Prof. dr hab. Jerzy Moraczewski
emerytowany profesor UW
Wyższa Szkoła Medyczna
w Białymstoku
jerzy.moraczewski@gmail.com

Warszawa, 15.10.2014

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Piwowarczyk
zatytułowanej:

Model niszy metastatycznej *in vitro* w badaniach mechanizmów inwazji komórek raka prostaty

Jednym z fundamentalnych pytań dotyczących kaskady metastatycznej jest wyjaśnienie jakie czynniki wewnątrzkomórkowe i zewnątrzkomórkowe regulują proces wyjścia komórek nowotworowych z naczyń krwionośnych. Ukazały się ostatnio na ten tamat interesujące publikacje porównujące proces ekstrawazacji komórek nowotworowych z z diapedezą leukocytów. Pani mgr Katarzyna Piwowarczyk podeszła do tego problemu nie co inaczej starała się poznać wzajemne oddziaływania komórek raka prostaty i komórek śródbłonka zarówno przez kontakty bezpośrednie jak i czynniki zewnętrzne. Badania przeprowadziła na modelu *in vitro* utworzonym przez hodowlę mieszaną komórek śródbłonka i komórek raka prostaty.

W czasopismach naukowych z ostatnich latach znajdziemy wiele prac w których zwrócono szczególna uwagę na mikrośrośrodowisko, które otacza komórkę i jest modulowane przez nią jak i przez sąsiadujące inne komórki. Są to specyficzne miejsca tkance, nazwano je niszami. Nisze są utworzone przez komórkę lub komórki wraz otaczającą je macierzą zewnątrzkomórkową. W każdej tkance znajdują się nisze komórek macierzystych danej tkanki.Nieco inaczej sa definiowane nisze metastatyczne. Poświecę temu chwile uwagi na końcu recenzji

Rozprawa doktorska pani mgr Katarzyny Piwowarczyk jest bardzo obszerna (150 stron). Jest podzielona na klasyczne rozdziały i podrozdziały. Rozprawa napisana jest bardzo dobrze, dobrym językiem prawie nie zawiera błędów ani zawiłości stylistycznych . Autorka nie uniknęła w paru miejscach tak często używanego żargonu naukowo-urzędniczego żargonu. Drobne błędy wypomnę na końcu.

Pierwszym rozdziałem rozprawy jest **Streszczenie** po polsku i angielsku. Jest ono zbyt długie rozwlekłe i nie uwypukla osiągnięć doktorantki.

Wstęp zajmuje 29 stron. Na początku widzimy bardzo dobre rozwiniecie wszystkich skrótów starannie przetłumaczonych na polski Znajdują się w nim, bardzo interesujące informacje z najnowszych publikacjac naukowych na tematy związane z rozprawą (czasami bardzo luźno). Na początku doktorantka podaje trochę wiadomości na temat raka prostaty, którego komórki są obiektem jej badań. Po czym na kilku stronach przytacza podręcznikowe

wiadomości na temat nowotworzenia a ściślej kancerogenezy. Ponieważ obiektem badań były również komórki śródbłonka dowiadujemy się jak zbudowane są naczynia krwionośne, jak przebiega angiogeneza w obrębie guza pierwotnego, co z resztą nie było celem badań. Autorka zajmowała się diapedezą - wyjściem z naczynia komórek raka prostaty w docelowej tkance, a nie nie wchodzenie tych komórek do naczyń krwionośnych. Interesujący jest podrozdział poświęcony przepuszczalności śródbłonka. Trudno w nim jednak wyłowić istotne informacje na temat modulacji bariery śródbłonkowej przez czynniki wydzielane przez guzy raka prostaty. Nie ma również w tym rozdziale i w żadnym innym rozdziale rozprawy uzasadnienia dlaczego do doświadczeń nad diapedezą komórek nowotworu prostaty wybrano linie komórkową HUVEC. Tym bardziej że na stronie 36 autorka pisze za Lehrem i Pientem cytuję; *"W przypadku nowotworów prostaty wykazano znacznie większa zdolność komórek do adhezji do śródbłonka pochodzącego ze szpiku kostnego aniżeli do komórek izolowanych z żył pępowinowych"*. Piąty rozdział wstępu zatytułowany jest "Nisza metastatyczna *in vivo*" w którym pani magister bardzo szczegółowo opisuje na (podstawie bibliografii) przebieg diapedezy na przykładzie komórek układu odpornościowego. Następnie porównuje ją z diapedezę komórek nowotworu. Mimo tytułu rozdziału nie znalazłem żadnych odniesień do bogatej literatury na temat nisz metastatycznych. Obszerna część wstępu, bardzo dobrze napisana, poświęcona jest koneksynom i ich roli w diapedezie. Na zakończenie wstępu autorka uzasadnia potrzebę badań działania przeciw nowotworowego fenofibratu.

Cel pracy niestety nie został przedstawiony jasno i zwięźle. Pierwszy akapit bardziej nadaje się do wstępu niż do tego rozdziału, Doktorantka nie formułuje żadnej hipotezy, którą pragnie zweryfikować. Sześć punktów w których pani magister wymienia czynności jakie ma wykonać mogą być zadaniami cząstkowymi. Rozprawa doktorska powinna zawierać jeden wyraźnie określony cel. Niestety wielu doktorantów popełnia ten błąd, a wynika to prawdopodobnie z nieznajomości metodologii badań naukowych. Ten zarzut oczywiście nie podważa rozprawy, bowiem po przeczytaniu całej wyraźnie wyłania się jej cel., nie uważam więc że była ona zrobiona bez celu, zwracam jedynie uwagę że doktorantka nie sprecyzowała tezy badawczej i bardzo bym był rad usłyszeć ją na obronie

Materiał i metody (21 stron). Stosowana przez autorkę metodyka badań jest imponująca. Doświadczenia są perfekcyjnie zaplanowane i bardzo starannie przeprowadzone. Obszerny opis metod jest jasny i zrozumiały. Pani magister bardzo precyzyjnie poinformowała o pochodzeniu odczynników i pożywek. Dlaczego więc nie podała pani w tym samym miejscu skąd pochodzą komórki? Pożywka dla HUVEC to EGM ani EBM.

Wyniki (48 stron) Bardzo obszerny rozdział ilustrowany zdjęciami i wykresami. Nazwałbym go raczej wyniki i dyskusja, ponieważ autorka nie tyko prezentuje otrzymane wyniki ale również uzasadnia użycie metody przy pomocy której je uzyskano, a także analizuje ich znaczenie i wyciąga wnioski.

Wyniki przedstawione są w postaci licznych bardzo dobrych zdjęć z mikroskopu flouorescencyjnego, zdjęć żeli oraz wykresów, bardzo przejrzyście zestawionych w tabele.

Wykorzystano optymalnie stosowane metody. Autorka jest doświadczonym badaczem prawidłowo interpretującym uzyskane wyniki. Pierwszy rozdział wyników jest zatytułowany "Model niszy metastatycznej in vitro" Autorka używa określenia zdefiniowana nisza. Nie znalazłem jednak w rozprawie precyzyjnej definicji niszy. Układ eksperymentalny: komórki śródbłonka i wysiane na nie komórki raka prostaty to nie jest jeszcze nisza metastatyczna. To jest modelowy układ do badania diapedezy komórek metastatycznych. Bardzo ważny dla poznania kaskady metastatycznej. Jak autorka zaważa we wstępie diapedeza jest jeden z najistotniejszych etapów przerzutowania. Dlatego, mimo że nie zgadzam się na uznanie tego modelu doświadczalnego za niszę metastatyczną uważam, że badanie procesów zachodzących podczas ekstrawazacji komórek rakowych jest bardzo ważne i jestem przekonany, że praca doktorska pani mgr K. Piwowarczyk jest cenna i wnosi istotne informacje o przebiegu kaskady metastatycznej. Jej wyniki mogą być przydatne w dalszych badaniach nad zahamowanie, zablokowaniem, diapedezy komórek nowotworowych co w konsekwencji mogłoby zapobiegać przerzutom.

Pierwszy etap badań dotyczy aktywności migracyjnej komórek śródbłonka w niszy metastatycznej komórek DU 145, jak komórki nowotworowe mogą wpływać na aktywność ruchową komórek śródbłonka w hodowli mieszanej. Badania ruchliwości komórek przeprowadzono na dość rzadkiej hodowli mieszanej, Nie było to na pewno typowe środowisko niszy przerzutowych komórek nowotworowych. Nie mogę również doszukać się związku między tymi, skądinąd interesującymi wynikami a diapedezą komórek metastatycznych. Warunki tej hodowli nie mają wiele wspólnego z warunkami panującymi w kapilarach z których wychodzą komórki nowotworowe.

Sednem problemu badawczego wg mnie są zmiany cytoszkieletu aktynowego komórek śródbłonka pod wpływem czynników wydzielanych przez komórki nowotworowe albo pod wpływem kontaktów bezpośrednich między nimi. Retrakcja komórek śródbłonka jest kluczowa w ułatwianiu komórkom nowotworowym przejścia przez ich warstwę.

Autorka zbadała oddziaływanie wielu czynników parakrynnych, takich jak cytokiny, czynniki wzrostowe i metaloproteinazy, wydzielanych przez kilka linii komórek raka prostaty na komórki śródbłonka. Czynniki angiogenne wydzielane przez komórki nowotworowe mogą mobilizować komórki śródbłonka i prowadzić do rozszczelnienia ściany naczynia. Stwierdzono również, że metaloproteinazy wydzielane przez komórki metastatyczne odgrywają bardzo ważnią rolę w regulacji ruchliwości komórek śródbłonka w hodowlach mieszanych. Rola metaloprotainaz w degradcji Błony podstawnej i EMC w kaskadzie metasstatycznej jest ugruntowana. Ciągle nie widzę związku ruchliwości komórek śródbłonka z diapedezą komórek przerzutowych.

Koneksyny odgrywają ważną rolę w aktywacji komórek śródbłonka podczas diapedezy, co znane jest z literatury. Autorka postanowiła zbadać czy w przypadku komórek nowotworowych raka prostaty odbywa się to drogą kanałowo-zależną czy kanałowo-niezależną. Wykryła, że nie we wszystkich badanych liniach komórek raka prostaty występowała podobna ekspresja koneksyny Cx43. Białko to występowało również w błonach

komórek HUVEC i tworzyło miedzy nimi złącza szczelinowe. Tego typu funkcjonalne kontakty powstawały także miedzy komórkami śródbłonka i komórkami linii DU-145 raka prostaty. Aby upewnić się czy komórki w badanym układzie komunikują się drogą kanałową zastosowano inhibitor komunikacji międzykomórkowej przez złącza szczelinowe. Okazało się, że ta droga komunikacji nie odgrywa roli w aktywacji komórek śródbłonka. Zbadano czy Cx43 nie wpływa na przebieg diapedezy inną drogą, wyciszono więc ekspresję Cx43 w komórkach DU-145. Komórki z obniżoną ekspresją w znacznie mniejszym stopniu aktywują komórki śródbłonkowe. Przeprowadzono bardzo eleganckie doświadczenia majce wyjaśnić czy istnieje korelacja między poziomem ekspresji Cx43 a potencjałem inwazyjnym komórek raka prostaty. W obrębię populacji komórek izolowanych z tego samego guza zaobserwowano komórki o różnym potencjale inwazyjnym, koneksyna Cx43 wspomaga proces inwazji w czasie diapedezy. Zbadano również czy białko Cx43 obecne w komórkach śródbłonka odgrywa rolę w diapedezie i czy jest regulowane przez Cx43 komórek nowotworowych. Chciałbym zacytować tu obszerniejszy fragment rozprawy ze str 98 i prosić o wyjaśnienie. "*Otrzymane wyniki wskazują, że komórki raka prostaty mogą indukować ekspresję Cx43 w komórkach śródbłonka przy zaangażowaniu sygnałów przekazywanych za pośrednictwem tego białka. Zjawisko to może mieć konsekwencje dla zdolności komórek śródbłonka do sprzężenia metabolicznego z innymi komórkami wynikające z jego własnego sprzężenia funkcjonalnego. Może to bezpośrednio rzutować na efektywność procesu diapedezy komórek nowotworowych. Obie te hipotezy zostały przetestowane w dalszych doświadczeniach*" Po pierwsze proszę o przetłumaczenie tego na zrozumiały język. Po drugie, zwróciłem uwagę na brak hipotezy w rozdziale cel pracy, a tu autorka mówi o dwóch hipotezach tylko gdzie one są i jak brzmią? Podrozdział 4.3 to "Wpływ monocytów krwi obwodowej na mobilizację niszy metastatycznej przez komórki raka prostaty DU-145" Co to jest mobilizacja niszy? Dlaczego monocyty a nie inne komórki krwi?. Kto stwierdził że mają one bezpośredni dostęp do niszy związanej z diapedezą? To co opisano w tym rozdziale to wpływ monocytów na ruchliwość komórek HUVEC w hodowli mieszanej z komórkami DU-145. W takiej hodowli zwiększa się w komórkach śródbłonka poziom białka Cx43, ale nie zbadano jak to aktywuje lub zwiększa tempo diapedezy. Ryc 25 Immunobloting nie służy do pomiaru poziomu ekspresji, a jedynie względnego poziomu białka w badanej próbce.

Pani mgr Piwowarczyk wykonała bardzo interesujące doświadczenia wykazując, że druga fala komórek nowotworowych natrafia na śródbłonek zmobilizowany do szybszej i efektywniejszej diapedezy komórek raka.

Ostatnim etapem pracy było zbadanie wpływu fenofibratu na mobilizację śródbłonka przez komórki nowotworowe. Na podstawie wyników badań immunofluorescencyjnych i molekularnych autorka stwierdza że fenofibrat zwiększa funkcję barierową śródbłonka działając na receptory kinaz prowadzących do usztywnienia cytoszkieletu aktynowego. Byłbym ostrożny w formułowaniu, na postawie tych badań, stwierdzenia, że fenofibrat reguluje proces mobilizacji komórek śródbłonka do podłoża. Podłoże na którym hodowano

śródbłonek i błona podstawna oraz EMC komórek śródbłonka kapilary rożni się zasadniczo i kontakty ogniskowe nie odgrywają w tkance takie roli jak w dwuwymiarowej w hodowli

Dyskusja (15 stron)

Ten rozdział ma podobny układ do rozdziału wyniki. Każda grupa eksperymentów. jest omówiona osobno i skonfrontowana z wynikami innych autorów. Na początku dyskusji autorka ujmuje swoje osiągnięcia w punktach. Po pierwsze stwierdza że zidentyfikowała na modelu zjawiska towarzyszące diapedezie komórek raka prostaty. Po drugie określiła różnice między mediatorami komunikacji międzykomórkowej różnych linii raka prostaty podczas diapedezy. Po trzecie, tu mam problem bo nie rozumiem o co autorce chodziło cytuję "*przetestowano użyteczność takiego podejścia badawczego do analiz mechanizmów potencjalnego , przeciw nowotworowego działania leków wazoaktywnych.*" Domyślam się, że chodzi tu o badania wpływu fenofibratu na komórki śródbłonka in vitro. Wszystkie te punkty są bardzo ogólnikowe. W dalszej dyskusji autorka krytycznie omawia swoje wyniki i stosowane metody na tle wyników innych autorów Szkoda że wyniki osiągnięte przez doktorantkę gubią się czasami w danych cytowanych z publikacji innych autorów.

W dyskusji doktorantka sięgnęła do najnowszy literatury naukowej na tematy związane z zagadnieniami poruszonymi w rozprawie, poza publikacjami na temat nisz metastatycznych. Szkoda że nie poświęcono miejsca na krytyczne porównanie modelu niszy stosowanego w tych badaniach z opisem nisz zarówno komórek macierzystych jak i metastycznych np z bardzo interesującym przeglądowym artykułem A.D. Landera i wsp z roku 2012 opublikowanym w BMC Biology.

Dużo miejsca w dyskusji poświęca autorka roli koneksyn w procesie diapedezy. Podsumowuje to przejrzystym i pięknym graficznie schematem. Obrazuje on bardzo jasno powstawanie prawdziwej niszy z której wywędrowują komórki inwazyjne.

Na zakończenie dyskusji pani magister podsumowuje swoją rozprawę punktując tym razem precyzyjnie swoje osiągnięcia i bardzo słusznie zauważa że badany układ komórki raka prostaty / komórki HUVEC cytuję "*pozwala na częściowe odtworzenie warunków warunków panujących w obrębie niszy metastatycznej*" .

Bardzo obszerna bibliografia rozprawy zawiera ponad 70% publikacji z ostatnich 10 lat w tym 30% ukazało się po roku 2010.

Na zakończenie chciałbym zwrócić uwagę na pewne błędy i niedociągnięciami oraz podzielić się uwagami na temat niszy metastatycznej nie umniejszając wartości recenzowanej rozprawy.

Bardzo istotne, jeśli nie podstawowe, znaczenie ma kontakt komórek nowotworowych ze śródbłonkiem. Pod wpływem czynników wydzielanych przez te komórki następują zmiany w cytoszkielecie komórek śródbłonka, ich retrakcja i rozszczelnienie warstwy. Tak jest to opisane w wynikach. W dyskusji natomiast autorka stwierdza, że wytwarzane przez komórki nowotworowe wypustki penetrują śródbłonek i "*komórki nowotworowe powodowały lokalne rozerwania kontaktów między komórkowy*" wskazywałoby to, że jest to proces czysto mechaniczny.

Bardzo mnie intryguje w jakim celu robiono tak rozległe badania ruchliwości komórek śródbłonka oraz wpływu na nie czynników angiogennych wydzielanych przez komórki raka prostaty. W miejscu gdzie odbywa się diapedeza komórek raka nie zachodzą procesy angiogenezy. W miejscu adhezji komórki nowotworowej jest zwarty śródbłonek. Komórki nowotworu rozszczelniwszy tę warstwę przechodzą przez nią, co bardzo pięknie wykazano w rozprawie na zdjęciach z mikroskopy konfokalnego. Hodowla komórek HUVEC była w stadium subkonfluencji (70%) i dlatego można je było pobudzić do ruchu. Tylko te fragmenty hodowli gdzie była zwarta warstwa komórek śródbłonka na którą wysiewano komórki raka prostaty odpowiada z grubsza warunkom tworzącej się w naczyniu niszy ułatwiającej diapedezę. Zgrabne doświadczenie które wykonała doktorantka wysiewając drugą warstwę komórek nowotworowych wykazało że śródbłonek jest kondycjonowany przez komórki wysiane wcześnie co ułatwia diapedezę nowo wysianym komórkom . W określonym miejscu na ściance naczynia tworzy się więc prosta nisza.

Na stronie 124 autorka ponownie wraca wo angiogenezy pisząc o neowaskulayzacji guza. w której ważną rolę pełni migracja komórek śródbłonka. To prawda, tylko jak sądzę, w tych badaniach nie mamy prawdziwej niszy metastatycznej powstającej w tkance docelowej, która rozrastając się będzie uległa waskularyzacji. Cały proces którym zajmowała się doktorantka odbywa się w naczyniu krwionośnym lub jego śródbłonku.

Pytanie; Czy różne zdolności do diapedezy różnych badanych linii raka prostaty nie wynikają z tego że pochodzą one z mózgu lub kości. To nie był pierwotny nowotwór. Czy te komórki różnią się, muszą mieć mieć jakieś szczególne właściwości ze osiedliły się w rożnych tkankach. Wędrując do nich przeszły już raz ekstawazację i to w skrajnie różnym mikrośrodowisku

Jak wyżej wspomniałem dwa typy nisz są w ostatnich latach w centrum zainteresowania naukowców. Pierwszy, to nisze komórek macierzystych, tu również zaliczane są nisze macierzystych komórki nowotworów. Nisza to mikrosłuchowisko pozwalające komórce macierzystej pozostawać w stanie spoczynku dzięki współdziałaniu czynników wydzielanych przez komórki niszy i receptory komórki macierzystej, To również miejsce gdzie następuje jej aktywacja do podziałów lub różnicowania. Zmiana homeostazy w niszy, może inicjować te procesy.

Drugi typ nisz to nisze metastatyczne. Komórki pierwotnego nowotworu poprzez wydzielanie cytokin i czynników wzrostu promują mobilizacje i rekrutacje komórek szpiku kostnego do tworzenia nisz premetastatycznych w odległych tkankach Powstałe tak mikrośrodowisko dzięki obecności odpowiednich cytokin czynników wzrostu i enzymów staje się miejscem osiedlanie komórek nowotworowych wywędrowujących z pierwotnego nowotworu. W wyniku tego powstaje nisza metastatyczna. Nisza metastatyczna to grupa inwazyjnych komórek nowotworowych otoczona fibroblastami, makrofagami i często komórkami podścieliska. W przypadku inwazji komórek raka prostaty do kości nisze metastatyczne powstają dzięki zasiedlaniu przez komórki nowotworowe zmodyfikowanych

przez czynniki pochodzące z nowotworu pierwotnego nisz komórek macierzystych osteoblastycznych lub hematopoetycznch.

Nisza metastatyczna ma określoną strukturę i zdefiniowane środowisko wewnętrzne. Czy model komórkowy stworzony przez mgr Piwowarczyk można nazwać modelem niszy metastatycznej? Extrawazacja to tylko jeden z etapów wędrówki komórek nowotworowych. Etap bardzo ważny w procesie przerzutowania. Ostatnia bariera do pokonania. Z pewnością w miejscu diapedezy tworzy się nisza, czasowa nisza, której lokalizacja jest przygotowywana przez działanie czynników wydzielanych przez nowotwór pierwotny i prawdopodobnie prze niszę premetastatyczną znajdującą się w kości. Ponieważ nie spełnia ona wszystkich kryteriów niszy metastatycznej nazwałbym ją inaczej. A badany model to tylko fragment tej niszy.

Przedstawioną mi do recenzji rozprawę oceniam pozytywnie, mimo wymienionych wyżej uwag. Wnosi ona wiele nowego do nauki. Prezentuje nowe interesujące spojrzenie na diapedezę komórek raka. Doświadczenia były zaplanowane i wykonane starannie, a wyniki są jednoznaczne

Rozprawa pani mgr Katarzyny Piwowarczyk pt. „ MODEL NISZY METASTATYCZNEJ IN VITRO W BADANIACH MECHANIZMÓW INWAZJI KOMÓREK RAKA PROSTATY" odpowiada wszystkim warunkom stawianym rozprawom doktorskim, wnoszę więc do Wysokiej Rady Wydziały Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego