

STRESZCZENIE PRACY DOKTORSKIEJ – A. Szade

Raki płaskonabłonkowe (SCC, ang. *squamous cell carcinoma*) są zróżnicowaną grupą agresywnych nowotworów, o niewyjaśnionej do końca patogenezie. Niektóre obserwacje kliniczne sugerują, że na rozwój SCC może mieć wpływ aktywność oksygenazy hemowej-1 (HO-1). HO-1 katalizuje enzymatyczny rozkład hemu do jonów żelaza, tlenku węgla i biliwerdyny, która jest następnie zredukowana do bilirubiny. Produkty reakcji rozkładu hemu posiadają właściwości antyapoptotyczne, antyproliferacyjne, przeciwutleniające, a także immunomodulujące, mogą więc wpływać na wzrost i przerzutowanie nowotworu.

Układ odpornościowy potrafi rozpoznać i zniszczyć stransformowaną komórkę nowotworową. Szacuje się, że codziennie w organizmie ludzkim wiele stransformowanych komórek jest eliminowanych w ten sposób. Jednakże ciągła presja immunologiczna powoduje selekcję komórek nowotworowych, które unikają eliminacji przez komórki układu odpornościowego. Przełamanie supresji immunologicznej, pozwoliłoby prawdopodobnie na ich skuteczną eliminację. Dlatego wiele uwagi poświęca się mechanizmom upośledzenia odpowiedzi antynowotworowej.

Badania wskazują, że HO-1 pełni istotną rolę w komórkach nowotworowych. HO-1 jest indukowana przez szereg czynników prozapalnych i ulega wysokiej ekspresji w wielu nowotworach. Uważa się, że HO-1, jako enzym cytoprotekcyjny, jest odpowiedzialna za ochronę komórek nowotworowych przed chemioterapią i terapią fotodynamiczną oraz ułatwia nabywanie oporności na niektóre leki przeciwnowotworowe. Pomimo znanej funkcji HO-1 w regulacji odpowiedzi immunologicznej dotychczas nie uwzględniano wysokiej ekspresji HO-1 w nowotworach, jako potencjalnego czynnika regulującego odpowiedź antynowotworową.

Celem pracy było zbadanie roli HO-1 w indukcji i progresji raka płaskonabłonkowego, w szczególności w regulacji migracji leukocytów do nowotworu.

W pierwszej części badań myszy o różnym poziomie ekspresji HO-1 (typu dzikiego, z niedoborem HO-1 oraz nadekspresją HO-1 w nabłonkach) były poddane chemicznej karcynogenezie jamy ustnej i przełyku. Nie odnotowano wpływu poziomu HO-1 na powstawanie zmian nowotworowych na języku. Zaobserwowano natomiast, że myszy z

niedoborem HO-1 (HO-1^{-/-}) były bardziej podatne na karcynogenne działanie 4NQO w przełyku niż myszy typu dzikiego oraz myszy z nadekspresją HO-1. Ponadto, tylko w grupie myszy HO-1^{-/-} zaobserwowano wysoką śmiertelność spowodowaną ostrą toksycznością 4NQO w początkowym etapie trwania eksperymentu. W językach myszy poddanych działaniu 4NQO nastąpił wzrost ekspresji dysmutazy ponadtlenkowej 1 (Sod1) oraz keratyny 8, której ekspresja w nabłonku wielowarstwowym jest związana z nowotworzeniem. Jednocześnie obniżyła się ekspresja keratyny 4, charakterystycznej dla zróżnicowanych komórek nabłonka. W surowicy myszy poddanych działaniu 4NQO zaobserwowano wzrost stężenia IL-6 i eotaksyny. Niedobór HO-1 spowodował wzrost stężenia IL-7 oraz MCP-1 w surowicy zwierząt traktowanych karcynogenem, co może sugerować immunomodulujące działanie HO-1.

Następnie wszczepiono podskórnie myszom syngenicznym komórki linii raka płaskonabłonkowego o normalnym lub stabilnie podwyższonym poziomie HO-1. Wzrost guzów był monitorowany za pomocą pomiarów bioluminescencji. Po uśpieniu myszy, analizowano napływ leukocytów do guzów nowotworowych za pomocą cytometrii przepływowej. Komórki z nadekspresją HO-1 po podaniu do myszy syngenicznych tworzyły mniejsze guzy, ze zwiększoną infiltracją komórek układu odpornościowego (CD45⁺), szczególnie linii mieloidalnej (CD11b⁺): niektórymi populacjami makrofagów oraz mieloidalnych komórek supresorowych (MDSC). Nadekspresja HO-1 w guzie miała także wpływ na zmniejszoną infiltrację guzów komórkami o fenotypie limfocytów T regulatorowych (CD4⁺ CD25⁺) oraz zmniejszony stosunek limfocytów CD4/CD8 w guzie oraz we krwi obwodowej.

Ekspresja HO-1 jest często podwyższona w tkance nowotworowej, ale jest także dodatkowo indukowana przez chemioterapię oraz radioterapię. Dlatego w kolejnym etapie badań, razem z podskórnym podaniem komórek nowotworowych, zastosowano farmakologiczną indukcję HO-1 za pomocą protoporfiryny kobaltu IX (CoPP). Wykazano, że podanie CoPP powoduje mobilizację komórek ze szpiku kostnego do krwi obwodowej, czemu towarzyszy wzrost stężenia G-CSF oraz IL-6 we krwi. Mobilizacja komórek krwi ze szpiku kostnego do krążenia obwodowego ma kluczowe znaczenie dla zapewnienia prawidłowego funkcjonowania układu odpornościowego. Proces ten jest ściśle regulowany zarówno podczas homeostazy hematologicznej, jak i w warunkach stresu, takich jak infekcje lub terapia lekami cytotoksycznymi. Mechanizmy regulujące

mobilizację komórek są złożone i pozostają nie w pełni poznane. Populacje leukocytów, zmobilizowanych przez podanie CoPP charakteryzowano bardziej szczegółowo przy użyciu cytometru przepływowego. Podanie CoPP spowodowało wzrost ilości granulocytów (CD11b⁺ Ly6C⁻ Ly6G⁺) we krwi. Zaobserwowano także mobilizację hematopoetycznych komórek macierzystych/progenitorowych (KLS, c-Kit⁺ Lin⁻ Sca-1⁺). W porównaniu do rhG-CSF, CoPP mobilizuje granulocyty bardziej dojrzałe, o większej ziarnistości i wyższej ekspresji Ly6G oraz większą liczbę komórek KLS, regenerujących układ krwiotwórczy po przeszczepie. Wyniki naszych doświadczeń pokazują, że CoPP może być rozpatrywana jako potencjalny lek przeciwdziałający neutropenii lub środek służący do mobilizacji komórek macierzystych w celu ich izolacji i przeszczepienia. Podanie CoPP myszom pozbawionym genów kodujących HO-1 oraz czynnika transkrypcyjnego Nrf2 wywołało taki sam efekt mobilizacji komórek jak u myszy dzikich, co wskazuje na niezależne od HO-1 i Nrf2 działanie CoPP.

Podsumowując, zmieniona ekspresja HO-1 w raku płaskonabłonkowym może wpływać na powstawanie i wzrost nowotworu, ekspresję cytokin i czynników wzrostu oraz infiltrację guzów przez komórki układu odpornościowego. CoPP działając niezależnie od HO-1 powoduje mobilizację komórek hematopoetycznych ze szpiku kostnego do krwi.

Lista publikacji, na podstawie których została przygotowana rozprawa:

1. **A. Szade**, J. Dulak, A. Józkowicz: *Rola oksygenazy hemowej-1 w patogenezie nieswoistych zapaleń jelit (The role of heme oxygenase-1 in the inflammatory bowel diseases)*, Przegląd gastroenterologiczny 2009, 4 (6): 283-287, ARTYKUŁ PRZEGLĄDOWY.
2. **A. Szade**, A. Grochot-Przęczek, U. Florczyk, A. Józkowicz, J. Dulak: *Cellular and molecular mechanisms of inflammation-induced angiogenesis*, IUBMB Life, 2015 Mar;67(3):145-59, ARTYKUŁ PRZEGLĄDOWY.
3. **A. Szade**, W.N. Nowak, Krzysztof Szade, A. Gese, R. Czypicki, H. Waś, J. Dulak, A. Józkowicz: *Effect of Crossing C57BL6 and FVB Mouse Strains on Basal Cytokine Expression*, Mediators of Inflammation 2015, Article ID 762419.

