

Załącznik nr 2. Autoreferat (w języku polskim)

AUTOREFERAT

I. Imię i nazwisko:

Vladimir Bobek

II. Wykształcenie i przebieg pracy zawodowej

Wykształcenie i stopnie naukowe:

1999: ukończenie studiów medycznych na 3. Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Karola w Pradze

2002: uzyskanie specjalizacji I-go stopnia z chirurgii ogólnej

2004: uzyskanie stopnia doktora nauk medycznych na podstawie rozprawy pt. *Wpływ leków przeciwzakrzepowych na proces powstawania przerzutów nowotworowych*. Promotor: Prof. Josef Kovarik

Staż i szkolenia specjalistyczne:

2002: European School of Thoracic Surgery, Bergamo, Włochy

2002: Szkolenie na Wydziale Biologii Molekularnej Szpitala Św. Małgorzaty, Toronto, Kanada

2004: Staż na Oddziale Chirurgii Klatki Piersiowej Szpitala Brompton, Londyn, Wielka Brytania

2002-2005, 2010-2012: Cykle szkoleń na Uniwersytecie Kalifornijskim, San Diego, USA

2006: Staż na Oddziale Chirurgii Klatki Piersiowej Szpitala Miejskiego w Nottingham, Wielka Brytania

2002 - do chwili obecnej: regularne, długoterminowe wizyty i staże w Katedrze i Klinice Chirurgii Klatki Piersiowej w Dolnośląskim Centrum Chorób Płuc we Wrocławiu

III. Zatrudnienie:

1999-2000: Katedra Chirurgii, Szpital Uniwersytecki, Ostrawa, Czechy

2000-2002: Oddział Chirurgii Szpitala w Vitkovie, Czechy

2000-2004: Katedra Onkologii i Radioterapii, Szpital Uniwersytecki *Kralovske Vinohrady*, Praga, Czechy

2002-do chwili obecnej: Katedra Chirurgii Klatki Piersiowej, Dolnośląskie Centrum Chorób Płuc, Wrocław

2005-do chwili obecnej: Kierownik Katedry Biologii Nowotworów, 3. Wydział Lekarski, Uniwersytet Karola, Praga, Czechy

2011-do chwili obecnej: Katedra Chirurgii, Szpital Uniwersytecki *Kralovske Vinohrady*, Praga, Czechy

IV. Osiągnięcie naukowe

Modele tworzenia ognisk metastatycznych w procesie rozsiewu nowotworów

Cykl 10-ciu publikacji pełnotekstowych opublikowanych w czasopismach z *Listy Filadelfijskiej* (IF: 19,981; KBN/MNiSW: 157).

Cykl ten obejmuje wyłącznie publikacje, w których jestem pierwszym bądź ostatnim (korespondencyjnym) autorem (9 artykułów z pozycją pierwszego autora, 1 praca jako „senior author”).

a) Lista artykułów pełnotekstowych tworzących cykl (autorzy, tytuły, czasopismo):

1. **Bobek V**, Kolostova K, Pinterova D, Boubelik M, Jiang P, Yang M, Hoffman RM: **Syngeneic lymph-node-targeting model of green fluorescent protein-expressing Lewis lung carcinoma**. Clin Exp Metastasis 21:705-708, 2004. **IF: 3,048**
2. **Bobek V**, Kolostova K, Pinterova D, Kacprzak G, Adamiak J, Kolodziej J, Boubelik M, Kubecova M, Hoffman RM: **A clinically relevant, syngeneic model of spontaneous, highly metastatic B16 mouse melanoma**. Anticancer Res 30:4799-4803, 2010. **IF: 1,656**
3. **Bobek V**, Kolostova K, Pinterova D, Boubelik M, Hoffman RM: **Development of new spontaneous metastatic heterotopic model of lewis lung carcinoma imaged by GFP expression**. Cancer Invest 29:692-695, 2011. **IF: 2.39**
4. **Bobek V**, Kolostova K, Pinterova D, Boubelik M, Gurlich R, Hoffman RM: **Tail spontaneous metastatic mouse model: comparison of metastatic potential of orthotopic and heterotopic models imaged by GFP and RFP protein**. In Vivo 25:849-852, 2011. **IF: 1,159**
5. **Bobek V**, Plachy J, Pinterova D, Kolostova K, Boubelik M, Jiang P, Yang M, Hoffman RM: **Development of a green fluorescent protein metastatic-**

- cancer chick-embryo drug-screen model.** Clin Exp Metastasis 21:347-352, 2004. **IF: 3,048**
6. Kolostova K, Pinterova D, Hoffman RM, **Bobek V: Circulating human prostate cancer cells from an orthotopic mouse model rapidly captured by immunomagnetic beads and imaged by GFP expression.** Anticancer Res 31:1535-1539, 2011. **IF: 1,656**
 7. **Bobek V**, Hoffman R.M., Kolostova K, **Site-specific cytomorphology of disseminated PC3-prostate cancer cells visualized in vivo with fluorescent proteins:** Diagnostic Cytopathology, 2012. **IF: 1,295**
 8. **Bobek V**, Boubelik M, Kovarik J, Taltynov O: **Inhibition of adhesion breast cancer cells by anticoagulant drugs and cimetidine.** Neoplasma 50:148-151, 2003. **IF: 0,782**
 9. **Bobek V**, Boubelik M, Fiserova A, L'uptovcova M, Vannucci L, Kacprzak G, Kolodziej J, Majewski AM, Hoffman RM: **Anticoagulant drugs increase natural killer cell activity in lung cancer.** Lung Cancer 47:215-223, 2005. **IF: 3,172**
 10. **Bobek V**, Kovarik J: **Antitumor and antimetastatic effect of warfarin and heparins.** Biomed Pharmacother 58:213-219, 2004. **IF: 2,208**

b) Opis celu badań oraz publikacji i wyników

Wstęp

Przerzutowanie (metastaza), czyli rozsiew komórek nowotworowych z ogniska pierwotnego jest wciąż jednym z najistotniejszych problemów współczesnej onkologii. Z uwagi na biologiczną złożoność procesu przerzutowania, niezwykle trudny jest dobór właściwych metod badania tego zjawiska. Wydaje się, że jedynie zwierzęce modele indukcji rozsiewu nowotworowego są w stanie w najbardziej zbliżonym stopniu, naśladować przebieg procesu przerzutowania, który jest obserwowany w organizmie ludzkim. Opis poniższych publikacji jest podsumowaniem moich osiągnięć w tej dziedzinie.

Początek mojej aktywności naukowej obejmował badania nad zwierzęcymi modelami tworzenia ognisk przerzutowych, które szczególnie skupiały się na poszukiwaniu modeli o wysokim potencjale metastatycznym drogą angiogenną oraz poprzez naczynia limfatyczne. Opracowywane modele były udoskonalane i wykorzystywane w codziennej praktyce w laboratorium naukowym. Dodatkowo, podjęto próby scharakteryzowania molekularnych etapów procesu kaskady metastatycznej oraz generowania nowych substancji biologicznie czynnych, które hamowałyby określone etapy tego niezwykle złożonego procesu.

Ostatnie lata mojej aktywności naukowej były poświęcone zagadnieniu nowotworowych komórek krążących (*circulating tumor cells*, CTCs). Z powodzeniem udało się skonstruować system *in vitro* przeznaczony do prowadzenia hodowli oraz namnażania CTCs, które następnie były wykorzystywane w testach wrażliwości na rutynowo stosowane chemioterapeutyki. Opracowana przez mój zespół metoda hodowli oraz rezultaty naszych badań mogą być bardzo pomocne w dalszych badaniach nad zagadnieniem CTCs, szczególnie w kontekście teoretycznego opisu procesu metastazy oraz prób generowania nowych leków przeciwnowotworowych, które hamowałyby ściśle określony cel molekularny.

Konkludując, moje zainteresowania naukowe w dużej mierze ogniskują się możliwościach potencjalnych ingerencji terapeutycznych w proces przerzutowania poprzez wpływ na adhezję komórkową, odpowiedź immunologiczną oraz proliferację komórek nowotworowych.

I. Modele powstawania przerzutów nowotworowych

Historycznie, zwierzęce modele nowotworowe, które służyły jako baza do badań nad procesem metastazy, opierały się na pozyskiwaniu komórek z szybko rosnących guzów pierwotnych, które były podskórnie wstrzykiwane w miejsca heterotopowe. Badania ostatnich lat wykazały, że podskórne iniekcje komórek nowotworowych (szczególnie raka piersi, nerki oraz jelita grubego) rzadko prowadzą do wystąpienia uogólnionej choroby nowotworowej, co jest sprzeczne z naturalną historią tych jednostek chorobowych.

Najprostszą, a zarazem najbardziej efektywną metodą, która naśladuje proces powstawania ognisk przerzutowych jest bezpośrednio wstrzykiwanie komórek nowotworowych do krążenia obwodowego. Pierwszy protokół stosujący tę metodę obejmował iniekcje do żyły ogonowej myszy. Należy zaznaczyć, że w większości przypadków powstałe ogniska metastatyczne były ograniczone wyłącznie do płuc, co jest związane z ich mechaniczną translokacją z prądem krwi oraz ich zablokowaniem w krążeniu płucnym. Jednak sprzeczne rezultaty innych badań jasno wykazały brak korelacji pomiędzy zdolnością tworzenia płucnych ognisk przerzutowych oraz zajmowania innych lokalizacji narządowych. Wymaga to dalszych badań z uwagi na wciąż napływające, niejednoznaczne rezultaty.

Eksperymentalne modele przerzutowania mają wiele zalet w kontekście badania rozsiewu nowotworowego. Tzw. model dojrzałości (*maturity model*) jest szybki do przeprowadzenia, biologia wygenerowanych przerzutów jest w wysokim stopniu powtarzalna, a badacz ma pełną kontrolę nad liczbą i jakością komórek, które są wstrzykiwane do krwioobiegu. Jednak potencjalną wadą powyższego schematu jest utrata pierwszych etapów procesu metastazy. Uważa się, że znaczna pula komórek przerzutuje poprzez naczynia krwionośne tworząc w nich zatory zbudowane z komórek nowotworowych z ogniska pierwotnego w kooperacji z komórkami organizmu gospodarza. Po iniekcjach do żyły ogonowej, komórki krążą jako pojedyncze elementy autonomiczne, albo skupione w gniazdach komórkowych. Należy zaznaczyć, że te pojedyncze, wyizolowane komórki mogą nie prezentować pełnych właściwości metastatycznych, co wiąże się z możliwym brakiem reakcji z narządami docelowymi, w przeciwieństwie do zjawiska obserwowanego pierwotnie *in vivo*.

Początkowe badania nad przeszczepialnymi modelami nowotworów dotyczyły wszczepiania i hodowli komórek nowotworowych w lokalizacji podskórnej (jako ognisko heterotopowe). W tym modelu badawczym rzadko obserwowano spontaniczne przerzuty do narządów wewnętrznych (stąd dawna nazwa modelu przeszczepialnego jako nieprzerzutującego). Kluczowe znaczenie dla rozwoju badań nad zwierzęcymi modelami przerzutowania nowotworów miało zastosowanie hipotezy „nasion i gleby”, która zaowocowała rozwojem ortotopowej transplantacji komórek nowotworowych do anatomicznych lokalizacji tkanek, z których zostały pierwotnie wyhodowane. Ortotopowy model transplantacji nowotworów w znacznie większym stopniu zbliża uzyskane środowisko eksperymentalne do natywnego, obserwowanego w onkologii klinicznej (właściwa histologia, mikrośrodowisko, unaczynienie). Dodatkowo wykazano, że ortotopowy model wiąże się w znacznie większym stopniu z obecnością spontanicznych przerzutów w porównaniu z modelem opartym na podskórnej iniekcji komórek nowotworowych. Z technicznego punktu widzenia przeszczep ortotopowy może polegać na bezpośredniej iniekcji komórek nowotworowych albo na chirurgicznym przeszczepianiu fragmentów tkankowych nowotworu (*surgical orthotopic implantation, SOI*).

Iniekcje zawiesin komórek nowotworowych prowadzą wprawdzie do powstawania przerzutów zarówno drogą naczyń chłonnych jak i krwionośnych, jednak metoda ta obarczona jest kilkoma wadami. Jedną z nich jest konieczność używania wyselekcjonowanych linii komórkowych, co znacznie utrudnia jej praktyczną implementację. Co ciekawe, guzy nowotworowe wygenerowane poprzez wstrzykiwanie zawiesin komórek nowotworowych wykazują mniejszy potencjał metastatyczny niż uzyskane metodą SOI.

Model generowania mysich nowotworów przy wykorzystaniu chirurgicznego przeszczepiania fragmentów tkankowych (SOI) jest najlepszą metodą, która w sposób bardzo zbliżony odzwierciedla model nowotworów ludzkich oraz sposoby ich przerzutowania. Ważnym elementem limitującym dostępność techniki SOI jest wymagany wysoki poziom umiejętności chirurgicznych, które umożliwiają właściwą lokalizację materiału tkankowego. Procedura ta jest dużo bardziej skomplikowana oraz czasochłonna, a także wymaga znacznie większych nakładów finansowych niż klasyczne iniekcje podskórne.

W badaniu opisanym w artykule: **Bobek V, Kolostova K, Pinterova D, Boubelik M, Jiang P, Yang M, Hoffman RM: Syngeneic lymph-node-targeting model of green fluorescent protein-expressing Lewis lung carcinoma. Clin Exp Metastasis 21:705-708, 2004. IF:3,048** celem pracy było wygenerowanie i dokładne opisanie modelu przerzutowania mysiego raka płuca (*Lewis lung carcinoma*) o wysokim potencjale metastatycznym z wyraźną predylekcją do węzłów chłonnych. Komórki nowotworowe znakowane barwnikiem fluorescencyjnym (*green fluorescent protein, GFP*) zostały przeszczepione w grzbietową okolicę uszu myszy C57B/L6. Przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego wykazano istnienie rozległych ognisk przerzutowych zarówno w węzłach chłonnych, jak i narządach wewnętrznych. Przerzuty były oceniane po 3 i 5 tygodniach od wszczepienia komórek nowotworowych. Szczególnie wysoką częstość występowania ognisk metastatycznych ujawniono w węzłach okolicy szyjnej, węzłach osiowych, śródpiersia oraz węzłach nadnerczowych. Całościowo, wykazano 21 różnych regionów, w których był stwierdzany sygnał w mikroskopii fluorescencyjnej - najsilniej wyrażony w węzłach chłonnych, jednak obserwowano także ogniska mikrometastatyczne w wielu narządach, m.in. śliniankach, tarczycy, śledzionie, wątrobie.

Podobna technika była wykorzystana w kolejnym badaniu opisanym w artykule: **Bobek V, Kolostova K, Pinterova D, Kacprzak G, Adamiak J, Kolodziej J, Boubelik M, Kubecova M, Hoffman RM: A clinically relevant, syngeneic model of spontaneous, highly metastatic B16 mouse melanoma. Anticancer Res 30:4799-4803, 2010. IF: 1,656.** Bazując na opisanym wcześniej syngenicznym modelu rozsiewu raka płuc, w tej pracy przedstawiono model rozsiewu czerniaka z wykorzystaniem iniekcji w okolicę ucha (pomiędzy skórę i chrząstkę po grzbietowej stronie) zawiesiny komórek czerniaka pochodzących z linii komórkowej B16-F10 o wysokim potencjale metastatycznym. Analizowany model doświadczalny w pełni pokrywał się z klinicznym przebiegiem czerniaka. Całkowita liczba ognisk przerzutowych była sumą mikro- i makroprzerzutów. Objętość guza była mierzona 4 tygodnie po podskórnej iniekcji w grupie 1. oraz po 6 tygodniach w grupie 2. Analiza statystyczna wykazała istotną statystycznie korelację pomiędzy czasem wzrostu guza i jego objętością oraz liczbą zajętych przerzutowo węzłów chłonnych i

narządów wewnętrznych. Odległe mikroprzerzuty były obserwowane u wszystkich myszy po 4 tygodniach od iniekcji zawiesiny komórek czerniaka. Podobnie jak w przypadku modelu raka płuca, łącznie zaobserwowano 21 różnych miejsc przerzutowych. W przypadku modelu czerniakowego B16-F10 komórki nowotworowe były łatwe do zobrazowania z uwagi na produkcję melaniny.

Przedmiotem kolejnych dwóch artykułów była weryfikacja hipotezy mówiącej o kluczowej roli pierwotnej lokalizacji guza na proces tworzenia ognisk przerzutowych. W artykule: **Bobek V, Kolostova K, Pinterova D, Boubelik M, Hoffman RM: Development of new spontaneous metastatic heterotopic model of Lewis lung carcinoma imaged by GFP expression. Cancer Invest 29:692-695, 2011. IF: 2.39** opisano doświadczenie z heterotopową transplantacją komórek raka płuca (*Lewis lung cancer*) do mysiej hodowli C57BL/6. Komórki nowotworowe (5×10^6 komórek/mL, w całkowitej objętości 0.1 mL) były wstrzykiwane podskórnice w grzbietową część ogona, średnio 1 cm od tułowia. Badane myszy były podzielone na dwie podgrupy: analizowane po 3 i 5 tygodniach od iniekcji. Objętość guza (T_v) była liczona wg wzoru $T_v = a(b^2)/2$, gdzie parametr a oznacza długość guza w mm, b szerokość w mm. Do badań pobrano węzły chłonne i narządy wewnętrzne, szczególnie z regionów szyi i klatki piersiowej. Co najmniej 3 ogniska mikroprzerzutów lub jedno ognisko makroprzerzutu musiały być stwierdzone, aby badany fragment tkankowy uzyskał pozytywny status w kontekście obecności ognisk przerzutowych. Całkowita liczba przerzutów stanowiła sumę obserwowanych makroprzerzutów i była skorelowana z objętością guza. Badany heterotopowy model przerzutowy generował w 100% przypadków ogniska metastazy węzłowej i odległej. U zwierząt z dużym guzem pierwotnym wykazano ogniska makroprzerzutów w węzłach chłonnych oraz przerzuty do narządów wewnętrznych. Zaobserwowano korelacje pomiędzy objętością guza pierwotnego i czasem trwania wzrostu oraz liczbą przerzutów węzłowych i odległych. Ten nowy model przerzutowania może być przydatny dla teoretycznych rozważań dotyczących procesu przerzutowania i potencjalnego generowania nowych leków ukierunkowanych molekularnie.

W drugim artykule o podobnej tematyce **Bobek V, Kolostova K, Pinterova D, Boubelik M, Gurlich R, Hoffman RM: Tail spontaneous metastatic mouse model: comparison of metastatic potential of orthotopic and heterotopic models**

imaged by GFP and RFP protein. In Vivo 25:849-852, 2011. IF: 1,159, zostały porównane dwa modele przerzutowania: heterotopowy model raka płuca (*Lewis lung cancer*) oraz ortotopowy model czerniaka. Myszy zostały podzielone na dwie grupy zgodnie z odmiennym typem nowotworu. Analiza następowała po 4 tygodniach od iniekcji. Procedura pobierania i definicji przerzutów została opisana wyżej. Całkowita liczba przerzutów była skorelowana z objętością guza. Dodatkowo przeprowadzono obrazowanie całego ciała badanych zwierząt umieszczając je we fluorescencyjnym dyfuzorze ze światłowodowym źródłem światła o długości 490 nm. Wysoki potencjał metastatyczny był obserwowany w obu grupach zwierząt – nie zaobserwowano żadnych istotnych statystycznie różnic. Porównano ilościowo oraz lokalizacyjnie procesy nowotworowe w obu grupach. W modelu heterotopowym średnia objętość guza pierwotnego wynosiła 167 mm³, z kolei w modelu ortotopowym czerniaka 173 mm³. Powyższe badania sugerują, że istotniejsze wydają się być dla wzrostu potencjału metastatycznego lokalne warunki, w których wzrasta nowotwór niż histologiczna specyfikacja guza pierwotnego.

W naszych eksperymentach używaliśmy komórek nowotworowych znakowanych zielonym białkiem fluorescencyjnym (*green fluorescent protein, GFP*). Obrazowanie *in vitro* z wykorzystaniem sond emitujących światło, takich jak GFP jest niezwykle przydatnym narzędziem w rękach badacza, które umożliwia zobrazowanie pojedynczych komórek nowotworowych i bardziej detaliczną charakterystykę procesu metastazy. **Mój zespół badawczy po raz pierwszy na świecie wykorzystał obrazowanie z użyciem GFP w modelu przerzutowania z udziałem zarodków kurzych.** Zarodki kurze mają bardzo długą tradycję w onkologii doświadczalnej, jako bardzo przydatne modele przerzutowania. Wizualizacja z wykorzystaniem GFP spowodowała ponowny wzrost zainteresowania badaczy zarodkami kurzymi, jako dogodnymi modelami obserwacji generowania przerzutów nowotworowych. Zagadnienie to zostało opisane w poniższym artykule: **Bobek V, Plachy J, Pinterova D, Kolostova K, Boubelik M, Jiang P, Yang M, Hoffman RM: Development of a green fluorescent protein metastatic-cancer chick-embryo drug-screen model. Clin Exp Metastasis 21:347-352, 2004 IF: 3,048.** Wprowadzenie obrazowania GFP znacznie poprawiło jakość obserwacji przerzutów nowotworowych, poprzez zwiększoną rozdzielczość obrazu oraz jego stabilizację. W analizowanym trzyczęściowym badaniu komórki raka płuca (*Lewis lung carcinoma*) wykazujące

ekspresję GFP zostały wstrzyknięte 12-go dnia inkubacji zarodkom kurzym. W pierwszym eksperymencie wstrzykiwano zarodkom 1×10^6 komórek raka płuca razem z gemcytabiną (30 mg/kg) lub streptokinazą (2000 IU na każdy zarodek) albo wstrzykiwano oba leki jednocześnie. Drugi eksperyment obejmował trzy dawki komórek: 2×10^5 , 4×10^5 oraz 1×10^6 , które były wstrzykiwane razem gemcytabiną (50 mg/kg), streptokinazą (2000 IU na każdy zarodek) lub ich kombinacjami. Trzecia część obejmowała iniekcje 4×10^5 komórek w połączeniu z 10 mg/kg gemcytabiny oraz 2000 IU streptokinazy. Zarodki kurze były uśmiercane w 19-tym dniu inkubacji (7 dni po dożylnych iniekcjach komórek nowotworowych i lekach). Próbki tkankowe z kości i narządów wewnętrznych, takich jak: mózg, mostek, serce oraz węzły chłonne zostały poddane analizie w mikroskopie fluorescencyjnym. Całościowe obrazowanie kurzych zarodków zostało wykonane przy użyciu fluorescencyjnego dyfuzora ze światłowodowym źródłem światła (Lighttools Research, Encinitas, California) oraz aparatu Nikon Coolpix 5000. Wykazaliśmy, że iniekcje z zawiesiny liczących 4×10^5 oraz 1×10^6 komórek skutkują powstaniem dużej liczny zmienionych przerzutowo węzłów chłonnych oraz obecnością przerzutów odległych w kościach, mózgu i sercu. Wstrzykiwanie 2×10^5 komórek generowało niewielkie ogniska węzłowej metastazy, a patrząc całościowo, przerzuty znajdowane były w około 25% przypadków. Co interesujące, jednoczesne podawanie gemcytabiny i streptokinazy hamowało powstawanie przerzutów we wszystkich lokalizacjach. Wykazano, że efektywna dawka gemcytabiny to 10 mg/kg, a streptokinazy 2000 IU. **Głównym wnioskiem płynącym z powyższego badania jest odkrycie nowego modelu przerzutowania, który może posłużyć jako element eksperymentów z wykorzystaniem testowanych, nowych leków przeciwnowotworowych. Olbrzymią zaletą tej metody jest niski koszt prowadzenia badań oraz szybki czas generowania ognisk przerzutowych (7-10 dni).**

II. Krążące komórki nowotworowe (*circulating tumor cells, CTCs*)

Sugeruje się, że krążące komórki nowotworowe są potencjalnymi prekursorami przerzutów nowotworowych. CTCs są swoistym pomostem między ogniskiem pierwotnym a przerzutem odległym. Obecnie są stosowane jako prognostyczne i predykcyjne markery w niektórych nowotworach. W moich badaniach skupiałem się nie tylko na poszukiwaniu nowych modeli przerzutowania o wysokim potencjale metastatycznym, ale także na opisanu i teoretycznej charakterystyce złożonego procesu rozsiewu nowotworu.

W naszej publikacji: *Kolostova K, Pinterova D, Hoffman RM, Bobek V: Circulating human prostate cancer cells from an orthotopic mouse model rapidly captured by immunomagnetic beads and imaged by GFP expression. Anticancer Res 31:1535-1539, 2011. IF: 1,656*, opisaliśmy zastosowanie immunomagnetycznych sensorów (*immunomagnetic beads*) do stosunkowo szybkiego i łatwego izolowania oraz obrazowania CTCs z ortotopowego modelu raka prostaty wykazującego ekspresję GFP (PC-3). Model GFP-PC-3 jest generowany poprzez chirurgiczną implantację ludzkiego raka prostaty do specyficznie zmodyfikowanych genetycznie myszy (*nude mice*). Krew zwierząt (0.5-1.0 ml) z wszczepionym rakiem prostaty była pozyskiwana drogą punkcji serca. Immunomagnetyczne sensory umożliwiają przyciągnięcie specyficznych komórek o wybranym profilu antygenowym. W badaniu tym sensory były opłaszczane antygenami przeciwko EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) oraz HER2 (*human epidermal growth receptor-2*). CTCs GFP-dodatnie były izolowane przez 15 minut i następnie obserwowane w mikroskopie fluorescencyjnym. **Była to pierwsza przeprowadzona w takiej modyfikacji hodowla CTCs raka prostaty.** Dokładny opis hodowli i separacji CTCs w modelach zwierzęcych jest niezwykle istotny dla rozwoju dalszych badań nad nowotworowymi komórkami krążącymi. Być może to właśnie one staną się głównym celem terapii przeciwnowotworowej, jako ewentualna prewencja indukcji przerzutowania.

W kolejnym artykule: *Bobek V, Hoffman R.M., Kolostova K, Site-specific cytomorphology of disseminated PC3-prostate cancer cells visualized in vivo with fluorescent proteins: Diagnostic Cytopathology, 2012 IF 1,295 accepted IF:*

1,295 analizowano zmiany cytomorfologiczne komórek raka prostaty PC-3 w zależności od ich lokalizacji (komórki guza pierwotnego, CTCs, komórki z ognisk wtórnych (*disseminated tumor cells*, DTCs). Krew zwierząt w ilości 0.5-1.0 ml była pobierana drogą punkcji serca. Wszystkie przerzutowo zmienione narządy wewnętrzne były wypreparowane i podzielone na drobne fragmenty (1-3 mm³). Obecność komórek nowotworowych była stwierdzana przy wykorzystaniu mikroskopu fluorescencyjnego. CTCs oraz DTCs były relatywnie proste do wyizolowania oraz hodowli *in vitro*. Co istotne, hodowane komórki z różnych miejsc przerzutowych wykazywały odmienne cechy cytomorfologiczne, które utrzymywały się w trakcie trwania hodowli. Różne podtypy komórek odznaczały się jednak standardowymi cechami złośliwości histologicznej, obejmującymi m.in. wysoki wskaźnik jądro/cytoplazma (N/C) czy formowanie komórek olbrzymich. Dodatkowo zauważalne były różnice w wielkości, kształcie i liczbie jąder i jąderek. Obserwowano także pozorną, wzajemną fagocytozę komórek nowotworowych cechującą się charakterystycznymi inwaginacjami cytoplazmy. Te wszystkie spostrzeżenia morfologiczne jasno sugerują olbrzymią heterogenność guza nowotworowego. Nasze rezultaty są zgodne z hipotezą, że CTCs po odłączeniu się od guza pierwotnego stają się swoistymi prekursorami ognisk przerzutowych. Pleomorficzne CTCs i DTCs mogą reprezentować losowo wybrane fenotypy komórek składające się na obraz morfologiczny guza pierwotnego, które jednak z uwagi na pewne, nie do końca jasne zaburzenia molekularne są zdolne do tworzenia ognisk przerzutowych. To spostrzeżenie jest niezwykle istotne w kontekście kolejnych badań nad CTCs oraz zjawiskiem przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego.

III. Przebieg i etapy procesu przerzutowania nowotworów (*cancer metastatic cascade*)

Przerzutowanie jest niezwykle skomplikowanym procesem, który tradycyjnie podzielony jest na 4 główne etapy: (1) uwolnienie komórek nowotworowych z pierwotnej masy guza i inwazja tkanek otaczających, (2) wnikanie komórek nowotworowych do naczyń krwionośnych (limfatycznych) – intrawazacja, (3) adhezja krążących komórek guza do śródbłonka naczyniowego i następowa ekstrawazacja, (4) inwazja, neoangiogeneza i wzrost guza w miejscu zagnieżdżenia. Zdecydowana większość badań nad nowymi lekami przeciwnowotworowymi ogniskuje się na poszukiwaniu inhibitorów wybranego etapu metastazy. Nasz zespół testował wiele chemioterapeutyków, których zasadniczym celem było obniżenie potencjału metastatycznego wskutek ingerencji w tzw. kaskadę przerzutowania, opisaną wyżej.

W artykule: **Bobek V, Boubelik M, Kovarik J, Taltynov O: *Inhibition of adhesion breast cancer cells by anticoagulant drugs and cimetidine.* Neoplasma 50:148-151, 2003. IF: 1,449**, analizowano wpływ i porównywano efekty stosowania wybranych leków przeciwzakrzepowych na zdolności adhezyjne dwóch linii komórkowych raka piersi o wysokim potencjale inwazyjności (BT 549, MDA 231). Analizowane leki przeciwzakrzepowe objęły: heparynę niefrakcjonowaną, warfarynę, kwas acetylosalicylowy oraz heparyny drobnocząsteczkowe: nandroparynę, enoksaparynę, dalteparynę i reviparynę. Do powyższego doświadczenia wykorzystano także cymetydynę, która poprzez swój udział w metabolizmie cytochromu P450 wzmacnia działanie wyżej wymienionych leków przeciwzakrzepowych. Silny efekt antyadhezyjny był obserwowany po zastosowaniu cymetydyny, warfaryny oraz kwasu acetylosalicylowego. Co ciekawe, heparyny drobnocząsteczkowe w monoterapii miały znikomy wpływ na adhezję, z kolei w kooperacji z cymetydyną efekt antyadhezyjny był zauważalny. Obserwowano także różnice pomiędzy podtypami linii komórkowych a odpowiedzią na zastosowaną terapię. Najsilniej wyrażony efekt antyadhezyjny był stwierdzany w kombinacji cymetydyna-kwas acetylosalicylowy. Rezultaty badania jasno wskazują, że potencjał antyadhezyjny wszystkich analizowanych leków przeciwzakrzepowych ulega wzmocnieniu po dodatkowym zastosowaniu cymetydyny. Odpowiedni dobór antykoagulantów może obniżyć zdolności adhezyjne, neoangiogenezę jako efekty

skróconego czasu krzepnięcia krwi. Dotychczas wielu autorów postulowało związek pomiędzy krótkim czasem krzepnięcia i zdolnością do generowania przerzutów węzłowych i odległych. Konkludując, zgodnie z wynikami naszych badań stosowanie cymetydyny w kombinacji z antykoagulantami wzmacnia potencjał antyadhezyjny analizowanych linii komórkowych raka piersi i stanowi podwaliny do dalszej eksploracji tego nurtu badań.

Celem kolejnego badania: **Bobek V**, Boubelik M, Fiserova A, L'uptovcova M, Vannucci L, Kacprzak G, Kolodziej J, Majewski AM, Hoffman RM: **Anticoagulant drugs increase natural killer cell activity in lung cancer**. Lung Cancer 47:215-223, 2005. **IF: 3,172**, było określenie wpływu wybranych antykoagulantów (warfaryny, heparyny niefrakcjonowanej, heparyn drobnocząsteczkowych – enoksaparyny, reviparyny, nandroparyny, fraxiparyny i dalteparyny oraz kwasu acetylosalicylowego) na funkcjonalną aktywność komórek NK (natural killer) i ich cytotoksyczność u 28 wyselekcjonowanych pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca w stadium I-IIb, po trzech dniach leczenia. Cytotoksyczność była określona przed rozpoczęciem terapii oraz 24 godziny po ostatniej dawce leku przeciwzakrzepowego. Średnia wartość dla pacjentów z rakiem płuca przed leczeniem wyniosła $7.07 \pm 3.15\%$, co stanowiło 17% aktywności komórek NK u zdrowych osób w próbie kontrolnej ($41.54 \pm 9.61\%$). Najwyższy wzrost aktywności komórek NK uzyskano po zastosowaniu fraxiparyny (63% w stosunku do grupy kontrolnej), który był zbliżony do efektu po heparynie niefrakcjonowanej (52% w stosunku do grupy kontrolnej). Co ciekawe, nie zaobserwowano żadnego wpływu kwasu acetylosalicylowego. Powyższe rezultaty wskazują, że aktywacja komórek NK jest dodatkowym efektem stosowania heparyn, niezależnie od ich właściwości antykoagulacyjnych.

W omawianej pracy przeanalizowano także wpływ leków przeciwzakrzepowych na cytotoksyczność komórek NK w modelu mysiego raka płuca (Lewis lung carcinoma). NK-zależna cytotoksyczność komórek jednojądrzastych była oceniana 24 godziny po ostatniej dawce heparyny, fraxiparyny oraz kwasu acetylosalicylowego. Leczenie (5 dawek przez okres 17 dni) było rozpoczęte 6-go dnia po wszczepieniu komórek nowotworowych raka płuca. Wykazano, że średnia aktywność komórek NK w przypadku nieleczonych zwierząt była o 50% niższa w porównaniu z myszami zdrowymi. Heparyna zwiększała aktywność komórek NK o blisko 60% w porównaniu

z grupą nieleczoną, z kolei kwas acetylosalicylowy powodował wzrost aktywności NK o 43% w stosunku do grupy kontrolnej. Fraxiparyna nie miała istotnego wpływu na aktywność NK w mysim modelu raka płuca (wzrost aktywności o 14%). Wykazano także, że zastosowane leczenie, niezależnie od progresji nowotworu, nie wpływało na proliferację i dystrybucję głównych klas subpopulacji komórek limfoidalnych (NK, CD4, CD8, B). Co ciekawe, zaobserwowano efekt dawki dla badanych antykoagulantów, najsilniej wyrażony dla kwasu acetylosalicylowego a najmniej dla leczenia heparyną. Warto podkreślić fakt, że nie stwierdzono w trakcie prowadzonej terapii żadnych efektów ubocznych. Potencjalne zastosowanie antykoagulantów, oprócz swoich standardowych właściwości farmakologicznych może powodować wzrost aktywności komórek NK, co może skutkować obniżeniem potencjału metastatycznego komórek nowotworowych.

Głównym celem opisywanej wyżej publikacji była ocena aktywności cytotoksycznej komórek NK w dwóch grupach badawczych: (1) u pacjentów z wczesnym, operacyjnym niedrobnokomórkowym rakiem płuca oraz (2) u zdrowych ochotników. Jak zostało podkreślone wyżej, przeprowadzono także pomiar aktywności komórek NK w mysim modelu raka płuca. Pacjenci z rakiem płuca charakteryzowali się znacznie zmniejszoną aktywnością cytotoksyczną komórek NK w porównaniu z grupą kontrolną (odpowiednio, 7.07 ± 3.15 vs. 44.12 ± 10.62 , $P < 0.001$). Aktywacja komórek NK była stwierdzona zarówno w badaniach *in vitro* przy wykorzystaniu jednojądrowych komórek krwi obwodowej (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) pochodzących od zdrowych dawców, jak również u pacjentów z rakiem płuca leczonych heparyną niefrakcjonowaną i fraxiparyną. Dodatkowo, także na mysim modelu raka płuca potwierdzono wzrost aktywności komórek NK po zastosowaniu terapii heparyną niefrakcjonowaną. Aktywność komórek NK była niższa u pacjentów z rakiem płuca niż w przypadku zdrowej grupy kontrolnej. Włączenie terapii heparynami drobnocząsteczkowymi znacząco podwyższało aktywność komórek NK. Co więcej, inne antykoagulanty wzmacniały efektorowe funkcje komórek NK, zarówno u pacjentów z rakiem płuca, jak i w przypadku mysiego modelu. Konkludując, stosowanie antykoagulantów w onkologii, oprócz swoich standardowych właściwości przeciwzakrzepowych jest także odpowiedzialne za wzrost aktywności komórek NK, co może skutkować obniżeniem potencjału metastatycznego komórek nowotworowych. Z uwagi na pionierski charakter

powyższych doświadczeń, niezbędne są dalsze analizy prowadzone w ramach wielośrodkowych badań klinicznych.

Nowe koncepcje wynikające z moich doświadczalnych badań nad modelami przerzutowania i kaskadą metastatyczną zostały przedstawione w następującej publikacji pogładowej: **Bobek V, Kovarik J: *Antitumor and antimetastatic effect of warfarin and heparins*. *Biomed Pharmacother* 58:213-219, 2004. IF: 2,208.** Opisałiśmy w niej wszystkie etapy progresji guza oraz nowe teorie dotyczące potencjalnych leków przeciwnowotworowych ukierunkowanych na inhibicję poszczególnych elementów tego niezwykle złożonego procesu.

Podsumowanie dotychczasowych badań

Na przełomie ostatnich lat mój zespół opracował dwa nowe, mysie modele przerzutowania ze 100% zdolnością do generowania ognisk metastatycznych. Co ważne, modele te nie wymagają wykorzystania implantacji chirurgicznej ani ortotopowej. Guz pierwotny znajdował się w uchu lub na ogonie, co znacznie ułatwiało obserwację wzrostu nowotworu bez skomplikowanych manipulacji na zwierzętach. Powyższe wnioski sugerują, że wygenerowane w naszym laboratorium dwa modele przerzutowania mogą zostać z powodzeniem wykorzystane w laboratoriach naukowych i farmaceutycznych, z uwagi na brak konieczności wykorzystania skomplikowanych procedur chirurgicznych.

Wykazano także kluczową rolę lokalizacji implantacji komórek nowotworowych na proces metastazy. Wydaje się, że odpowiednie umiejscowienie jest bardziej istotne niż histologiczna specyfikacja (heterotopowa vs. ortotopowa) i jakość metody transplantacyjnej (iniekcja vs. chirurgiczna translokacja). Po raz pierwszy użyliśmy w badaniach komórek nowotworowych wykazujących ekspresję GFP z wykorzystaniem kurzych zarodków. Warto podkreślić fakt, że udało nam się zablokować przerzutowanie drogą naczyń krwionośnych przy użyciu leków przeciwzakrzepowych.

Kolejne opublikowane artykuły opisywały pionierską izolację oraz hodowlę *in vitro* CTCs oraz DTCs z mysich modeli przerzutowania. Ta nowo opracowana technika analizy procesu rozprzestrzeniania się komórek nowotworowych umożliwia dalszy rozwój badań nad zgłębianiem poszczególnych etapów kaskady metastatycznej oraz daje możliwości weryfikacji skutków funkcjonalnych zastosowania potencjalnych inhibitorów wybranych etapów. Wykazano także zróżnicowanie cytomorfologiczne CTCs oraz DTCs pochodzących z różnych ognisk przerzutowych. Potwierdza to olbrzymią heterogenność fenotypową komórek nowotworowych składających się na obraz guza pierwotnego. Warty podkreślenia jest fakt, że w trakcie prowadzenia hodowli *in vitro* udało się zachować wszystkie różnice morfologiczne pomiędzy analizowanymi komórkami.

Reasumując, przy wykorzystaniu odpowiednich metod hodowli komórkowych, oraz właściwej separacji komórek nowotworowych wykazaliśmy odmienności cytomorfologiczne pomiędzy komórkami nowotworowymi, które pochodziły z guza pierwotnego, CTCs i DTCs oraz tych wyizolowanych z przerzutów drogą naczyń krwionośnych i chłonnych.

Wykorzystanie nowego modelu zwierzęcego pozwoliło na bardziej detaliczne poznanie kaskady metastatycznej i co więcej, dało potencjalne możliwości na skuteczną jej inhibicję przy wykorzystaniu leków przeciwnakrzepowych.

IV . Inne aktywności naukowe

a) Bibliometria

Całkowity IF: 43,962

KBN/MNiSW: 412

Liczba cytowań: 110

Indeks Hirscha: 5

Autor:

- 17 oryginalnych pełnotekstowych artykułów opublikowanych w czasopismach z *Listy Filadelfijskiej*

- 4 artykułów poglądowych opublikowanych w czasopismach z *Listy Filadelfijskiej*

- 63 doniesień zjazdowych

b) Inne aktywności naukowe:

I. Badania nad biologią nowotworów

Brałem również czynny udział w licznych projektach naukowych obejmujących m.in. CTCs w kontekście możliwości ingerencji terapeutycznych w proces nowotworzenia. W artykule: *Menen RS, Pinney E, Kolostova K, Bobek V, Suetsugu A, Zhang N, Bouvet M, Hoffman RM: A rapid imageable in vivo metastasis assay for circulating tumor cells. Anticancer Res 31:3125-3128, 2011. IF: 1,656*, wykazano znacznie podwyższony potencjał metastatyczny krążących komórek nowotworowych (CTCs) raka prostaty w porównaniu z komórkami pochodzącymi z guza pierwotnego. Analizie poddano mózgi zarodków kurzych po 8 dniach od wszczepienia komórek nowotworowych raka prostaty przy wykorzystaniu mikroskopu skaningowego, który umożliwia szybkie wykrycie drobnych ognisk przerzutowych. Wyniki powyższego badania okazały się niezwykle intrygujące, ponieważ wszczepienie zarodkom kurzym CTCs raka prostaty skutkowało od 3 do 10 razy większym prawdopodobieństwem wystąpienia przerzutów w mózgu niż analogiczne doświadczenie z wykorzystaniem komórek pochodzących z guza pierwotnego. Co

więcej badanie pokazało, że model oparty na zarodkach kurzych jest niezwykle czuły i szybki do przeprowadzenia podczas analizy potencjału metastatycznego CTCs.

W artykule: *Menen R, Pinney E, Hassanein MK, Kolostova K, **Bobek V**, Suetsugu A, Zhang N, Bouvet M, Naughton GK, Hoffman RM. **Inhibition of metastasis of circulating human prostate cancer cells in the chick embryo by an extracellular matrix produced by foreskin fibroblasts in culture.** Anticancer Res. 2012 May;32(5):1573-7. IF: 1,656*, wykorzystując metodę analizy CTCs przy użyciu zarodków kurzych wykazano, że elementy macierzy zewnątrzkomórkowej (*extracellular matrix*, ECM) wytwarzane *in vitro* przez fibroblasty są silnymi inhibitorami generowania ognisk przerzutowych przez CTCs.

Warty uwagi jest artykuł: *Menen R, Zhao M, Zhang L, Hassanein MK, **Bobek V**, Kolostova K, Bouvet M, Hoffman RM. **Comparative chemosensitivity of circulating human prostate cancer cells and primary cancer cells.** Anticancer Res. 2012 Jul;32(7):2881-4, IF: 1,656*, w którym porównano chemiowrażliwość komórek nowotworowych raka prostaty pochodzących z ogniska pierwotnego (*human prostate PC-3*) i nowotworowych komórek krążących izolowanych u myszy, której ortotopowo implantowano komórki *PC-3*). Uzyskane rezultaty wskazują, że CTCs charakteryzowały się znacząco większą chemiowrażliwością zarówno na cisplatynę, jak i na docetaksel w prównaniu z chemiowrażliwością komórek pochodzących z ogniska pierwotnego. Przyszłościowym celem, bazującym na powyższych doświadczeniach może być izolacja i hodowla CTCs od pacjentów z różnymi typami nowotworów z krwi obwodowej i następową ocena ich chemiowrażliwości. Niewykluczone, że taka spersonalizowana terapia chemioterapeutyczna obniżyłaby toksyczność leczenia oraz poprawiłaby całościowe wyniki leczenia. Jest to wg wiedzy autorów pierwsze doniesienie w piśmiennictwie medycznym porównujące chemio wrażliwość guza pierwotnego i CTC.

Nowe możliwości płynące z zastosowania w onkologii już zarejestrowanych leków stosowanych w terapii innych schorzeń są detalicznie opisane w artykule poglądowym: *Kubecova M, Kolostova K, Pinterova D, Kacprzak G, **Bobek V**: **Cimetidine: an anticancer drug?** Eur J Pharm Sci 42:439-444, 2011. IF: 3,291*

and Bobek V: Anticoagulant and Fibrinolytic Drugs - Possible Agents In Treatment Of Lung Cancer? Anticancer Agents Med Chem. 2012 Jan 31. IF: 3,144.

II. Badaniach nad terapią genową

Kolejną dziedziną badań, która znalazła się w kręgu moich zainteresowań jest wykorzystanie terapii genowej w leczeniu tkankowych defektów. W artykule: **Bobek V, Taltynov O, Pinterova D, Kolostova K. Gene therapy of the ischemic lower limb- Therapeutic angiogenesis. Vascul Pharmacol. 2006, 44(6):395-405** zostały szeroko omówione rezultaty badań eksperymentalnych oraz klinicznych dotyczących terapeutycznej angiogenezy u pacjentów z chorobami tętnic obwodowych. Omówiliśmy bezpieczeństwo stosowania i efekty uboczne terapii genowej oraz zaproponowaliśmy perspektywy nowych trendów badawczych dotyczących angiogenezy oraz angiogennych czynników wzrostu.

Nasze rozważania teoretyczne znalazły odzwierciedlenie w dwóch eksperymentach badawczych opublikowanych w artykułach: **Kolostova K, Taltynov O, Pinterova D, Boubelik M, Raska O, Hozak P, Jirkovska M, Bobek V. Wound healing gene therapy: cartilage regeneration induced by vascular endothelial growth factor plasmid. Am J Otolaryngol. 2012;33(1):68-74** oraz **Kolostova K, Taltynov O, Pinterova D, Cegan M, Ceganova L, Jirkovska M, Bobek V. Tissue repair driven by two different mechanisms of growth factor plasmids VEGF and NGF in mice auricular cartilage: regeneration mediated by administering growth factor plasmids. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2012 Jul;269(7):1763-70.** W pierwszej pracy wykazano, że użycie plazmidu kodującego VEGF znacznie przyspiesza regenerację chrząstki w mysim uchu. Z kolei drugi artykuł porównuje wpływ czynnika wzrostu nerwów (*nerve growth factor*, NGF) oraz śródbłonkowego czynnika wzrostu naczyń (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) na procesy regeneracji doświadczalnie wyidukowanych uszkodzeń skóry i chrząstki. Wykazano, że obie cytokiny wpływają odmiennie na powyższe procesy. VEGF wiąże się raczej z różnicowaniem nowych chondrocytów, natomiast NGF jest powiązany z indukcją reakcji zapalnej i następową regeneracją.

W publikacji: *Haninec P, Kaiser R, Bobek V, Dubovy P. Enhancement of musculocutaneous nerve reinnervation after vascular endothelial growth factor (VEGF) gene therapy. BMC Neurosci. 2012 Jun 6;13(1):5*, zaobserwowano, że transfekcja plazmidem VEGF nerwu skórno-mięśniowego skutkuje pobudzeniem komórek Schwanna i nasileniem procesu reinerwacji.

c) Granty naukowo-badawcze

Udział w grantach jako główny wykonawca:

- Effect of anticoagulants on implantation of hematogenous metastasis, 2001, Grant of League Against Cancer Prague
- VISLA Studie - Visegrad Study of Lung Cancer and Anticoagulation, koordynacja badań klinicznych związanych z NSCLC w 6-ciu centrach badawczych pochodzących z 4 krajów (nr. of grants: 076-2001-IVF)
- VISLA Studie II - Visegrad Study of Lung Cancer and Anticoagulation, koordynacja badań klinicznych związanych z NSCLC w 6-ciu centrach badawczych pochodzących z 4 krajów (nr. of grants, 3060-2002-IVF),
- Streptokinase and lung cancer: grant provided by Visegradfund Nr.6124-2004-IVF, polsko-czeska współpraca naukowa
- Fybrinolytic therapy in treatment of lung cancer, 2004, Grant of League Against Cancer Prague
- Inhibition of metastatic dissemination by influencing the gene expression of plasminogen activator system, 2005-2007, KJB501070501, Grant Czeskiej Akademii Nauk
- Monitoring of Gene expression in Circulating tumor cells (CTCs) in breast cancer patients, Participatation on the projects: 2009-2011: Gene expression profiling of the circulating tumor cells as a tool of early dissemination prediction (MZ CR-IGA), implementation of the circulating tumor cells analysis in to clinical practice in Czech Republic
- Prediction of site specific metastatic dissemination based on the gene expression of " homing" factors in circulating tumor cells from experimental tumor models. 2010-2012: (MSMT CR-KONTAKT) – grant międzynarodowy

prowadzony we współpracy z Uniwersytetem San Diego w Kalifornii;
współkierownik projektu: Prof. R. Hoffman

- Therapy of experimental neuropathies by VEGF and NGF plasmid application, 2007-2010, (MSMT CR-KONTAKT) – grant międzynarodowy we współpracy z Miami Lois Pope Center to Cure Paralysis, USA; współkierownik projektu: Prof. J.Sagen

d) Członkostwo w organizacjach naukowych:

- **AACR**: American Association of Cancer Research
- **CSS**: Czech Surgical Society
- **ESTS**: European Society of Thoracic Surgery

e) Współpraca międzynarodowa:

- **University of California**, San Diego, USA; wspólne badania obejmujące nowotworowe komórki krążące oraz wykorzystanie GFP w analizie procesu przerzutowania; przygotowanie wspólnych publikacji, wspólne wnioski aplikujące o granty badawcze
- **University Bonn**, Niemcy; nowotworowe komórki krążące w badaniach nad rakiem prostaty
- **Uniklinikum Essen**, Niemcy; nowotworowe komórki krążące w przebiegu raka piersi i jajnika, wspólne wnioski aplikujące o granty badawcze
- **National Jewish Health Hospital Denver**, USA; molekularna diagnostyka raka płuca
- **University of Florence**, Włochy; CTCs w czerniaku
- **National Koranyi Institute of Pulmonology**, Budapest, Hungary; współpraca w zakresie badań nad rakiem płuca i zastosowaniem leków przeciwzkrzepowych; wspólne publikacje i aplikacje o granty badawcze
- **Gifu University Graduate School of Medicine**, Gifu, Japonia; współpraca nad znaczeniem CTCs w raku jelita grubego i powstawaniem ognisk przerzutowych w wątrobie

- **University Hospital Bratislava**, Słowacja; wspólne badania nad biologią raka płuca, wspólne wnioski aplikujące o granty badawcze

f) Działalność recenzencka w czasopismach naukowych

Jestem recenzentem w następujących czasopismach z Listy Filadelfijskiej: **PLos ONE, Neoplasma, J Thromb Haemost, Onkologie, Technol Cancer Res Treat, Respirat Care, Food Chem Toxicol, Gastroenterology, Gene.**

g) Doniesienia konferencyjne i prezentacje naukowe

- o ASNTR conference, Clearwater, USA: Sesja Plakatowa: Regeneration of the intraspinal plasticity induced by VEGF and NGF plasmid
- o Immunoanalytical days Jihlava 2009, Czech Republic – wykład na zaproszenie : *Circulating tumor cells in Breast cancer management* - <http://www.fnplzen.cz/asp/iad/>
- o Oncology days Brno 2009, Czech Republic – wykład na zaproszenie http://www.linkos.cz/odbornici/kongresy/PROGRAM_BOD_2009_ot.pdf
- o Days by Dr.Stasek- 2009 Prague, Czech Republic – wykład na zaproszenie http://www.linkos.cz/odbornici/kongresy/VS_2009.pdf
- o 4th international qPCR Symposium 2009 – Freising, Germany – Sesja plakatowa - <http://qpcr2009.net/>
- o ADAPT 2009 - Accelerating Development and Advancing Personalized Therapy 2009, Washington D:C, USA – wykład na zaproszenie: *Gene expression profiling of circulating tumor cells in Breast cancer patients* <http://www.adaptcongress.com/>
- o Day of Predictive Oncology 2009, Czech Republic – wykład w sesji plenarnej <http://www.solen.cz/artkey/act-000067-0000.php>
- o XIII. Chemotherapeutical days Košice, Slovak Republic – wykład na zaproszenie: *Circulating tumor cells in breast cancer* - 2009 <http://www.progress.eu.sk/kongresy/chemodni/chprogram09>.
- o ASNTR conference, Clearwater, USA: Sesja plakatowa: Molecular profiling of the regeneration process in spinal cord injury after VEGF and NGF plasmid injection.
- o 15. Oncology symposium in Gynaecology and Mammology, 8-9.1.2010, Brno, Czech Republic – wykład na zaproszenie: Monitoring of gene expression profilig of circulating tumor cells in breast cancer patients
- o 1. Prague oncology colloquium - PragueOnco 2010, 28-29.1.2010, Prague, Czech Republic - <http://www.pragueonco.cz> – Sesja plakatowa Monitoring of gene expression profiling of circulating tumor cells in breast cancer patients as an early tool for metastatic spread detection

- Ist. Days of Tumor Genetics, 17.3 – 19.3. 2010, Bratislava, Slovak Republic – wykład na zaproszenie: *Molecular Diagnostics of Breast Cancer: On the way from the research to the clinics*
- Immunoanalytical days, 4.2010, Mikulov, Czech Republic – wykład: Circulating tumor cells in cancer management - <http://www.fnplzen.cz/asp/iad/>
- American Association for Cancer Research AACR 101st Annual meeting, 17-21.4.2010, Washington, USA - <http://www.aacr.org/home/scientists/meetings-workshops/aacr-102nd-annual-meeting-2011/previous-annual-meetings/aacr-101st-annual-meeting-2010.aspx>, Sesja plakatowa: *Gene expression profiling in circulating cells (CTCs) of breast carcinoma patients*,
- Invited lecture S.Kasimir-Bauer: The prognostic value of circulating tumor cells in gynecological cancers by using molecular methods patients - a tool for early metastasis detection and therapy individualization
- IMPAKT- IMProving cAre and Knowledge through Translational Research, 6.-8.5.2010, Brussels, Belgium – <http://www.esmo.org/events/breast-2010-impakt.html>, Sesja plakatowa: *Gene expression profiling in circulating cells (CTCs) of breast carcinoma patients - a tool for early metastasis detection and therapy individualization*
- Developments in Real-Time PCR Research and Molecular Diagnostics, 31.5.-3.6.2010, Gothenburg, Sweden – <http://www.qpcrsymposium.eu/2010/> - Sesja plakatowa: *Circulating tumor cells (CTCs) handling in laboratory practise*
- ISOBM 2010, 38th Conference of the International Society for Oncology and Biomarkers , 3-8.9.2010, Munich, Germany, <http://www.isobm2010.de/index.php?id=2>, Sesja plakatowa: *The Role of Disseminated Tumor Cells and Circulating Tumor Cells in Management of Breast Cancer Patients*
- The Molecules of Life: From Discovery to Biotechnology, 26.9.-1.10.2010, Melbourne, Australia: <http://www.asbmb.org.au/ozbio2010/> - Sesja plakatowa: *Gene expression profiling in circulating cells (CTCs) of breast carcinoma patients - a tool for early metastasis detection and therapy individualization*
- 18th.Onco-Urology Symposium and 14th. Mammology symposium Prague, 24-26.11.2010, Czech Republic, Sesja plakatowa: *Molecular Diagnostics using circulating tumor cells in breast cancer patients and its application in clinical practise.*
- qPCR Symposium 2010, 1-4.11.2010, San Francisco, USA, <http://www.qpcrsymposium.com/>, Sesja plakatowa: *Gene expression profiling in circulating cells (CTCs) of breast carcinoma patients - a tool for early metastasis detection and therapy individualization*
- Days of Predictive Oncology, 1-3.12.2010, Olomouc, Czech Republic - <http://www.solen.cz/artkey/act-000089-0000.php> - wykład: *Molecular Diagnostics using circulating tumor cells in breast cancer patients and its application in clinical practise.*
- 33rd Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, 8.-10.12.2010, San Antonio, USA – Sesja plakatowa: *Minimal Residual Disease Monitoring in Breast Cancer Patients*

- American Association for Cancer Research (AACR) Conference 2011, Orlando USA: Sesja plakatowa: *Circulating human prostate cancer cells from an orthotopic mouse model rapidly captured by immunomagnetic beads and imaged by GFP expression*
- ASCO 2011, 3-7.6.2011 Chicago, USA: Sesja plakatowa: *Rapid isolation of imageable circulating tumor cells*
- World Molecular Imaging Congress, San Diego, 7-10.9.2011: Sesja plakatowa: *Imaging the behavior of Circulating tumor cells.*
- Developments in Real-time PCR – From Preanalytics to Molecular Diagnostics with a separate track on Circulating Tumor Cells (CTCs), Prague 13-17.6.2011. *Multimarker Gene Expression Profiling of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients*
- Developments in Real-time PCR – From Preanalytics to Molecular Diagnostics with a separate track on Circulating Tumor Cells (CTCs), Prague 13-17.6.2011. *Circulating tumor cells isolated from a heterotopic melanoma mouse model propagated for purpose of drug chemosensitivity testing*
- 3rd World CTC summit, San Diego 7-8.11. 2011: Sesja plakatowa: *Multimarker Gene Expression Profiling of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients*
- 3rd World CTC summit, San Diego 7-8.11. 2011: Sesja plakatowa: *Circulating Melanoma Cells Cultured for Purpose of Personalized Medicine*
- Conference: Conference on Improving Care and Knowledge through Translational Research (IMPAKT) Breast Cancer Location: Brussels, BELGIUM Date: MAY 05-07, 2011 *Changes in the presence of CTCs in the peripheral blood of breast cancer patients during the course of treatment.*
- 3rd Prague oncology colloquium - PragueOnco 26-27.1.2011, Prague, Czech Republic - <http://www.pragueonco.cz> – Sesja plakatowa: *Monitoring of gene expression profiling of circulating tumor cells in breast cancer patients*
- 3rd Prague oncology colloquium - PragueOnco 26-27.1.2012, Prague, Czech Republic - <http://www.pragueonco.cz> – Sesja plakatowa: *Circulating tumor cell cultivation for personalized cancer treatment*
- American Association for Cancer Research (AACR) Conference 2012, Orlando USA: Sesja plakatowa: *High-throughput expression profiling of circulating tumor cells from breast cancer patients as potential therapy decision indicator*
- American Association for Cancer Research (AACR) Conference 2012, Orlando USA: Sesja plakatowa: *Characterization of cultured circulating melanoma cells for individualized therapy*
- ASCO–annual meeting 2012, Chicago: Sesja plakatowa: *Determining the metastatic potential of circulating tumor cells.*

V. Działalność dydaktyczna:

Prowadzę wykłady i ćwiczenia dla studentów medycyny 3-go Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Karola w Pradze z przedmiotów: chirurgia oraz medycyna molekularna. Od 2005 roku jestem Kierownikiem Katedry Biologii Nowotworów na 3. Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Karola w Pradze. Katedra jest zaangażowana zarówno w system kształcenia przeddyplomowego, jak i podyplomowego studentów i absolwentów wydziałów medycznych.

Jestem akredytowanym promotorem przewodów doktorskich prowadzonych na Uniwersytecie Karola w Pradze. Obecnie jestem opiekunem naukowym dwóch uczestników studiów doktoranckich w następujących tematach:

- 1) Leczenie artropatii u pacjentów z hemofilią (zakończenie w 2013 roku),
- 2) Detekcja CTCs i DTCs w planowaniu terapii guzów litych (zakończenie w 2015 roku).

Uczestniczę w szkoleniach specjalistycznej kadry medycznej z zakresu chirurgii ogólnej i torakochirurgii w Szpitalu Uniwersyteckim *Kralovske Vinohrady* w Pradze oraz w Dolnośląskim Centrum Chorób Płuc we Wrocławiu.

Wrocław, 28 września 2012-09-28


Vladimir Bobek