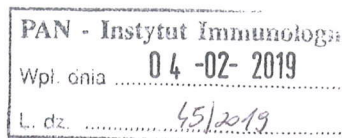




UNIwersytet
MEDYCZNY
W ŁÓDZI



Łódź, 31.12.2018

Prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterek
Kierownik Zakładu i Katedry
Zakład Chemii i Biochemii Klinicznej
Międzywydziałowa Katedra Chemii i Biochemii Medycznej
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Recenzja pracy doktorskiej

mgr Diana Papiernik

**„Rola białka wiążącego retinol typu 4 (RBP4) w angiogenezie i przerzutowaniu
nowotworów gruczołu sutkowego”**

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem

prof. dr hab. Joanny Wietrzyk

w Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej

Instytutu Immunologii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda

Polskiej Akademii Nauk

Eksperti WHO klasyfikują nowotwory jako jedną z głównych przyczyn zgonów, rocznie umiera ponad 8 milionów osób na świecie a w Polsce blisko 110 tysięcy osób, z czego około 100 tysięcy w wyniku nowotworów złośliwych. Pomimo działań uświadamiających konieczność przeprowadzania badań profilaktycznych, rak jest drugą przyczyną zgonów w Polsce, liczba zachorowań ciągle rośnie. U kobiet najczęściej występującym nowotworem jest rak gruczołu piersiowego stanowiący ponad 1/5 zachorowań na nowotwory. Rozpoznawany jest najczęściej u kobiet między 50-69 rokiem życia. Wzrasta jednak liczba przypadków diagnozowanych u kobiet młodszych między 20-49 rokiem życia.

Rak gruczołu piersiowego – potocznie nazywany rakiem piersi – to nowotwór wywodzący się z nabłonka przewodów lub zrazików gruczołu piersiowego. Początkowo rozwija się miejscowo w piersi jednak może dawać przerzuty za pośrednictwem naczyń chłonnych czy krwionośnych do węzłów chłonnych i innych narządów.



Kancerogeneza jest wieloczynnikowym procesem obejmującym trzy główne etapy inicjacji, promocji oraz progresji. Na etapie inicjacji bardzo często dochodzi do mutacji w wyniku, której prawidłowa komórka nabywa nowe nietypowe cechy fenotypowe. Cechy te przejawiają się niekontrolowaną proliferacją i utratą zdolności do różnicowania, co prowadzi do kolejnego etapu którym jest promocja. Na tym etapie dochodzi do utworzenia guza pierwotnego. W trzecim etapie tzw. progresji nowotworowej podczas której nowotwór się rozwija, komórki nowotworowe nabierają zdolności do naciekania tkanek oraz zdolności do przerzutowania.

Mimo znacznego postępu w diagnostyce i leczeniu raka, zdecydowana większość pacjentów w zaawansowanym stadium nowotworu z przerzutami, przegrywa z nieuleczalną według aktualnych schematów leczenia chorobą. Populacja komórek nowotworowych w guzie pierwotnym jest heterogenna pod względem biologicznym. Jest to wynik gromadzenia się mutacji oraz zmian w ekspresji genów promujących niestabilność genetyczną proliferujących komórek nowotworowych. W procesie progresji nowotworu niektóre komórki zyskują cechy fenotypu inwazyjnego, który charakteryzuje się zdolnością do przerzutowania. Dlatego, znaczna większość zgonów związanych z rakiem spowodowana jest wtórnymi ogniskami powstałymi w wyniku przerzutowania, a nie tylko rozwojem guza pierwotnego.

Rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych z pierwotnych guzów nowotworowych i ich kolonizacja w odległych tkankach obejmuje wieloetapowy proces. W pierwszym etapie komórki z guza pierwotnego wnikają do naczyń chłonnych lub krwionośnych, następnie migrują przez ściany naczyń do otaczających tkanek, osiedlają się i proliferują oraz indukują angiogenezę tworząc ogniska przerzutowe.

Białko RBP4 (21 kDa) jest adipokina należącą do rodziny lipokalin, kodowaną przez gen umiejscowiony na chromosomie 10. Rolą RBP4 jest transport retinolu (witaminy A) z wątroby do tkanek obwodowych. Ekspresja RBP4 zachodzi nie tylko w wątrobie, ale również w tkance tłuszczowej oraz innych tkankach magazynujących retinoidy, w tym nerkach, płucach, śledzionie, mózgu, żołądku, jelicie cienkim i trzustce. Poziom RBP4 w osoczu koreluje z poziomem retinolu, dlatego też ilość krążącego retinolu może warunkować poziom krążącego RBP4. W normalnych warunkach fizjologicznych wiązanie insuliny ze swoistymi dla niej receptorami w błonie komórkowej pobudza wychwyt glukozy do komórek mięśniowych i tłuszczowych przez transporter glukozy typu 4 (GLUT-4). Hamuje również wytwarzanie glukozy w wątrobie, utrzymując w ten sposób normalne stężenie glukozy we krwi. Obecnie wiadomo, że podczas rozwoju insulinooporności, zmniejszenie gęstości błonowej GLUT-4 na adipocytach stymuluje uwalnianie RBP4 do krążenia. Czynniki, które wpływają na ilość transporterów glukozy w błonie



komórkowej są np. insulina, skurcz mięśni, utrata energii, czyli obniżenie stosunku ATP/ADP oraz depolaryzacja błony komórkowej. Uwolnione do krwi RBP4 hamuje sygnały szlaków metabolicznych działania insuliny w komórkach mięśni szkieletowych. Jednocześnie, poprzez aktywację karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej, dochodzi do stymulacji glukoneogenezy w wątrobie. Prowadzi to do zmniejszenia wychwytu glukozy przez mięśnie i zwiększenia jej syntezy w wątrobie, co powoduje podwyższenie jej stężenia w krążeniu. Jednak mechanizm, w którym RBP4 miałby być uwalniany podczas choroby nowotworowej, nie został jeszcze do końca poznany.

Prowadzone na przestrzeni ostatnich lat badania wykazały, że RBP4 spełnia w organizmie wiele funkcji: indukuje insulinooporność, hamuje ekspresję transportera GLUT-4, hamuje fosforylację receptora dla insuliny 1 (IRS-1) oraz jest markerem ilości tkanki tłuszczowej. Badania te również sklasyfikowały RBP4 jako ogniwo łączące otyłość i insulinooporność oraz występowanie innych zaburzeń metabolicznych. Zagadnienia dotyczące RBP4 budzą jednak wiele kontrowersji, a dotychczasowe badania nie dają jednoznacznych wyników.

Obecny stan wiedzy pozwolił na zidentyfikowanie RBP4 jako jednego z głównych czynników biorących udział w uszkodzeniu śródbłonna naczyniowego w trakcie rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego takich jak miażdżycy i nadciśnienie tętnicze oraz cukrzycy typu II. RBP4 może bezpośrednio przyczyniać się do dysfunkcji śródbłonna naczyniowego poprzez stymulację ekspresji cząsteczek prozapalnych, zaangażowanych w rekrutację leukocytów i przyleganie komórek do śródbłonna naczyń, w tym VCAM-1, ICAM-1, oraz IL-6.

W 2016 roku po raz pierwszy Jiao i *wsp.* opublikowali pracę, w której wykazali podwyższony poziom RBP4 u pacjentów z rakiem gruczołu piersiowego w porównaniu do grupy zdrowych ludzi. Ukazało się również wiele prac w których wykazano, że stężenie RBP4 podnosi się u ludzi m. in. z rakiem płuca, jelita grubego, jajników, prostaty i rakiem wątrobowokomórkowym. Istnieją doniesienia, że RBP4 wydzielane jest nie tylko przez komórki wątroby ale także przez komórki nowotworowe, co może oddziaływać na przebieg transformacji nowotworowej, w tym proces przerzutowania. Dodatkowo, podwyższony poziom białka RBP4 odnotowano również w surowicy pacjentów z chorobą nowotworową. Dane zawarte w piśmiennictwie pokazały, że RBP4 wpływa na wzrost, migrację i adhezję komórek raka okrężnicy. Dotychczas, nie wykazano jednak bezpośredniej korelacji pomiędzy zdolnością do przerzutowania nowotworu a RBP4.

W odniesieniu do dostępnych danych eksperymentalnych głównym celem niniejszej pracy stało się określenie wpływu RBP4 na dysfunkcję śródbłonna towarzyszącą chorobie nowotworowej, tworzenie nowych naczyń w guzie pierwotnym, a także proces powstawania wtórnych ognisk



nowotworowych w modelach przerzutujących oraz nieprzerzutujących mysich raków gruczołu sutkowego.

Realizacja celu pracy nastąpiła poprzez eksperymenty przesiewowe które potwierdziły wybór białka RBP4, a także wykazały korelację jego poziomu z rozwijającym się stanem zapalnym. W drugim etapie sprawdzano bezpośredni wpływ RBP4 na komórki śródbłonna i komórki nowotworowe w modelach *in vitro* i *in vivo*. Trzeci etap obejmował badania nad wpływem RBP4 na proces zapalny i przerzutowania. Wykorzystano w nim nowe modele doświadczalne komórek z nadekspresją RBP4.

W pierwszym etapie badań wykorzystano dwa modele izogenicznych linii komórkowych mysiego raka gruczołu sutkowego zgromadzone w banku linii komórkowych Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu. Pierwszy model zawierał linię nieprzerzutującą 67NR oraz przerzutujący odpowiednik 4T1, natomiast w skład drugiego modelu wchodziła linia nieprzerzutująca oraz dwie bliźniacze linie, z których jedna przerzutowała do nerek a druga do płuc, odpowiednio: EpH4 1424, EpH4 1424.1, EpH4 1424.2.

Drugi etap badań został przeprowadzony z wykorzystaniem komórek 67NR i 4T1 poddanych transfekcji. Transfekcję przeprowadzono we współpracy z Laboratorium Glikobiologii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej. W wyniku transfekcji powstały nowe linie zawierające białko bliskiej podczerwieni iRFP670, linie 67NR IR i 4T1 IR.

W trzecim etapie wykorzystano nowe modele doświadczalne z nadekspresją RBP4. Modele te zostały również uzyskane przez transfekcję komórek 67NR i 4T1 we współpracy z Laboratorium Glikobiologii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej. W wyniku tego uzyskano dwa typy komórek jako model badawczy *in vitro*, komórki 67NR R4 oraz komórki 4T1 R4 z nadekspresją RBP4.

Badania składające się na dysertację doktorską w pracy doktorskiej Pani mgr Diany Papiernik, przeprowadzone zostały w ramach projektu pt. „Farmakoterapia śródbłonna naczyniowego i aktywacji płytek krwi zależna od prostacykliny, tlenku azotu i tlenku węgla – nowa strategia w zapobieganiu przerzutowości nowotworowej” finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, Program Strategiczny STRATEGMED. W pracy zastosowano szereg metod nowoczesnej biologii molekularnej, takich jak: macierze genowe, real time-PCR, Western blot, metody inżynierii genetycznej opartej na transformacji komórek bakteryjnych oraz transdukcji i transfekcji komórek eukariotycznych. W rozprawie zastosowano zwierzęta doświadczalne w ramach procedur *in vivo* podania komórek nowotworowych myszom w modelu ortotopowym oraz dożylnym. Pozwoliło to na analizę wzrostu, przerzutowania oraz unaczynienia guza, metodą

obrazowania ultrasonograficznego z wykorzystaniem barwnika fluorescencyjnego. Uzupełnieniem badań *in vivo* były metody *ex vivo* oraz *in vitro*, przeprowadzono testy ELISA, testy proliferacji, migracji, adhezji, oznaczenia integryn oraz macierze cytokinowe.

W ocenie merytorycznej realizacji zmierzonych celów pracy, należy podkreślić wysmienie zaplanowany oraz przemyślany plan badawczy, który pozwolił na kompleksowe badanie roli białka wiążącego retinol typu 4 w angiogenezie i przerzutowaniu nowotworów gruczołu sutkowego. W sposób bezpośredni odzwierciedla to wieloletnie doświadczenie oraz wysokie kompetencje naukowe promotora pracy Pani prof. dr hab. Joanny Wietrzyk, Kierownika Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej, Instytutu Immunologii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, Polskiej Akademii Nauk.

Problem badawczy, w aspekcie oceny rzeczywistego udziału RBP4 w procesie przerzutowania wymagał zastosowania modelu, który składałby się z siostrzanych linii przerzutującej oraz nieprzerzutującej. Główną przeszkodą w badaniach nad przerzutami nowotworowymi jest słaba dostępność mysich modeli, które rzetelnie odzwierciedlają proces przerzutowania występujący u ludzi. Dlatego, należy podkreślić iż Doktorantka w sposób właściwy w swoich badaniach, wytypowała dwa mysie modele raka gruczołu sutkowego oparte na liniach komórkowych 67NR i 4T1 oraz model oparty na liniach komórkowych powstałych przez transfekcję rodzimej linii komórek nabłonka gruczołu sutkowego EpH4. Linia 4T1 jest najczęściej stosowana, ze względu na podobieństwo przebiegu choroby rozwijającej się u myszy do choroby nowotworowej u kobiet z rakiem gruczołu piersiowego w 4 stadium. Podobieństwa te obejmują między innymi, szlaki migracji oraz kolonizację komórek w tkankach takich jak płuca, wątroba, mózg czy kości, a także aktywację układu odpornościowego objawiającą się leukocytozą. Aby ustanowić alternatywę dla modelu 67NR/4T1 oraz odnaleźć unikalne markery wspólne dla różnych rodzajów linii raka gruczołu sutkowego, zdecydowano się scharakteryzować potencjał przerzutowy nowych nieopisanych jak dotąd w piśmiennictwie mysich linii komórkowych raka gruczołu sutkowego: EpH4 1424, EpH4 1424.1 i EpH4 1424.2. Różnice funkcjonalne oceniono poprzez przeszczepienie myszom komórek nowotworowych drogą ortotopową, a następnie obserwację ich zdolności do wykształcenia guza i tworzenia przerzutów. Liczba komórek została dobrana tak, aby nowotwory te charakteryzowały się podobnym tempem wzrostu.

Angiogeneza jest bardzo istotnym zjawiskiem umożliwiającym proces przerzutowania, dlatego kolejnym etapem badań była ocena unaczynienia guzów. Pomiar perfuzji guza w czasie rzeczywistym przeprowadzono przy pomocy metody ultrasonograficznej. Uzyskane wyniki dotyczące funkcjonalności naczyń zostały potwierdzone poprzez podanie zwierzętom

z nowotworem barwnik fluorescencyjny IRDye® 800CW PEG, który dzięki zwiększonej przepuszczalności naczyń krwionośnych w guzie selektywnie akumuluje się w obrębie tkanki nowotworowej. W kolejnych punktach czasowych obserwowano stopniowy wzrost intensywności fluorescencji wraz z przenikaniem barwnika przez naczynia. W badaniach własnych, po dożylnym podaniu myszom kontrastu, w guzie 4T1 oraz guzach EpH4 można było zaobserwować obszary do których nie docierał kontrast. Takie obszary mogą być rejonami objętymi martwicą na skutek niedotlenienia. Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie tego zjawiska w kontekście agresywności-przerzutowana nowotworu.

Istnieją dane literaturowe, iż angiogeneza i stan zapalny to dwa ściśle powiązane procesy. Pomimo, że u ich podstaw leżą odrębne i niezależne mechanizmy, procesy te wpływają na siebie wzajemnie. Ponadto, pojawiają się coraz to nowsze doniesienia które popierają teorie mówiące o tym, że proces angiogenezy której towarzyszy przewlekły stan zapalny ma tendencję do przedłużania i wzmacniania odpowiedzi zapalnej. Aby potwierdzić te założenia, dokonano analizy wybranych parametrów morfologicznych krwi w poszczególnych punktach czasowych eksperymentu. Analiza wykazała, że u myszy z nowotworem przerzutującym 4T1 dochodziło do sukcesywnego wzrostu liczby limfocytów, monocytów oraz granulocytów we krwi obwodowej, co potwierdziło dane zawarte w piśmiennictwie. Podczas gdy, u myszy z nowotworem nieprzerzutującym 67NR poziom leukocytów nieznacznie odbiegał od poziomu leukocytów u zdrowych myszy kontrolnych przez cały okres trwania doświadczenia. Agresywność przerzutowania może wiązać się również z aktywnością układu immunologicznego, który eliminuje krążące komórki nowotworowe. Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie kluczowych mechanizmów odpowiedzi układu odpornościowego w procesie nowotworzenia oraz możliwe zastosowanie immunoterapii nowotworów raka piersi, w tym „triple-negative breast cancer” - potrójnie ujemnego raka piersi.

Rozwijający się stan zapalny oraz niedotlenienie wpływają na mikrośrodowisko guza, prowadząc do uruchomienia syntezy podstawowych czynników transkrypcyjnych HIF. HIF1 α aktywuje ekspresję genów dla VEGF, FGF i PDGF, które są istotne w procesie tworzenia sieci naczyń. VEGF jest silnym stymulatorem angiogenezy, posiada różne izoformy, jedną z nich jest VEGF-A który silnie indukuje przepuszczalność naczyń przez aktywację VEGFR-2. Dlatego, w pracy doktorskiej dokonano oznaczenia stężenia tego białka w osoczu, tkance nowotworowej oraz płytach krwi przy pomocy testów ELISA. Wykazano, że stężenie VEGF w osoczu myszy z nowotworem nieprzerzutującym 67NR utrzymywało się na podobnym poziomie jak u myszy kontrolnych. Natomiast, u myszy z nowotworem przerzutującym 4T1 obserwowano wzrost stężenia



VEGF w osoczu w porównaniu do stężenia VEGF u myszy kontrolnych, co jest zgodne z danymi zawartymi w piśmiennictwie mówiącymi o podwyższonym poziomie VEGF u pacjentów z rakiem gruczołu piersiowego. Przepuszczalny i heterogeniczny układ naczyniowy ułatwia ekstrawazację i przechodzenie komórek nowotworowych do nowych tkanek. Stan unaczynienia w obserwowanych guzach potwierdza zatem dane, że jakość i gęstość naczyń krwionośnych guza koreluje ze zwiększonym potencjałem przerzutowym. Porównując uzyskane przez Doktorantkę wyniki przepływu krwi w guzie 4T1 o cechach nowotworu przerzutuującego, w odniesieniu do modelu EpH4 1424 nieprzerzutuującego zaobserwowano, że guzy EpH4 1424 charakteryzują się o połowę mniejszym ukrwieniem. Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie tego mechanizmu, czy może to świadczyć o tym, że naczynia w modelu EpH4 są znacznie słabiej rozwinięte, czy może to mieć związek z poziomem ekspresji VEGF?

Wydajność procesu przerzutowania zależy nie tylko od gęstości i przepuszczalności naczyń, ale jest również bezpośrednio związana z aktywnością płytek krwi a w szczególności ze zdolnością komórek nowotworowych do tworzenia agregatów z płytkami. W badaniach uzyskanych w ramach realizacji doktoratu, u myszy z nowotworem nieprzerzutującym 67NR odnotowano nieznacznie podwyższony poziom płytek. Natomiast, u myszy z nowotworem przerzutującym 4T1 odnotowano sukcesywny wzrost liczby płytek krwi w porównaniu do myszy kontrolnych oraz do myszy z nowotworem 67NR. Wydajność procesu przerzutowania zależy nie tylko od gęstości i przepuszczalności naczyń, ale jest również bezpośrednio związana z aktywnością płytek krwi, a w szczególności ze zdolnością komórek nowotworowych do tworzenia agregatów z płytkami. Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie, jakie znaczenie ma to zjawisko w aspekcie odpowiedzi układu immunologicznego na krążące komórki nowotworowe.

Intrawazacja komórek nowotworowych wymaga nie tylko utraty połączeń międzykomórkowych, ale uzależniona jest także od zmian powinowactwa do komponentów ECM takich jak kolagen, fibronektyna, fibrynogen, witronektyna i laminina. Badania własne przeprowadzone przez Doktorantkę wykazały, że RBP4 w znaczący sposób obniża adhezję komórek 4T1 do kolagenu typu IV. Uzyskane wyniki uzupełniają się z danymi dotyczącymi migracji. W przebiegu badań przeprowadzonych przez Doktorantkę wykazano, że RBP4 działa również bezpośrednio na komórki nowotworowe zwiększając ich zdolność do migracji. Inkubacja komórek 4T1 IR z RBP4 w sposób istotny wpływała na zwiększenie liczby komórek nowotworowych w płucach myszy doświadczalnych w stosunku do grupy kontrolnej, która otrzymała komórki nieinkubowane z RBP4. Inkubacja komórek z 67NR z RBP4 nie wpływała natomiast znacząco na zasiedlanie płuc w stosunku do grupy kontrolnej, która otrzymała komórki



nieinkubowane z RBP4. Uzyskane wyniki potwierdziły, że RBP4 może oddziaływać nie tylko na komórki śródbłonna, ale też na komórki nowotworowe a efekty te sumują się zwiększając efektywność procesu przerzutowania. Analizy procesu transformacji nowotworowej wskazują, iż jedynie 0,01 % komórek opuszcza miejsce guza pierwotnego, co może mieć związek z koniecznością aktywacji czynników zaangażowanych w przebudowę oraz degradację macierzy zewnątrzkomórkowej – ECM. Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie kluczowych mechanizmów decydujących o wzroście guza i procesie powstania przerzutów związanych z macierzą zewnątrzkomórkową, ECM.

Bardzo ważnym aspektem klinicznym pracy było badanie z udziałem pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem piersi. Doświadczenia z udziałem pacjentek prowadzono za zgodą Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu. Próbkę krwi zostały pobrane od 51 pacjentek w różnym stadium nowotworu gruczołu piersiowego w Dolnośląskim Centrum Onkologii we Wrocławiu DCO. Pacjentki zostały podzielone na trzy grupy według stadium nowotworu gruczołu piersiowego: pacjentki bez przerzutów, pacjentki z przerzutami w węzłach chłonnych i pacjentki z odległymi przerzutami tzw. nowotworem rozsianym, grupę kontrolną stanowiło 14 kobiet. Ponadto, od pacjentek bez przerzutów i z przerzutami do węzłów podczas operacji usunięcia guza pobrano jego fragment. Fragmenty guza były zamrażane w ciekłym azocie, a następnie przygotowywano z nich homogenaty, które posłużyły do oznaczenia wybranych markerów za pomocą testów ELISA.

Liczne badania wykazały, że RBP4 odgrywa istotną rolę w rozwoju niektórych typów nowotworów, takich jak rak płuca, trzustki, okrężnicy, jajników prostaty oraz rak wątrobowokomórkowy. Przeprowadzone przez Doktorantkę badania własne wskazały na wzrost poziomu RBP4 w osoczu u myszy zarówno z nowotworem 4T1 jak i 67NR. Dwukrotnie większe stężenie RBP4 w osoczu myszy z nowotworem przerzutującym 4T1, w porównaniu od stężenia RBP4 w osoczu myszy z nowotworem nieprzerzutującym 67NR dało podstawy sądzić, że RBP4 nie tylko ma związek z powstawaniem nowotworu, ale też może być bezpośrednio zaangażowane w proces przerzutowania. Wyniki te zostały potwierdzone w osoczu pacjentek z rakiem gruczołu piersiowego. U pacjentek bez przerzutów zaobserwowano jedynie nieznaczne podwyższenie stężenia RBP4 w osoczu. Natomiast, u pacjentek z przerzutami do węzłów chłonnych stężenie RBP4 było istotnie wyższe w stosunku do pacjentek bez przerzutów oraz do stężenia RBP4 u zdrowych osób, a najwyższy poziom RBP4 obserwowano w grupie pacjentek z nowotworem rozsianym. Dlatego, należy podkreślić wyniki badań przeprowadzonych przez Doktorantkę które wykazały, że stężenie RBP4 nie tylko podnosi się u pacjentek z rakiem gruczołu piersiowego, ale



co bardzo istotne poziom RBP4 koreluje z stopniem zaawansowania nowotworu gruczołu piersiowego. Oznacza to, że uruchomienie szlaków sekrecyjnych dla białka RBP4 odbywa się na wczesnym etapie progresji nowotworowej, co może sprzyjać powstawaniu przerzutów. Należy podkreślić, że jest to niezwykle ważne oznaczenie z punktu widzenia diagnostyki raka gruczołu piersiowego oraz przyszłych strategii terapeutycznych, ponieważ wczesne rozpoczęcie leczenia może być kluczowe dla efektywności terapii przeciwnowotworowej.

Chociaż dokładne mechanizmy prowadzące do uwalniania RBP4 w chorobie nowotworowej nie są jasne, coraz więcej badaczy jest przekonanych, że hiperinsulinemia i hiperglikemia są ważnymi regulatorami uczestniczącymi w rozwoju raka. W ciągu ostatnich lat w wielu badaniach analizowano ten związek i wykazano, że obecność zespołu metabolicznego prowadzącego do rozwoju cukrzycy typu 2 jest ściśle związana ze wzrostem częstości występowania raka jelita grubego, wątroby, trzustki oraz gruczołu piersiowego, co stało się przyczynkiem do realizacji celów pracy doktorskiej Pani mgr Diany Papiernik. Z tego względu, dokonano oznaczenia stężenia IGF-1 i insuliny w osoczu myszy. Wyniki badań własnych przeprowadzonych przez Doktorantkę wykazały, że w czasie progresji nowotworu dochodzi do spadku stężenia IGF-1 w osoczu zwierząt z nowotworem, w porównaniu z grupą kontrolną. Ponadto, w badaniach przeprowadzonych przez Doktorantkę z udziałem pacjentek z rakiem gruczołu piersiowego, odnotowano najniższe stężenie IGF-1 w grupie pacjentek z nowotworem rozsiałym. Przeprowadzone badania nad insulinopornością wykazały korelację IGF-1 z cukrzycą typu 2. Należy jednak zwrócić uwagę, iż w grupie badanych pacjentek znajdowały się również pacjentki z cukrzycą co mogło zaburzyć ocenę stężenia IGF-1, dlatego eksperymenty należy kontynuować.

Podsumowując, realizacja pracy doprowadziła do następujących wniosków: 1) RBP4 oddziałuje zarówno na komórki śródbłónka, jak i komórki nowotworowe, a efekty te sumują się, stymulując tworzenie przerzutów; 2) RBP4 w sposób pośredni wpływa na proces angiogenezy poprzez uszkodzenie śródbłónka naczyń, w wyniku czego dochodzi do sekrecji białek proangiogennych. Wykształcenie się sieci gęstych przepuszczalnych naczyń oplatających guz ułatwia komórkom nowotworowym przejście do krążenia; 3) Nadekspresja RBP4 w komórkach nowotworowych promuje proces przerzutowania prawdopodobnie poprzez zwiększenie ich zdolności inwazyjnych i kolonizacyjnych odległych tkanek; 4) Przedstawione badania mogą mieć również praktyczne zastosowanie. Różnice w stężeniu RBP4 w osoczu pomiędzy osobnikami z nowotworem przerzutującym, jak i nieprzerzutującym sugerują, że RBP4 może być potencjalnie markerem nie tylko choroby nowotworowej, ale też może pomóc w określeniu stopnia jej zaawansowania.



Poddając ocenie rozprawę doktorską mgr Diany Papiernik należy ze szczególnym uwzględnieniem podkreślić wartościowy pod względem badań podstawowych, ale przede wszystkim możliwości wykorzystania wyników w praktyce klinicznej temat pracy, który odzwierciedla bardzo wysoką aktywność oraz dojrzałość zawodową Doktorantki. Potwierdzeniem tego sukcesu są oryginalne wyniki uzyskane podczas realizacji pracy doktorskiej, które wyznaczają pionierskie kierunki badań związane z egiptologia raka piersi.

Dlatego, chciałbym podkreślić, że dysertacja Pani mgr Diany Papiernik stanowi przykład doskonałego modelu współpracy Pani prof. dr hab. Joanny Wietrzyk oraz Doktorantki, która korzystając z wieloletniego doświadczenia oraz bogatego warsztatu naukowego swojego Promotora osiągnęła wymierne efekty, które z całą pewnością określić można miarą sukcesu. Dodatkowym, bardzo ważnym wyznacznikiem wartości uzyskanych wyników i podjętej tematyki pracy doktorskiej jest ich finansowanie w ramach konkursów ze źródeł zewnętrznych. Projekt realizowany był w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, Program Strategiczny STRATEGMED.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 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 z późn. zm.). Z przyjemnością, przedkładam do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, Polskiej Akademii Nauk wniosek, o dopuszczenie Pani mgr Diany Papiernik do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz ze względu na wysoki poziom naukowy tej dysertacji wnioskuję, o wyróżnienie recenzowanej pracy doktorskiej.

Z poważaniem,

KIEROWNIK
Międzywydziałowej Katedry
Chemii i Biochemii Medycznej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterek