Dr hab. Martyna Elas
Zakład Biofizyki WBBiB UJ

UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Piwowarczyk
pt.: „Model niszy metastatycznej *in vitro* w badaniach mechanizmów inwazji komórek raka prostaty"

Wydział
Biochemii,
Biofizyki i
Biotechnologii

Zakład Biofizyki

Większość pacjentów nowotworowych umiera z powodu przerzutów. Bardzo inwazyjnym nowotworem jest rak prostaty, obecnie druga przyczyna śmiertelności z powodu nowotworów u mężczyzn zarówno w Polsce, jak i w wielu krajach zachodnich. Opanowanie wzrostu guza pierwotnego jest osiągalne na drodze chirurgii, czy radioterapii, a także ablacji hormonalnej, czy chemoterapii. Podobnie jak w przypadku innych typów nowotworów, leczenie przerzutów jest jednak nieskuteczne i stanowi o wysokiej śmiertelności pacjentów. Badanie mechanizmów inwazji komórek raka prostaty może przyczynić się do znalezienia skutecznych metod zapobiegania ich powstawaniu oraz leczenia. Praca pani mgr Piwowarczyk dotyczy właśnie tych ważnych zagadnień.

Rozprawę otwiera Wstęp, w którym Autorka omawia kaskadę metastatyczną, strategie inwazji nowotworowej, rolę mikrośrodowiska guza, a także rolę śródbłonka w progresji nowotworu. Następnie zamieszczono opis niszy metastatycznej wraz z procesem diapedezy i wreszcie budowę i funkcję koneksyn. Wstęp kończy krótka charakterystyka przeciwnowotworowego działania fenofibratu. Ta część pracy jest napisana w sposób kompetentny i jest świetnym wprowadzeniem w cześć doświadczalną rozprawy.

Jako cel badań będących podstawą rozprawy doktorskiej mgr Katarzyna Piwowarczyk postawiła sobie badanie mechanizmów przejścia komórek raka prostaty przez ścianę naczyń, ze szczególnym uwzględnieniem roli koneksyny 43 i roli mobilizacji komórek śródbłonka w tym procesie. W sformułowaniu celów szczegółowych nieco przeszkadza brak ich uporządkowania, tzn. umieszczenie celów metodycznych (np. „3. Zbadać przydatność modelu niszy metastatycznej do analiz różnorodności mechanizmów diapedezy) pomiędzy

ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków
tel. +48(12) 664 60 02
fax +48(12) 664 69 02
email: sekretariat.zbiofiz@uj.edu.pl

pozostałymi, dotyczącymi zarówno śródbłonka, jak i komórek nowotworowych.

Materiały i metody opisane są krótko, ale wystarczająco szczegółowo. Wśród metod zastosowanych w badaniach Autorka użyła przede wszystkim pomiarów ruchliwości komórek, wielu różnych technik mikroskopowych, całego szeregu technik biologii molekularnej, a także mikroskopii sił atomowych do badania elastyczności komórek. Na uznanie zasługuje zastosowanie wizualizacji etapów diapedezy komórek przy pomocy mikroskopu konfokalnego, a także ilościowej analizy diapedezy. Bardzo podobają mi się rysunki ilustrujące te techniki. W sumie szeroki arsenał metod pozwala na uzyskanie w miarę pełnego obrazu oddziaływań międzykomórkowych w badanym modelu niszy metastatycznej.

Wyniki przedstawiono na 34 złożonych rycinach, wszystkie opatrzono bardzo szczegółowymi podpisami. Ogrom pracy włożonej w uzyskanie tych wyników robi duże wrażenie. Autorka zaczyna od opisu działania modelu niszy metastatycznej, przedstawiając aktywność migracyjną komórek śródbłonka i zmiany w cytoszkielecie aktynowym zachodzące podczas diapedezy. Następnie przechodzi do charakterystyki wymiany informacji w modelu poprzez oddziaływania parakrynne. Kolejny podrozdział poświęcony jest funkcjom koneksyny Cx43 w diapedezie komórek raka prostaty, zarówno kanałowo-zależnym, jak i tym niezależnym od GJIC (gap junctional intercellular communication, komunikacja przez złącza szczelinowe). Oddzielną część wyników stanowi przedstawienie ekspresji Cx43 w śródbłonku i jej roli w badanych zjawiskach.

Spośród wielu oryginalnych, interesujących wyników chciałabym wymienić badanie wpływu wyciszenia ekspresji Cx43 w komórkach DU-145 na wydajność ich diapedezy (V.3.3), gdzie otrzymano zahamowanie ruchliwości śródbłonka oraz wykazanie zwiększonej efektywności diapedezy komórek nowotworowych podczas drugiego z kolei kontaktu z komórkami śródbłonka (V.4.4). Na uwagę zasługuje pomysł zastosowania fenofibratu, znanego preparatu modulującego własności śródbłonka, a także proces przerzutowania, w badanym modelu. Otrzymany rezultat wskazujący na uszczelnienie

śródbłonka pod wpływem fenofibratu, a co za tym idzie, także zahamowanie diapedezy komórek nowotworowych ma duże znaczenie zarówno poznawcze, jak i praktyczne.

Nieco zastanawia użycie linii ludzkiego pochodzenia HUVEC zarówno w przypadku ludzkich, jak i szczurzych linii nowotworowych. Wydaje się także, że linie komórek śródbłonka z mikronaczyń guza nowotworowego, np. HMEC-1, byłyby bardziej odpowiednie.

Dający do myślenia jest wynik opisany na Ryc. 34, dotyczący roli RFT w działaniu fenofibratu na mobilizację komórek śródbłonka, gdzie po zastosowaniu N-acetylocysteiny w układzie widać wzrost, a nie jak się spodziewano eliminację RFT. Autorka interpretuje ten wynik z ostrożnością, omawia go też w Dyskusji zwracając uwagę na możliwe przyczyny tego zjawiska, ale nie wspomina przy tej okazji o zastosowanej technice pomiaru RFT, która także może mieć wpływ na uzyskany wynik [Bartosz, Clin Chim Acta. 2006, 368(1-2):53-76].

Na uwagę zasługuje płynność czytania pracy, zwłaszcza rozdziału V. Zdania łączące poszczególne sekcje tego rozdziału prowadzą czytelnika przez gąszcz wyników za wyraźnie sformułowaną myślą przewodnią, a kolejne kroki eksperymentalne wynikają z poprzednich, co powoduje że treść układa się w bardzo logiczną i przekonującą całość.

Bardzo podoba mi się dojrzała Dyskusja pracy, podzielona na podrozdziały, w których w sposób bardzo staranny przedstawiono uzyskane wyniki w kontekście danych literaturowych. Autorka omawia najpierw mobilizację śródbłonka przez komórki nowotworowe, następnie zaangażowanie pętli parakrynnych w diapedezę komórek raka prostaty, i wreszcie funkcję Cx43 w badanych procesach. Doktorantka przypisuje wykryte różnice w mechanizmach mobilizacji śródbłonka dla linii DU145 i PC3 różnemu pochodzeniu tych linii komórkowych (przerzut do mózgu i do kości) wskazując na rozmaitość sposobów komunikacji międzykomórkowej podczas diapedezy. Bardzo ciekawe są rozważania dotyczące złożonej roli Cx43 w obu typach komórek, tj w śródbłonku i komórkach nowotworowych. Autorka postuluje udział Cx43 w tworzeniu frontu inwazyjnego zarówno poprzez jego funkcje

kanałowe, jak i inne, niezależne od GJIC, np. jako białka adhezyjnego, podkreśla jednak, że w literaturze istnieją na ten temat sprzeczne poglądy.

Moją ciekawość budzi zagadnienie nie poruszone w Dyskusji, a mianowicie, czy znane są prace z podaniem dożylnym badanych linii komórek raka prostaty u zwierząt i powstawania ognisk nowotworowych? Zdaję sobie oczywiście sprawę, że wykracza to poza temat diapedezy komórek nowotworowych, ale będę wdzięczna za wyjaśnienie.

W krótkim rozdziale VII pt. Podsumowanie i wnioski Autorka wymienia swoje obserwacje i podaje cztery wnioski ogólne. Sądzę, że chęć zachowania zwięzłości powoduje, że ten fragment nieco odbiega brakiem płynności od stylu charakterystycznego dla całości pracy.

Rozprawę oceniam wysoko zarówno w aspekcie koncepcji, jak i pod względem metodycznym. Chciałabym podkreślić niezwykłą staranność edytorską pracy – zarówno tekst jak i rysunki są bardzo dobrze zredagowane, pracę czyta się płynnie i z przyjemnością. Należy też wspomnieć, że część wyników przedstawionych w rozprawie została opublikowana w postaci współautorskich artykułów w czasopismach. Prace z tego zakresu mają duże znaczenie dla poznania mechanizmów procesu przerzutowania i w konsekwencji znalezienia sposobów im zapobiegania i leczenia.

Z obowiązku poruszam drobne kwestie edytorskie, takie jak:

- Nadużycie słowa „analiza/y"; np. „mierzonej za pomocą analiz densytometrycznych" – wystarczy: mierzony za pomocą densytometrii;
- Streszczenie pracy jest nieco za długie;
- Podobnie do zamieszczonego w dyskusji schematu obrazującego rolę koneksyn (Ryc 35) bardzo przydałby się również ogólny schemat podsumowujący uzyskane wyniki oddziaływań komórek raka prostaty z komórkami śródbłonka i czynniki regulujące niszę metastatyczną.

Zaawansowany warsztat obejmujący szeroki wachlarz metod, swoboda, z jaką Doktorantka się nimi posługuje, ogrom wykonanej pracy doświadczalnej, a także wiele wartościowych wyników będących nowością naukową pozwala stwierdzić, że przedstawiona do recenzji Rozprawa Doktorska spełnia warunki

Strona 4

określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 r z późniejszymi zmianami.

Zwracam się więc do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Piwowarczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie tej Rozprawy.

Martyna Elas

Dr hab. Martyna Elas