poprowadzona jest z dużym zrozumieniem zagadnienia. Doktorantka kolejno omawia uzyskane wyniki i porównuje je z danymi literaturowymi. Dyskusja jest poprowadzona bardzo przejrzysto. Uważam, że stanowi bardzo wartościowy fragment tej pracy i jest świadectwem dojrzałości i rzetelności naukowej autorki.

Praca kończy się podsumowaniem, w którym autorka podkreśla, że nie udało jej się potwierdzić dwóch głównych hipotez stawianych w celu pracy. Jednak wskazuje, że chociaż HO-1 w sposób bezpośredni nie chroni przed kancerogenezą indukowaną chemicznie, to pośrednio, wpływając na zmiany w stężeniach niektórych cytokin, moduluje odpowiedź układu immunologicznego. Wskazuje też, że chociaż nie do końca można potwierdzić, że nadekspresja HO-1 indukuje rozwój nowotworu, to zmiany w odpowiedzi immunologicznej nie pozwalają też na całkowite zaniegowanie tej hipotezy. Wreszcie doktorantka podkreśla, że prowadzone przez nią badania pozwoliły na uznanie CoPP jako czynnika potencjalnie użytecznego do mobilizacji komórek układu immunologicznego w szpiku.

Podsumowując, uważam, że mgr Agata Szade osiągnęła stawiane sobie cele. Chociaż nie udało jej się do końca wyjaśnić mechanizmu działania HO-1 w procesie kancerogenezy, to jednak zwrócenie uwagi na rolę, jaką HO-1 odgrywa w indukcji układu immunologicznego, szczególnie w warunkach jego mobilizacji wynikającej z nadekspresji HO-1 w komórkach nowotworowych, jest istotne i może mieć znaczenie dla dalszych prób wyjaśnienia roli oksygenazy hemowej. Istotną częścią tej pracy jest również wykazanie, że kobaltowa pochodna protoporfiryny, modulująca w sposób niezależny od poziomu HO-1, odpowiedź układu immunologicznego może potencjalnie być wykorzystana jako lek przeciwdziałający neutropenii. Warto w tym miejscu podkreślić, że wynik tej pracy stały się podstawą do złożenia wniosku patentowego. Dlatego wnioskuję do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie autorki pracy do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na wartości poznawcze tej pracy oraz na potencjalne możliwości wykorzystania ich w klinice wnioskuję o wyróżnienie tej pracy.


Kierownika
Katedry Onkologii
Molekularnej i Translacyjnej
Prof. dr hab. n. med. Janusz A. Siedlecki