kontinuum śródbłonka przez komórki DU-145 jest wypadkową działania kilku systemów regulujących międzykomórkową komunikację w obrębie niszy metastatycznej.

Potwierdzenie takiego stanu rzeczy przyniosły analizy wpływu komórek innych linii raka prostaty na status funkcjonalny śródbłonka. Na przykład komórki PC-3 wykazywały stosunkowo wysoką wydajność procesu penetracji śródbłonka, przy znikomej ekspresji Cx43. Ponadto, media warunkowane pochodzące z tych komórek znacząco zwiększały aktywność migracyjną komórek śródbłonka, co dowodzi kluczowej roli pętli parakrynnych w efektywności ekstrawazacji komórek PC-3. Z kolei porównanie wpływu komórek MAT-LyLu i AT-2 na lokalne właściwości śródbłonka wskazuje na istotną rolę Cx43 w obrębie ich niszy metastatycznej. Komórki linii MAT-LyLu, charakteryzujące się wysoką ekspresją Cx43 i wysoką inwazyjnością, były w stanie znacznie efektywniej mobilizować komórki HUVEC, aniżeli komórki linii AT-2 o niskim potencjale inwazyjnym oraz niskiej ekspresji Cx43. Wyniki te wskazują, że różne sub-populacje komórek raka prostaty (nawet w obrębie tego samego guza), mogą przyjmować różne strategie kontroli procesu transmigracji przez warstwę śródbłonka. Ekspresja Cx43 w komórkach nowotworowych nie jest konieczna dla tego procesu, choć w zależności od typu komórek, może go w większym lub mniejszym stopniu wspomagać. Co więcej, obecność Cx43 w komórkach nowotworowych może wspomagać tworzenie przerzutów na innych etapach kaskady metastatycznej, o czym świadczy korelacja między inwazyjnością komórek DU-145 a ekspresją Cx43 w tych komórkach. Z drugiej strony ekspresja Cx43 w komórkach śródbłonka regulowana jest interakcjami międzykomórkowymi w obrębie niszy metastatycznej. Zaobserwowano znaczący wzrost ekspresji Cx43, zarówno na poziomie białka jak i mRNA, w komórkach HUVEC hodowanych w obecności komórek DU-145 i MAT-LyLu, a mniejszy w obecności komórek PC-3 i AT-2. Uzyskane wyniki częściowo wskazują na rolę obecności Cx43 w komórkach nowotworowych w regulacji tego procesu. Jednak pętle parakrynne również są w stanie modulować ekspresję Cx43 w komórkach śródbłonka, o czym świadczy wpływ monocytów izolowanych z krwi obwodowej na proces ekstrawazacji komórek DU-145, aktywność lokomotoryczną oraz profil ekspresji Cx43 w śródbłonku.

Niezależnie od bodźców powodujących mobilizację komórek śródbłonka, opisane powyżej wyniki wskazują na rolę tego procesu w warunkowaniu wydajności ekstrawazacji komórek nowotworowych. Teza ta znalazła potwierdzenie w wynikach badań wpływu fenofibratu (powszechnie stosowanego leku wazoaktywnego o możliwym działaniu przeciwnowotworowym) na interakcje komórek raka prostaty DU-145 z śródbłonkiem w obrębie niszy metastatycznej. Analizy reorganizacji kontinuum przestrzennego śródbłonka po podaniu fenofibratu wykazały spadek wydajności ekstrawazacji komórek nowotworowych. Zaobserwowano, że fenofibrat zmienia organizację cytoszkieletu w komórkach śródbłonka powodując wzrost liczby włókien naprężeniowych oraz indukuje rekrutację winkuliny do kontaktów zogniskowanych, czemu towarzyszy spadek aktywności migracyjnej komórek śródbłonka w obecności komórek nowotworowych. Skorelowane jest to z aktywacją ścieżki sygnalizacyjnej zależnej od kinazy AKT i wzrostem stężenia reaktywnych form tlenu w komórkach śródbłonka w wyniku aktywacji szlaków zarówno zależnych, jak i niezależnych od PPARα. Otrzymane wyniki wskazywać mogą, ze zjawiska te nie zależą od interferencji fenofibratu ze szlakami komunikacji międzykomórkowej w obrębie niszy metastatycznej, lecz są one wynikiem bezpośredniego wpływu fenofibratu na komórki śródbłonka.

Reasumując, zaproponowany w pracy model badawczy umożliwia stosunkowo wszechstronną analizę warunków panujących w obrębie niszy metastatycznej oraz aktywności międzykomórkowych szlaków sygnałowych biorących bezpośredni udział w procesie ekstrawazacji komórek nowotworowych. Przy jego użyciu sprecyzowano różnice w proporcji między wpływem pętli parakrynnych oraz zależnych i niezależnych od złącz szczelinowych funkcji Cx43 na efektywność procesu penetracji kontinuum śródbłonka przez komórki różnych linii raka prostaty. Ponadto, wykazano decydujący wpływ lokalnego statusu funkcjonalnego śródbłonka na wydajność tego procesu, a także zidentyfikowano mechanizmy możliwej interferencji fenofibratu z wydajnością kaskady metastatycznej raka prostaty związanej z podniesieniem funkcji barierowej śródbłonka. Poznanie mechanizmów interferencji leków ze szlakami odpowiedzialnymi za tworzenie przerzutów może mieć kluczowe znaczenie z punktu widzenia terapii nowotworów, dlatego tak ważne jest wykorzystanie w badaniach modeli doświadczalnych umożliwiających częściowe odtworzenie warunków panujących w obrębie niszy metastatycznej.

Wielokierunkowa wymiana informacji między komórkami a otaczającym je mikrośrodowiskiem (niszą) współdecyduje o utrzymaniu homeostazy tkanki, a jej zaburzenia prowadzić mogą do rozwoju choroby nowotworowej. Szczególnym przypadkiem mikrośrodowiska komórki nowotworowej jest „nisza metastatyczna", czyli miejsce, w którym dochodzi do ekstrawazacji komórek nowotworowych zapoczątkowujących rozwój metastazy. Właściwości komórek nowotworowych, takie jak mechaniczna elastyczność, aktywna migracja oraz wrażliwość na bodźce płynące z mikrośrodowiska, współwarunkują zdolność komórek do penetracji naturalnych barier, w tym kontinuum śródbłonka i błony podstawnej. Jednak wydajność procesu ekstrawazacji komórek nowotworowych jest w równym stopniu warunkowana przez oddziaływania międzykomórkowe w obrębie niszy metastatycznej, w tym przez interakcje komórek nowotworowych ze śródbłonkiem i komórkami układu odpornościowego. W szczególności, efektywność tego procesu zależy od lokalnego statusu funkcjonalnego śródbłonka warunkowanego przez pętle parakrynne lub/i przez bezpośrednią wymianę metabolitów między komórkami za pośrednictwem złącz szczelinowych. Interakcje te są potencjalnym celem terapii przeciwnowotworowych nakierowanych na obniżenie efektywności kaskady metastatycznej.

Nisza metastatyczna jest przejściowo formowana w naczyniach kapilarnych na styku komórek nowotworowych i śródbłonka. W pracy zaproponowano model doświadczalny *in vitro* umożliwiający częściowe odtworzenie warunków panujących w obrębie niszy metastatycznej komórek nowotworowych oraz przeprowadzono próbę jego zastosowania do analiz czynników determinujących wydajność ekstrawazacji komórek raka prostaty. Układ ten oparty został o ko-hodowle komórek śródbłonka (HUVEC) z komórkami szczurzych (AT-2, MAT-LyLu) oraz ludzkich linii raka prostaty (DU-145, PC-3), powszechnie stosowanych w analizach tego nowotworu. W badaniach wykorzystano fakt znacznych różnic między komórkami poszczególnych linii, dotyczących podstawowych cech współdecydujących o ich potencjale inwazyjnym: w tym ich aktywności migracyjnej oraz funkcji koneksyny(Cx)43, białka budującego kanały złącz szczelinowych o wciąż nie do końca sprecyzowanej roli w toku rozwoju choroby nowotworowej. Wykorzystując skaningową mikroskopię konfokalną opisano poszczególne etapy penetracji kontinuum śródbłonka przez komórki raka ludzkiej prostaty DU-145 oraz towarzyszącą temu procesowi mobilizację komponentów niszy metastatycznej. W bezpośrednim otoczeniu komórek DU-145 dochodzi do „rozszczelnienia" warstwy śródbłonka, czemu towarzyszy zwiększenie jego aktywności migracyjnej oraz zmiana architektury cytoszkieletu aktynowego, w tym formowanie włókien naprężeniowych. Wyniki te jednoznacznie wskazują, że procesy te związane są z lokalną mobilizacją śródbłonka indukowaną sygnałami pochodzącymi od komórek nowotworowych. Dodatkowo zaobserwowano aktywację szlaku sygnałowego zależnego od kinazy ERK1/2 w komórkach śródbłonka w ko-hodowli z komórkami DU-145. Podobną mobilizację komórek śródbłonka, choć o różnym natężeniu, zaobserwowano w obecności komórek raka prostaty PC-3, MAT-LyLu i AT-2. Obserwacje te potwierdzają aktywną rolę endotelium w procesach ekstrawazacji komórek nowotworowych. Ilustrują one również przydatność zastosowanego podejścia doświadczalnego do badań roli wzajemnych interakcji między komórkowymi komponentami niszy w regulacji procesu ekstrawazacji.

Za zjawisko mobilizacji komórek śródbłonka przez komórki nowotworowe odpowiadać mogą zarówno oddziaływania parakrynne, jak i sygnały przesyłane za pośrednictwem bezpośrednich kontaktów miedzy komórkami, w tym także za pośrednictwem złącz szczelinowych. Stymulacja komórek HUVEC medium warunkowanym pochodzącym od komórek DU-145 nie wpływała znacząco na ich aktywność migracyjną. Z drugiej strony zaobserwowano znaczące różnice w profilu ekspresji cytokin regulujących procesy angiogenezy w ko-hodowlach komórek śródbłonka i DU-145. W powiązaniu ze wzrostem aktywności szlaku ERK1/2 w ko-hodowlach wynik ten sugeruje, że lokalna aktywacja pętli parakrynnych może odgrywać pewną rolę w mobilizacji komórek śródbłonka w obrębie niszy metastatycznej komórek DU-145, jednak nie jest to rola wiodąca. Ponadto, zastosowanie inhibitora metaloproteinaz nie wpłynęło na stymulowaną komórkami DU-145 aktywność migracyjną śródbłonka. Z drugiej strony, wyciszenie ekspresji Cx43 w komórkach DU-145 spowodowało obniżenie tempa ich ekstrawazacji, które było skorelowane ze spadkiem poziomu indukcji ruchliwości komórek śródbłonka. Jednak farmakologiczne zablokowanie komunikacji międzykomórkowej za pośrednictwem złącz szczelinowych nie zmieniło znacząco tempa ekstrawazacji komórek raka prostaty oraz aktywności migracyjnej komórek HUVEC stymulowanych kontaktem z komórkami nowotworowymi. Otrzymane wyniki wskazują, że efektywność penetracji