

mgr Alicja Głuszko

**Rola egzosomów i angiogenezy indukowanej
hipoksją w rakach płaskonabłonkowych regionu
głowy i szyi u człowieka**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: dr hab. n. med. Mirosław Szczepański

Katedra i Zakład Biochemii

Wydział Lekarski

Warszawski Uniwersytet Medyczny



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych

Warszawa 2021

Streszczenie

Raki płaskonabłonkowe regionu głowy i szyi (ang. Head and Neck Squamous Cell Carcinomas; HNSCC) stanowią około 5% wszystkich nowotworów złośliwych na świecie, z szacowanym przyrostem o około 1/3 przypadków w ciągu dziesięciolecia. Pomimo postępów w diagnostyce i terapii wskaźnik 5-letniego przeżycia nie zwiększył się istotnie w okresie ostatnich kilkunastu dekad. Neoangiogeneza to proces indukowany hipoksją, umożliwiający guzom litym, do których zaliczają się HNSCC, dalszy wzrost oraz przerzutowanie, a heterogenność związana z oksygenacją rejonów guza skutkuje nabyciem fenotypu agresywnego. W progresji HNSCC stymulowanej hipoksją partycypują egzosomy oraz macierzyste komórki nowotworowe. Egzosomy, będące wyspecjalizowanymi mediatorami informacji komórkowej, posiadają potencjał do przeprogramowywania komórek endotelium naczyniowego. Natomiast subpopulacja macierzystych komórek nowotworowych koreluje ze wzrostem gęstości mikrounaczynienia guza.

Celem przeprowadzonych badań była ocena występowania i funkcji egzosomów oraz macierzystych komórek nowotworowych w angiogenezie indukowanej hipoksją w rakach płaskonabłonkowych regionu głowy i szyi u człowieka. Kierując się danymi literaturowymi i wstępnymi wynikami badań, postawiłam następującą hipotezę badawczą: 1) egzosomy odgrywają istotną rolę w rozwoju nowotworów poprzez ścieżkę angiogenną; 2) hipoksja wywiera wpływ na wydzielanie egzosomów i zmianę ich ładunku molekularnego na proangiogeny; 3) egzosomy wydzielane przez komórki nowotworowe w stanie hipoksji odzwierciedlają status oksygenacji, stanowiąc swoisty biomarker stopnia utlenowania wnętrza guza; 4) hipoksja w mikrośrodowisku HNSCC indukuje powstanie macierzystych komórek nowotworowych o potencjale proangiogenym. W celu potwierdzenia hipotezy badawczej przeanalizowałam dostępną literaturę i wykonałam odpowiednie badania, których wyniki przedstawiłam w cyklu trzech publikacji stanowiących rozprawę doktorską.

Przegląd danych literaturowych posłużył do przygotowania pierwszej przeglądowej pracy z cyklu pt.: *“Exosomes in Cancer: Circulating Immune-Related Biomarkers”*. W publikacji opisałam biogenezę i charakterystykę egzosomów w roli mediatorów informacji międzykomórkowej, zwracając uwagę na ich funkcję w progresji nowotworu, a szczególnie na aspekt proangiogeny i immunosupresyjny. W kolejnym etapie pracy doktorskiej

przeprowadziłam badania laboratoryjne w warunkach hodowli *in vitro*, które posłużyły do przygotowania oryginalnej publikacji pt: „*Small Extracellular Vesicles from Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells Carry a Proteomic Signature for Tumor Hypoxia*”. Uzyskane wyniki wykazały dodatnią ilościową i jakościową zależność proangiogenną wydzielanych egzosomów towarzyszącą gradacyjnemu obniżaniu prężności tlenu. Zmiany generowane hipoksją znacząco nasilały się w przypadku komórek nowotworowych, w przeciwieństwie do prawidłowej kontroli. Ponadto analiza proteomu hipoksyjnego wyłoniła unikalne białka mogące potencjalnie pełnić rolę egzosomalych wskaźników stopnia utlenowania heterogennej struktury wnętrza guza. W celu potwierdzenia kolejnego punktu hipotezy badawczej dotyczącej proangiogennej roli subpopulacji macierzystych komórek nowotworowych CD44(+), zostały przeprowadzone badania na modelu *in vitro*, *in vivo* i *ex vivo*, zwieńczone opublikowaniem artykułu oryginalnego pt.: „*CD44(+) tumor cells promote early angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma*”. W uzyskanych rezultatach zaobserwowałam wzrost ekspresji markera CD44, który korelował dodatnio ze stopniem zaawansowania nowotworu oraz z gęstością mikrounaczynienia w zmianach dysplastycznych. Ponadto została udowodniona obecność różnorodnych czynników proangiogennych oraz lokalizacja komórek CD44(+) w periwaskularnej niszy wraz z koekspresją markera naczyniowego i udziałem w promowaniu angiogenezy.

Wnioski płynące z pracy doktorskiej wskazują na istotną rolę komórek macierzystych o fenotypie CD44(+) w indukcji oraz rozpoznaniu wczesnej angiogenezy w HNSCC. Hipoksja, będąca znakiem szczególnym nowotworów, znacząco indukuje sekrecję egzosomów wraz ze wzrostem udziału proteomu proangiogennego. Potencjalne egzosomalowe markery statusu oksygenacji komórek nowotworowych mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie jako nieinwazyjna metoda oceny stanu hipoksji wewnątrz guza, tzw. „płynna biopsja”, a wytypowanie markera wczesnej angiogenezy w HNSCC może umożliwić podjęcie nowych strategii diagnostycznych i terapeutycznych.