

Autoreferat:

1. Imię i nazwisko: Michał Skrzycki

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

- 2000 – dyplom magistra biologii, specjalizacja biologia molekularna, Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii. Tytuł pracy magisterskiej: „Wstępne badania nad systemem izolacji wewnątrzkomórkowych kompleksów białkowych zawierających ParB”

- 2006 – stopień doktora nauk medycznych, specjalizacja biologia medyczna, Warszawski Uniwersytet Medyczny, I Wydział Lekarski. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Izoenzymy dysmutazy ponadtlenkowej w nowotworach przewodu pokarmowego człowieka”

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

- 2000 – 2007 , Warszawski Uniwersytet Medyczny, Katedra i Zakład Biochemii I WL – asystent

- 2007- 2015 Warszawski Uniwersytet Medyczny, Katedra i Zakład Biochemii I WL – adiunkt

- 2016 - 2017 Warszawski Uniwersytet Medyczny, Zakład Biochemii II WL - adiunkt

Przebieg pracy naukowo – badawczej

Studia rozpocząłem w 1994 roku na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Od 3 roku studiów specjalizowałem się w biologii molekularnej. Pracę magisterską „Wstępne badania nad systemem izolacji wewnątrzkomórkowych kompleksów białkowych zawierających ParB” wykonywałem w Instytucie Biologii Eksperymentalnej Roślin UW oraz główną część praktyczną w Zakładzie Biochemii Drobnoustrojów Instytutu Biochemii i Biofizyki PAB w Warszawie pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Jerzmanowskiego i dr Małgorzaty Łobockiej. Głównym celem pracy było opracowanie wydajnej metody oczyszczania bakteryjnego białka ParB, służącej do izolacji oraz identyfikacji białek oddziałujących z ParB podczas aktywnej segregacji plazmidu P1. W wyniku przeprowadzonych badań uzyskałem wektory zawierające gen kodujący białko ParB ze znacznikiem histydynowym, oraz promotor umożliwiający jego nadprodukcję. Wykazałem, że białko ParB ze znacznikiem histydynowym jest aktywne fizjologicznie tylko jeśli znacznik jest dołączony do C-końca białka za pomocą aminokwasowego łącznika. Opracowałem

wydajną metodę oczyszczania białka ParB oraz jego kompleksów ze szczepu bakteryjnego *E.coli*.

Po ukończeniu studiów zostałem zatrudniony w Katedrze i Zakładzie Biochemii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w marcu 2000 roku. Pracę naukową w Zakładzie rozpocząłem od opracowania metody pomiaru aktywności antyoksydacyjnej izoenzymów dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) – cytoplazmatycznego (SOD1) oraz mitochondrialnego (SOD2). Po za tym brałem udział w badaniu właściwości antyoksydacyjnych flawonoidów zawartych w soku cytrusów, winach czerwonych i białych oraz wyizolowanych z *Yucca schidigera* Roezl. Następnie w 2003 roku współpracowałem z Zakładem Immunologii WUM podczas badań nad zwiększeniem potencjału metody fototerapii nowotworów za pomocą inhibitora dysmutazy ponadtlenkowej. Badania wykazały użyteczność inhibitora SOD2 (2-metoksyestradiol) jako wydajnego sposobu leczenia, zdolnego do wzmocnienia skuteczności terapii fotodynamicznej. Wyniki te zostały opublikowane w *Journal of Biological Chemistry*. W kolejnych latach kontynuowałem badania nad aktywnością, poziomem białka oraz regulacją izoenzymów dysmutazy ponadtlenkowej w nowotworach przewodu pokarmowego. Badania miały na celu określenie roli i znaczenia dysmutazy ponadtlenkowej w powstawaniu i rozwoju nowotworów przewodu pokarmowego człowieka a także udziału czynników transkrypcyjnych AP-1 i NF- κ B w regulacji ekspresji genów SOD1 i SOD2 w procesie nowotworowym. Uzyskane wyniki wskazują, że różnice w ekspresji i aktywności izoenzymów SOD oraz ekspresji AP-1 i NF- κ B występują na każdym etapie rozwoju nowotworów przewodu pokarmowego człowieka (zdrowa tkanka – marskość – rak; zdrowa tkanka – guz pierwotny – przerzuty). Ekspresja genów SOD1 i SOD2 zarówno w tkankach zdrowych jak i zmienionych nowotworowo przewodu pokarmowego jest kontrolowana przez czynniki transkrypcyjne AP-1 i NF- κ B. Ich udział w regulacji ekspresji SOD1 i SOD2 jest różny i zależy od zaawansowania procesu nowotworowego. Zwiększone ilości WRT (wolnych rodników tlenowych) w prawidłowych komórkach objętych stanem zapalnym prowadzą do zaburzeń ekspresji izoenzymów SOD i w konsekwencji do utraty kontroli nad procesami proliferacji i apoptozy. Podwyższona ekspresja i aktywność izoenzymów SOD w komórkach zmienionych nowotworowo zapewnia im odpowiedni poziom H_2O_2 , potrzebny do stałej ich proliferacji oraz umożliwia im przetrwanie i funkcjonowanie w warunkach stresu oksydacyjnego.

Dane te wskazują, że izoenzymy SOD pełnią szczególną rolę nie tylko w zapoczątkowaniu zmian nowotworowych w komórkach nabłonka przewodu pokarmowego, ale również w późniejszych etapach rozwoju nowotworu. Wszystkie omówione wyżej badania stały się

podstawą rozprawy doktorskiej: „Izoenzymy dysmutazy ponadtlenkowej w nowotworach przewodu pokarmowego człowieka” obronionej w 2006 roku. Wyniki tych badań zostały opublikowane w takich czasopismach jak *Clinical Biochemistry*, *Acta Biochimica Polonica*, *Central European Journal of Biology*.

4. Wskazanie osiągnięcia o którym mowa w art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

I. Tytuł osiągnięcia naukowego:

Dysmutaza ponadtlenkowa jako element systemu antyoksydacyjnego w rozwoju nowotworów przewodu pokarmowego człowieka

Cykl 10 przedstawionych poniżej publikacji w recenzowanych czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) cytowanych łącznie 100 razy; o sumarycznym współczynniku IF równym 13,358

	IF	Cyt.
1. Skrzycki M , Czeczot H. Superoxide dismutase as potential therapeutic agent. <i>Advances in Clinical and Experimental Medicine</i> . 2007; 16 (4): 561-568.		6
2. Skrzycki M , Ścibior D, Podsiad M, Czeczot H. Activity and protein level of CuZnSOD and MnSOD in benign and malignant liver tumors. <i>Clinical Biochemistry</i> . 2008; 41: 91-96.	1,926	17
3. Ścibior D, Skrzycki M , Podsiad M, Czeczot H. Glutathione level and glutathione – dependent enzymes activities in blood serum of patients with gastrointestinal tract tumors. <i>Clinical Biochemistry</i> . 2008; 41: 852-858.	1,926	48
4. Ścibior-Bentkowska D, Skrzycki M , Podsiad M, Czeczot H. Changes of the glutathione enzymatic redox system in human gastrointestinal tract tumors. <i>Archives of Medical Sciences</i> . 2009; 5 (4): 500-505	1,012	5
5. Skrzycki M , Majewska M, Podsiad M, Czeczot H. Expression and activity of superoxide dismutase in colorectal cancer. <i>Acta Biochimica Polonica</i> . 2009; 56(4): 663-670.	1,262	18
6. Skrzycki M , Majewska M, Czeczot H. Superoxide dismutase mRNA and protein level in human colorectal cancer. <i>Central European Journal of Biology</i> . 2010; 5 (5): 590-599	0,685	3
7. Skrzycki M , Czeczot H. Altered expression level of Signal receptor gene in human colorectal cancer. <i>Journal of Receptors and Signal Transduction</i> . 2013; 33(5): 313-318.	1,611	1
8. Skrzycki M , Czeczot H. Multiple Protective Functions of Signal Receptor. <i>Current Protein and Peptide Science</i> . 2014; 15(8): 798-811.	3,154	2
9. Skrzycki M , Czeczot H, Chrzanowska A, Otto-Ślusarczyk D. Poziom ekspresji izoenzymów dysmutazy ponadtlenkowej w pierwotnych i przerzutowych komórkach raka jelita grubego w hipoksji i normoksji tkankowej/The level of superoxide dismutase expression in primary and metastatic colorectal cancer cells in hypoxia and tissue normoxia. <i>Polski Merkuriusz Lekarski</i> . 2015; 233: 281-286.		0

10. Skrzycki M , Czeczot H, Mielczarek-Puta M, Otto-Ślusarczyk D, Graboń W. Effect of different concentrations of oxygen on expression of sigma 1 receptor and superoxide dismutases in human colon adenocarcinoma cell lines. Journal of Receptors and Signal Transduction. 2017; 37(3): 252-258.	1,782	0
Razem:	13,358	82

Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Obecny stan wiedzy wskazuje, że jedną z istotnych przyczyn powstawania i rozwoju nowotworów przewodu pokarmowego jest stres oksydacyjny. Stany zapalne i zewnętrzne czynniki środowiskowe (antygeny pokarmowe, bakterie, wirusy, grzyby, pasożyty, toksyny), metabolizm etanolu i ksenobiotyków, nadmiar żelaza w diecie sprzyjają powstawaniu dużych ilości wolnych rodników i reaktywnych form tlenu i azotu (RFT, RFA) w komórkach błony śluzowej jelit i żołądka, trzustce, wątrobie. W wyniku uszkodzeń białek, lipidów i DNA może to doprowadzić do transformacji nowotworowej.

Pierwszym z RFT, powstającym w wyniku jednoelektronowej redukcji tlenu jest anionorodnik ponadtlenkowy (O_2^-). Ulega on reakcji dysmutacji do nadtlenu wodoru (H_2O_2), który następnie w reakcji Fentona lub Habera-Weissa zostaje przekształcony do rodnika hydroksylowego ($*HO$). Dalsze reakcje prowadzą do powstania rzadziej występujących RFT oraz reaktywnych form azotu (np. nadtlenuazotynu NOO^-). Wszystkie wymienione związki silnie reagują z molekularnymi komponentami komórki, jednak w mniejszych stężeniach pełnią istotną funkcję wewnątrzkomórkowych przekaźników.

Dysmutaza ponadtlenkowa jako element systemu antyoksydacyjnego

Ilość RFT obecna w komórce zależy zarówno od aktywności enzymów generujących, jak i enzymów je usuwających czyli enzymów antyoksydacyjnych. Dużą rolę odgrywają również drobnocząsteczkowe antyoksydanty, biernie usuwające RFT np. glutation (GSH), tokoferole, witamina C.

W usuwaniu RFT z komórki bierze udział szereg enzymów. Pierwszym, kluczowym enzymem jest dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) przeprowadzająca enzymatyczną reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego do nadtlenu wodoru. W organizmie ludzkim występują 3 izoenzymy SOD: cytoplazmatyczny (CuZnSOD; SOD1 –miedziowo- cynkowy), mitochondrialny (MnSOD; SOD2 – manganowy) i zewnątrzkomórkowy (ECSOD).

Produkt reakcji dysmutazy - nadtlenek wodoru jest rozkładany w dwojaki sposób: przy dużych stężeniach przez katalazę (CAT), przy mniejszych przez peroksydazę glutationową zależną od selenu (SeGSHPx). Obydwie reakcje prowadzą do powstania wody, jednak peroksydaza glutationowa jako kofaktora reakcji używa glutationu. Enzym ten należy do grupy tzw. enzymów zależnych od glutationu. W jej skład wchodzi również druga peroksydaza glutationowa niezależna od selenu (GSHPx) usuwająca nadtlarki organiczne, transferaza glutationowa (GST) sprzęgająca toksyny i ksenobiotyki z glutationem oraz reduktaza glutationowa (GR) regenerująca utleniony glutation. Nadmiar metali przejściowych katalizujących reakcje Fentona i Habera-Weissa jest usuwany przez enzymy chelatujące zwane metalotioneinami.

Zaburzenie równowagi pomiędzy powstawaniem a generowaniem reaktywnych form tlenu prowadzi do stresu oksydacyjnego. Długotrwały stan stresu oksydacyjnego jest przyczyną zaburzeń w metabolizmie komórkowym, które związane są z uszkodzeniami wywołanymi działaniem RFT. Stwarza to niebezpieczeństwo wywołania trwałych zmian w strukturze ważnych biologicznie makrocząsteczek obecnych w komórkach (białkach, lipidach, DNA, cukrach i innych). Utrata aktywności niektórych białek, zmiany płynności błon lipidowych, mutacje i uszkodzenia kwasów nukleinowych to najczęstsze konsekwencje działania RFT w prawidłowych i neoplastycznych komórkach.

Najważniejszymi markerami stresu oksydacyjnego w organizmie jest poziom peroksydacji lipidów oraz stężenie glutationu. Peroksydacja lipidów jest łańcuchem reakcji zachodzących w błonach komórkowych pod wpływem O_2^- lub/i HO^* . Końcowe produkty tego procesu (np. aldehyd dimalonowy, 4-hydroksynonenal) są bardzo reaktywnymi związkami, które charakteryzują się dłuższym czasem półtrwania niż reaktywne formy tlenu oraz zdolnością do dyfuzji z miejsc ich powstawania do odległych obszarów komórki. Glutation jest najpowszechniejszym, drobnocząsteczkowym antyoksydantem. Stan redoks glutationu jest fizjologicznie utrzymywany przez aktywność enzymów zmniejszających (GSHPx, GST) i uzupełniających (GR) jego stężenie. Glutation i zależne od niego enzymy pełnią kluczową rolę w detoksyfikacji nadtlarków, wodoronadtlenków, ksenobiotyków i leków.

Badania rozpocząłem od wykazania w pracy nr 3 znacząco podwyższonego poziomu peroksydacji lipidów w surowicy chorych oraz zaburzeń poziomu GSH i aktywności enzymów glutationozależnych. Rak żołądka charakteryzował się najwyższym poziomem peroksydacji lipidów, natomiast rak wątroby najniższym. W raku jelita grubego oraz jego przerzutach do wątroby poziom peroksydacji lipidów był również podwyższony. Rezultaty

otrzymane w tej pracy wskazują na stres oksydacyjny towarzyszący chorobom nowotworowym przewodu pokarmowego. Ważnym rezultatem jest wykazanie, że zwiększona peroksydacja lipidów jest charakterystyczna dla wszystkich badanych surowic krwi chorych z nowotworami przewodu pokarmowego. Jednakże, nie wykazano tego samego typu zmian w poziomie GSH i aktywności enzymów GSH-zależnych. Nie jest jasne czy zaburzenia statusu GSH w krążeniu chorych z nowotworami przewodu pokarmowego są jedną z przyczyn raka, czy tylko jedną z konsekwencji choroby nowotworowej.

Adaptacja komórek nowotworowych do stresu oksydacyjnego może również polegać na modyfikacji własnych systemów antyoksydacyjnych. Dlatego też w kolejnych pracach skupiłem się na badaniu aktywności i ekspresji enzymów antyoksydacyjnych (w szczególności dysmutazy ponadtlenkowej – kluczowego enzymu antyoksydacyjnego) w różnych stadiach rozwoju nowotworów. W pracy nr 4 opublikowałem wyniki dotyczące poziomu zredukowanego glutationu oraz aktywności enzymów zależnych od glutationu (GSHPx, GST, GSHR) w zmienionych nowotworowo tkankach pochodzących z różnych typów nowotworów przewodu pokarmowego. Zaobserwowałem znaczące zmiany aktywności enzymów glutationozależnych i poziomu glutationu w raku żołądka, łagodnym i złośliwym raku wątroby (HCC), pierwotnym raku jelita grubego i w przerzutach raka jelita grubego do wątroby.

Uzyskane wyniki wskazują na zaburzenie działania systemu antyoksydacyjnego opartego na glutationie w nowotworach przewodu pokarmowego. Jest to prawdopodobnie wynikiem nadmiernej produkcji RFT w komórkach nowotworowych. Zmiany w poziomie GSH i aktywności enzymów GSH-zależnych w nowotworach przewodu pokarmowego są odbiciem zmian w pojemności detoksykacyjnej, co może działać jako mechanizm adaptacyjny komórek nowotworowych do warunków stresu oksydacyjnego. Jednak pierwszą linią obrony przed stresem oksydacyjnym są izoenzymy SOD i to od nich zależy reakcja innych enzymów na dalsze pochodne anionorodnika ponadtlenkowego.

Dlatego praca nr 2 miała na celu określenie zmian aktywności i poziomu białka izoenzymów dysmutazy ponadtlenkowej (SOD1 i SOD2) w raku wątroby. Zastosowany model badawczy w układzie wątroba marska (stadium przedrakowe) – nowotwór łagodny – nowotwór złośliwy wątroby, pozwolił odpowiedzieć na pytanie czy poziom enzymów antyoksydacyjnych zależy od stopnia rozwoju nowotworu.

Otrzymane wyniki jasno pokazały, że jest to słuszne założenie i pozwoliły mi na nowatorskie spojrzenie na rolę SOD1 i SOD2 w rozwoju nowotworów wątroby.

Aktywność SOD różniła się zarówno w zależności od stadium nowotworu jak i w zależności od swojej lokalizacji komórkowej. W przypadku izoenzymu cytoplazmatycznego, jego aktywność była istotnie obniżona w wątrobie marskiej oraz w łagodnych nowotworach wątroby, ale podwyższona w złośliwych. Z kolei aktywność enzymu mitochondrialnego prawie nie zmieniała się w wątrobie marskiej, za to była podwyższona zarówno w guzach łagodnych jak i złośliwych wątroby. Natomiast poziom białka izoenzymów SOD był obniżony we wszystkich badanych tkankach w przypadku SOD1, a w przypadku SOD2 podwyższony za wyjątkiem łagodnych nowotworów wątroby. Niska aktywność SOD w marskiej wątrobie prowadzi do akumulacji RFT, co może być przyczyną uszkodzeń oksydacyjnych w hepatocytach. Prowadzi to do kaskady zdarzeń rozpoczynającej się od stanu zapalnego, dalszego nasilenia stresu oksydacyjnego, wywołanych nim uszkodzeń białek oraz mutacji, następnie do zaburzonego funkcjonowania genów i szlaków sygnałowych powodującego zwiększenie tempa proliferacji komórek, a w końcu w wyniku postępujących uszkodzeń struktur komórkowych do transformacji nowotworowej. Zupełnie odwrotna sytuacja w złośliwym raku wątroby (podwyższona aktywność i poziom białka SOD) może wskazywać na dwukierunkowe skutki: z jednej strony wysoka aktywność SOD powoduje generację dużych ilości nadtlenu wodoru, który jest aktywatorem wielu ścieżek sygnałowych (w szczególności odpowiedzialnych za proliferację komórek), natomiast z drugiej strony komórki rakowe z podwyższoną aktywnością dysmutazy ponadtlenkowej są bardziej odporne na stres oksydacyjny towarzyszący chorobie nowotworowej. Dysmutaza ponadtlenkowa utrzymując równowagę pomiędzy usuwaniem O_2^- a powstawaniem H_2O_2 , chroni komórki nowotworowe przed toksycznym działaniem RFT, a jednocześnie zapewnia warunki pozwalające na ich zwiększoną proliferację. Dlatego, zaburzenia tej równowagi mogą decydować o tym czy komórki nowotworowe rozwijają się powoli i ewentualnie zachodzi w nich apoptoza, czy też wzrasta ich tempo proliferacji, zwiększając ich złośliwość. Otrzymane wyniki jasno wskazują na efektywną ochronę złośliwego raka przed stresem oksydacyjnym, pozwalając na jego rozwój w niesprzyjających warunkach (nadmiar reaktywnych form tlenu).

W odróżnieniu od guzów złośliwych, w raku łagodnym wątroby po raz pierwszy zaobserwowałem kompensacyjne działanie izoenzymów SOD (obniżony poziom SOD1 vs podwyższony SOD2). Takie działanie umożliwia utrzymanie równowagi oksydant-antyoksydant w komórkach łagodnego raka wątroby. Komórki ze zrównoważonym stanem redoks, charakteryzują się niskim tempem proliferacji. Może to być jedną z przyczyn, dla których raki łagodne rozwijają się wolno a choroba z nimi związana ma łagodny przebieg.

Porównanie aktywności i ekspresji białka izoenzymów SOD pomiędzy łagodnymi a złośliwymi rakami wątroby wykazało, że oba parametry były wyższe w rakach złośliwych. Podwyższenie aktywności i poziomu białka SOD1 i SOD2 w rakach złośliwych wątroby, powyżej poziomu właściwego dla normalnych komórek wskazuje na ich lepszą obronę przed stresem oksydacyjnym w porównaniu do raków łagodnych wątroby. Uzyskane wyniki wskazują, że w nowotworach wątroby, niektóre mechanizmy antyoksydacyjne działają sprawniej, szczególnie w przypadku raków złośliwych. Wydaje się, że złośliwość nowotworu zależy od statusu redoks komórki, który z kolei jest w dużym stopniu kontrolowany przez dysmutazę ponadtlenkową.

Na podstawie uzyskanych dotychczas wyników sformułowałem roboczą hipotezę, głosząca, że poziom enzymów antyoksydacyjnych jest związany ze stopniem rozwoju nowotworu. W tym celu podjąłem badania nad nowotworami jelita grubego. Jest to stosunkowo dobrze opisany nowotwór o wyraźnie sklasyfikowanych stadiach jego rozwoju klinicznego i stopniach zróżnicowania komórek. Dlatego też, wyniki uzyskane w przypadku tego typu nowotworu mogą dać najpełniejszą odpowiedź na badany problem. W pracy 5 zbadałem aktywność i poziom białka izoenzymów SOD oraz dla odniesienia do stresu oksydacyjnego poziom peroksydacji lipidów. Badania prowadzono w guzie pierwotnym jelita grubego, w którym wyróżnia się 4 kliniczne stadia zaawansowania nowotworu (UICC - według klasyfikacji TNM) oraz 3 stopnie dojrzałości/zróżnicowania komórek nowotworowych (G). Aktywność oraz poziom białka izoenzymów SOD zmieniały się w zależności od stadium zaawansowania klinicznego oraz stopnia dojrzałości nowotworu. Otrzymane wyniki wskazują na stres oksydacyjny w początkowych stadiach zaawansowania klinicznego i zróżnicowania raka jelita grubego. Natomiast w kolejnych stadiach rozwoju nowotworu (zarówno UICC II-IV jak i G₂-G₃) poziom stresu oksydacyjnego był wyraźnie niższy. Wydaje się, że stres oksydacyjny w początkowych stadiach rozwoju nowotworu może być wynikiem stanu zapalnego towarzyszącego chorobie nowotworowej. Stres oksydacyjny może być uważany za rodzaj presji selekcyjnej, toteż tylko te komórki rakowe, które się do niego przystosują będą zdolne do przejścia w kolejne stadia rozwoju. Może to wyjaśniać obserwowany niski poziom peroksydacji lipidów w kolejnych stadiach rozwoju raka jelita grubego.

Podczas całego rozwoju raka jelita grubego, komórki nowotworowe mają stały poziom obrony antyoksydacyjnej zapewniony przez aktywność SOD1 w cytozolu.

Natomiast aktywność enzymu mitochondrialnego – SOD2 – różniła się znacząco w kolejnych stadiach UICC, ale prawie nie zmieniała się ze względu na stopień zróżnicowania. Wyniki te wskazują, że zmiany aktywności SOD2 w rozwoju raka jelita grubego mają wyraźnie cykliczny charakter, to jest: obniża się ona w stadium I, następnie podwyższa w stadium II, obniża w stadium III i ponownie podwyższa się w stadium IV. Czynnikiem, który może wywoływać takie wahania aktywności SOD2, może być jego produkt reakcji – nadtlenuk wodoru, który na zasadzie sprzężenia zwrotnego hamuje aktywność SOD2. Z kolei poziom białka SOD2 w kolejnych stadiach zróżnicowania raka jelita grubego również zmieniał się w sposób cykliczny. G₁ – podwyższenie, G₂ – obniżenie, G₃ - ponownie podwyższenie. Jednakże aktywność SOD2 pozostawała na podobnym poziomie. Wydaje się, że inhibicja przez nadtlenuk wodoru zachodzi również w przypadku SOD1, ale podczas gdy progresja raka jelita grubego w kolejnych stadiach klinicznego zaawansowania wywołuje stan zapalny i stres oksydacyjny z powodu przerastania ściany jelita, to zróżnicowanie jest zmianą histologii i morfologii komórek i nie wpływa na stan redox komórki. Dlatego też, zmiany poziomu białka SOD podczas zróżnicowania mogą być tylko wtórnym zjawiskiem zależnym od działania czynników transkrypcyjnych, które równocześnie kontrolują ekspresję SOD i biorą udział w regulacji różnicowania komórek.

Poziom białka i aktywność izoenzymów SOD wyraźnie zmieniają się w kolejnych stadiach zaawansowania klinicznego i stopniach zróżnicowania raka jelita grubego. Zmiany te wydają się być przede wszystkim zależne od stopnia klinicznego zaawansowania raka jelita grubego. Nie jest jasne czy zmiany poziomu SOD są bezpośrednio związane z procesem różnicowania komórek. Wyniki te wskazują również, że zmiany poziomu białka i aktywności izoenzymów SOD, mogą być odpowiedzią adaptacyjną na stres oksydacyjny pojawiający się w trakcie rozwoju raka jelita grubego.

Uzyskane w pracy 5 wyniki w pełni potwierdziły założenia hipotezy roboczej, co pozwoliło na zwrócenie uwagi środowisku naukowemu na problem zmian jakie zachodzą w metabolizmie enzymów antyoksydacyjnych podczas rozwoju guza nowotworowego.

Ponieważ adaptacja do stresu oksydacyjnego wymaga uruchomienia w komórkach odpowiednich szlaków sygnałowych, które z kolei wpłyną na aktywację transkrypcji genów kodujących enzymy antyoksydacyjne, w kolejnej opublikowanej pracy (nr 6) zbadałem ekspresję izoenzymów SOD zarówno na poziomie białka jak i mRNA w raku jelita grubego. Otrzymane wyniki wyraźnie wskazują, że podwyższony poziom białka SOD1 i SOD2 w początkowych stadiach rozwoju raka jelita grubego zapewnia efektywną obronę przed stresem oksydacyjnym wywołanym stanem zapalnym. Natomiast obniżony poziom białka

izoenzymów SOD w stadium III UICC wskazuje na osłabioną obronę oksydacyjną komórek nowotworowych, co prowadzi do bardziej utleniającego środowiska i w konsekwencji do większej częstości mutacji. Pozwalałoby to na zmiany fenotypu komórek nowotworowych niezbędne do dalszego rozwoju raka. W stadium IV UICC, różnice w poziomie białka SOD1 i SOD2 mogą wskazywać na próbę ograniczenia poziomu RFT w mitochondriach by nie dopuścić do uruchomienia procesu apoptozy, lecz jednocześnie utrzymać utleniające środowisko w cytoplazmie niezbędne do proliferacji i powodujące genetyczną niestabilność.

Końcowym stadium rozwoju złośliwego raka są przerzuty. W pracy nr 6 uwzględniłem grupę pacjentów z metachronicznymi przerzutami raka jelita grubego do wątroby. Obserwowany poziom białka izoenzymów SOD wyraźnie wskazuje na adaptację komórek nowotworowych do środowiska wątroby. Metabolizm wątroby generuje duże ilości RFT, na skutek działania cytochromu P450, dlatego komórki nowotworowe zasiedlające wątrobę muszą chronić swą cytoplazmę, co potwierdza wysoki poziom SOD1 zaobserwowany w przerzutach.

Uzyskane wyniki dla poziomu mRNA izoenzymów SOD we wszystkich klinicznych stadiach rozwoju raka jelita grubego, wskazują na jego odwrotną relację do poziomu białka izoenzymów SOD. Wyjaśnieniem takiej rozbieżności może być regulacja izoenzymów SOD na poziomie potranskrypcyjnym. Według danych literaturowych podwyższenie poziomu mRNA może wskazywać na potranskrypcyjną redukcję poziomu białka SOD i aktywację transkrypcji przez stres oksydacyjny. Różnice między poziomem białka a mRNA izoenzymów SOD mogą zależeć od zmian w stanie redox komórki w warunkach takich jak hipoksja, anoksja i stres oksydacyjny (każdy z tych stanów występuje podczas rozwoju guza nowotworowego).

Wyniki uzyskane w pracy 5 i 6 stanowiły dla mnie podstawę do wyciągnięcia kluczowych i nowatorskich wniosków:

Ekspresja genów dysmutazy ponadtlenkowej wydaje się być regulowana na co najmniej dwóch poziomach: transkrypcyjnym i potranskrypcyjnym. Natomiast sygnały wewnątrzkomórkowe aktywujące każdy z tych poziomów wydają się być różne, zależne od endogennych warunków komórki. Izoenzymy SOD uczestniczą w utrzymaniu równowagi pomiędzy generacją i usuwaniem RFT w komórkach i mogą być jednym z kluczowych czynników decydujących o apoptozie, bądź przetrwaniu populacji komórek nowotworowych. Wydaje się, że określenie tylko aktywności, czy poziomu białka izoenzymów SOD może nie być wystarczające do pełnej oceny potencjału adaptacyjnego komórek nowotworowych do stresu oksydacyjnego. Wysoki poziom mRNA może działać jak ukryta rezerwa, zdolna

wygenerować dodatkową ilość enzymu w odpowiedzi na stres oksydacyjny, natomiast niski poziom mRNA SOD może być reakcją na podwyższone stężenie nadtlenu wodoru, w celu ograniczenia jego proapoptotycznego działania.

Przeprowadzone badania ujawniły, że komórki nowotworowe przystosowują się do stresu oksydacyjnego regulując poziom mRNA i białka izoenzymów SOD. Jednakże, komórki nowotworowe utrzymują podwyższony poziom RFT, niezbędny do ich ciągłej proliferacji i pełniący istotną rolę w zapewnieniu środowiska sprzyjającego genetycznej niestabilności. W tym celu synteza i aktywność izoenzymów SOD musi być regulowana niezwykle precyzyjnie i wielopoziomowo.

Czynnikiem mogącym znacząco wpływać na regulację ekspresji izoenzymów SOD wydaje się być wewnątrzkomórkowy receptor Sigma 1 (Sig1R). Ostatnie doniesienia naukowe wskazują na jego niezwykle ważną rolę w metabolizmie komórki. Jest to białko zlokalizowane na błonie siateczki endoplazmatycznej, gdzie wiąże się z receptorami IP3 oraz ankiryną. Receptor Sigma1 bierze udział w licznych procesach:

- reguluje funkcjonowanie kanałów jonowych dla wapnia, potasu, sodu, chloru
- hamuje aktywację syntazy tlenu azotu
- pełni funkcję białka chaperonowego
- może być receptorem stresu komórkowego
- wpływa na apoptozę i proliferację komórek poprzez regulację funkcjonowania ścieżek sygnałowych dla kinaz Akt i ERK.

W świetle uzyskanych przeze mnie wyników, badania naukowe wskazujące na podwyższony poziom ekspresji receptora Sigma 1 w różnych typach nowotworów (piersi, prostaty, płuc, czerniaku, gliomie), mogą mieć istotne znaczenie dla regulacji ekspresji izoenzymów SOD. Podwyższony poziom Sig1R zmienia funkcjonowanie ścieżek Akt i ERK. Ścieżka Akt aktywuje czynnik transkrypcyjny NFκB, natomiast ścieżka ERK czynnik transkrypcyjny c-Fos (podjednostka AP-1). Obydwa te czynniki biorą bezpośredni udział w regulacji transkrypcji wszystkich izoenzymów SOD. Dodatkowo, aktywność receptora Sigma1 może się zmieniać w zależności od obecności RFT w komórce, oraz może on bezpośrednio wpływać na ilość białka NFκB.

Dotychczas nie badano powiązań pomiędzy receptorem Sig1R a poziomem izoenzymów dysmutazy ponadtlekowej. Zatem kolejnym celem badawczym i kontynuacją poprzednich była ocena, czy zmiany poziomu Sig1R będą w jakiś sposób powiązane ze stresem oksydacyjnym i poziomem transkrypcji genów izoenzymów SOD w nowotworach.

Pierwszym zadaniem było sprawdzenie, w jaki sposób ekspresja Sig1R zmienia się w raku jelita grubego. W pracy nr 7 opublikowano wyniki badań dotyczących poziomu ekspresji Sig1R w raku jelita grubego i przerzutach do wątroby w różnych stadiach rozwoju nowotworu. Zgodnie z danymi literaturowymi zaobserwowano podwyższony poziom Sig1R w raku jelita grubego a także w przerzutach. Niemniej były to jedyne dane literaturowe na ten temat dostępne w tym czasie. W związku z tym wykonałem a następnie po raz pierwszy opublikowałem w pracy 7 pogłębioną analizę poziomu ekspresji Sig1R, biorąc pod uwagę takie czynniki jak kliniczne zaawansowanie nowotworu (UICC), lokalizację guza w poszczególnych odcinkach jelita oraz wiek pacjentów. Najwyższy poziom ekspresji receptora Sigma1 obserwowano w III stadium UICC. Używając testu ANOVA wykryto także znaczące interakcje pomiędzy stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu i lokalizacją guza a poziomem ekspresji Sig1R. Nie było interakcji pomiędzy poziomem mRNA Sig1R a stopniem UICC i wiekiem pacjentów, jednak obserwowano znaczące obniżenie ekspresji Sig1R u starszych pacjentów. Wydaje się, że stopień zaawansowania klinicznego, lokalizacja guza w jelicie oraz wiek mają istotny wpływ na ekspresję receptora Sigma1. Prawdopodobnie wynika to z dwójakiej natury tego receptora: w określonych warunkach może działać pro- lub antyapoptotycznie. Takie działanie może być wynikiem aktywności receptora Sigma1 zależnej od jego poziomu ekspresji.

Porównawcza analiza statystyczna wyników z przedstawionych prac 6 i 7 wykazała że profil ekspresji wszystkich badanych białek (SigR1, SOD1 i SOD2) istotnie zależy od stopnia rozwoju nowotworu (UICC) i jest znacząco różny w każdym odcinku jelita. Może to wskazywać na istnienie powiązań pomiędzy ekspresją tych 3 białek w chorobie nowotworowej (dane nieopublikowane).

Otwiera to zupełnie nową perspektywę badań nad związkiem receptora Sigma1, reaktywnych form tlenu i enzymów antyoksydacyjnych w powstawaniu i rozwoju nowotworów.

W pracach 9 i 10 zbadałem zmiany ekspresji Sig1R oraz izoenzymów SOD na modelu *in vitro* stworzonym z Zakładzie Biochemii I WL, obrazującym różne stężenia tlenu występujące podczas rozwoju guza nowotworowego - hipoksję, normoksję tkankową, oraz normoksję atmosferyczną (w tych warunkach prowadzona jest większość badań na liniach komórkowych).

Zróżnicowana dostępność tlenu znacząco wpływała na poziom ekspresji wszystkich badanych parametrów, szczególnie SOD2 i Sig1R. Również typ badanej linii komórkowej (rak pierwotny, komórki przerzutowe) miał wpływ przede wszystkim na ekspresję Sig1R.

Wykazałem za pomocą analizy statystycznej silne zależności pomiędzy poziomem ekspresji Sig1R, SOD2 a przeżywalnością komórek w warunkach hipoksji (1% tlenu). Wskazuje to na ochronną rolę jaką pełnią Sig1R i SOD2 w mitochondriach. Związane to jest z regulacją poziomu jonów wapnia w komórce i ich napływu do mitochondriów poprzez kanały jonowe regulowane przez Sig1R i stres oksydacyjny.

Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują na rolę mitochondriów jako głównej organelli umożliwiającej komórkom nowotworowym przeżycie w warunkach stresu oksydacyjnego i hipoksji.

Zarówno zastosowany w pracach 9 i 10 model badawczy jak i uzyskane dzięki niemu wyniki po raz pierwszy pokazują jak warunki tlenowe, które realnie panują w środowisku guza nowotworowego wpływają na mechanizmy chroniące komórki przed stresem oksydacyjnym.

Podsumowanie:

1. Stres oksydacyjny towarzyszy chorobie nowotworowej
 - + występował w przypadku wszystkich badanych typów nowotworów
 - + jest ogólnoustrojowy (surowica, tkanki)
 - + powodował zmiany w aktywności enzymów antyoksydacyjnych , szczególnie SOD oraz w poziomie drobnocząsteczkowych antyoksydantów (GSH)
2. Aktywność i poziom białka, kluczowego enzymu antyoksydacyjnego – dysmutazy ponadtlenkowej była różna w zależności od lokalizacji w komórce (SOD1 i SOD2) i rodzaju guza (łagodny – złośliwy), a także w stadium przedrakowym (marska wątroba)
3. Ekspresja izoenzymów dysmutazy ponadtlenkowej (SOD1 i SOD2) zmienia się wraz z kolejnymi stadiami rozwoju nowotworu . Korelacja ta zachodzi zarówno na etapie transkrypcji jak i translacji genów SOD.
4. Na ekspresję izoenzymów SOD wpływa zarówno stres oksydacyjny jak i zaawansowanie choroby nowotworowej.
5. Poziom ekspresji genów izoenzymów SOD ma istotne znaczenie dla adaptacji komórek nowotworowych do stresu oksydacyjnego i co za tym idzie dla progresji choroby nowotworowej.
6. Receptor Sigma 1 (białko reagujące na stres) może wpływać na zmiany ekspresji izoenzymów SOD w kolejnych stadiach rozwoju nowotworu (UICC) i różnych odcinkach jelita (okrężnica, esica, odbytnica)

7. Zmiany ekspresji izoenzymów SOD oraz Sig1R wskazują na mitochondria jako główny kompartment pozwalający komórkom nowotworowym na adaptację do stresu oksydacyjnego.

W przyszłości zamierzam kontynuować badania nad związkiem stresu oksydacyjnego i receptora Sigma 1 z chorobą nowotworową. Na podstawie dotychczas uzyskanych wyników, temat badań zostanie poszerzony o możliwe zastosowanie ligandów Sig1R wraz z induktorami stresu oksydacyjnego (oraz innych) w celu efektywnego i selektywnego niszczenia komórek nowotworowych. W dłuższej perspektywie czasowej, może to znaleźć przełożenie na badania kliniczne nad lekami przeciwnowotworowymi opartymi o ligandy Sig1R.

5. Inne osiągnięcia naukowe:

OMÓWIENIE INNYCH PRAC NAUKOWO-BADAWCZYCH NIE WLICZANYCH DO OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO STANOWIĄCEGO MONOTEMATYCZNY CYKL PUBLIKACJI

Oprócz głównego kierunku prowadzonych przeze mnie badań, uczestniczyłem również w innych projektach realizowanych w Katedrze i Zakładzie Biochemii. Po uzyskaniu stopnia doktora współpracowałem z zespołem prof. dr.hab I. Rahden-Staroń w badaniach dotyczących toksyczności i wpływu fungicydów (Tiuram, Disulfiram, Maneb, Zineb) na system antyoksydacyjny komórek linii V79 chomika chińskiego oraz ochronnego wpływu N-acetylocysteiny. Wykazaliśmy silną indukcję apoptozy w komórkach narażonych na działanie badanych fungicydów oraz wywołane nimi znaczące zaburzenia aktywności enzymów antyoksydacyjnych (SOD, GPx, GST, GR, CAT) i poziomu markerów stresu oksydacyjnego (GSH/GSSG, peroksydacji lipidów, karbonylowanych białek). Wyniki zostały opublikowane w cyklu prac naukowych (prace nr 15, 17, 26, 30). Podobnym kierunkiem badań, w których uczestniczyłem było określenie wpływu kadmu na system antyoksydacyjny w izolowanych hepatocytach szczura. Były to badania wykonywane we współpracy z zespołem prof. dr. hab M. Wiechetek (SGGW). Wykazaliśmy, że zmiany w funkcjonowaniu systemu antyoksydacyjnego związane są bezpośrednio z dawką oraz czasem ekspozycji hepatocytów na kadm. Otrzymane wyniki wyraźnie wskazują na stres oksydacyjny indukowany przez kadm w wyniku zaburzenia aktywności enzymów antyoksydacyjnych (prace nr 18, 22). Kontynuując temat badawczy rozpoczęty przed doktoratem, brałem udział w oznaczaniu potencjału antyoksydacyjnego wybranych flawonoidów *in vitro* (kwercetyny, ramnetyny, izoramnetyny, luteoliny). Oznaczono ich aktywność antyoksydacyjną wobec anionorodnika ponadtlenkowego, rodnika hydroksylowego, nadtlenu wodoru. Określono również ich zdolność do chelatowania metali przejściowych (Fe, Cu), oraz potencjał antymutageny. Wyniki zostały opublikowane w pracach 23 i 24. Interesującymi badaniami, w których uczestniczyłem, okazały się badania nad mechanizmami obrony antyoksydacyjnej w relacji pasożyt-gospodarz. Były one prowadzone we współpracy z Zakładem Biologii Ogólnej i Parazytologii, na modelu doświadczalnym wykorzystującym tasiemca *Hymenolepis diminuta* pasożytującego w jelicie szczura. Wykazaliśmy, że zarówno gospodarz jak i pasożyt są narażeni na stres oksydacyjny spowodowany stanem zapalnym

związany z zakażeniem. Cenną obserwacją było udowodnienie, że pasożyt może zaadoptować się do stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego dzięki zwiększeniu aktywności swoistych dla niego enzymów antyoksydacyjnych. Wyniki tych badań zostały opublikowane w 4 pracach naukowych (prace nr 26-29).

Dodatkowo, przez cały okres mojego zatrudnienia kontynuowałem badania nad rolą systemu antyoksydacyjnego w nowotworach przewodu pokarmowego człowieka, co zaowocowało cyklem publikacji naukowych (oryginalnych i poglądowych), jak również zostało wykorzystane do podbudowania wniosków płynących z badań nad dysmutazą ponadtlenkową.

Michal Skonieczki