



Gdańsk, 3.01.2025

Dr hab. Lucyna Kaszubowska
Katedra i Zakład Histologii
Gdański Uniwersytet Medyczny

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Mgr Aleksandry Strzykalskiej pt. „Zależny od wieku wpływ kalcytriolu i takalcytolu na różnicowanie limfocytów Th17 przy udziale osteopontyny w mysim raku gruczołu sutkowego”

Powierzona do recenzji praca była realizowana w Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu. Promotorem pracy jest Prof. dr hab. Joanna Wietrzyk, a promotorem pomocniczym Dr inż. Mateusz Psurski. Badania zostały zrealizowane w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (nr projektu 2019/35/B/NZ5/01).

1. Znaczenie podjętych badań i realizowany problem naukowy.

Tematyka pracy dotyczy aktualnych w onkologii zagadnień związanych z wpływem witaminy D na rozwój i progresję nowotworów, w tym raka piersi u kobiet. Pomimo zdecydowanej większości doniesień na temat antyproliferacyjnego, proapoptotycznego i przeciwnowotworowego charakteru kalcytriolu, aktywnej formy witaminy D, w literaturze można znaleźć także doniesienia, które tego nie potwierdzają i wskazują na potencjalnie pronowotworowe właściwości tego związku, które zaobserwowano w mysim modelu raka gruczołu sutkowego. Podobnie, rola układu odpornościowego w kształtowaniu mikrośrodowiska nowotworu to ważny aspekt badań z zakresu immunologii nowotworów. Tymczasem funkcja limfocytów Th17 w procesie nowotworowym nie jest do końca jednoznaczna. Większość doniesień wskazuje na udział tej populacji limfocytów w progresji nowotworu ze względu na produkcję prozapalnej IL-17, której aktywność związana jest z rozwojem stanu zapalnego, stymulacją procesu angiogenezy, proliferacji i migracji komórek nowotworowych. Jednak wykazano także zdolność konwersji komórek Th17 w kierunku przeciwnowotworowych komórek Th1. Wykorzystany w pracy przerzutujący (4T1) i nieprzerzutujący (67NR) myszy model raka gruczołu sutkowego obejmujący zwierzęta różniące się wiekiem i statusem hormonalnym jest cennym narzędziem badawczym. Koresponduje on z różnym statusem hormonalnym kobiet w okresie przedmenopauzalnym i pomenopauzalnym. Projekt pracy został dodatkowo wzbogacony o aspekt udziału osteopontyny w procesie różnicowania limfocytów Th17 i stymulacji ich do produkcji IL-17 w obecności kalcytriolu i takalcytolu. Większość doniesień w literaturze wskazuje na stymulujący wpływ aktywnej formy witaminy D i jej analogów na ekspresję osteopontyny zarówno w komórkach prawidłowych jak i nowotworowych, przy czym w tych ostatnich często dochodzi do nadekspresji tego białka. Jednak istnieją również prace, które opisują efekt obniżania ekspresji osteopontyny przez kalcytriol i jego analogi. Witamina D może modulować ekspresję IL-17 w



populacji limfocytów Th17, ponieważ receptor VDR ulega silnej ekspresji w tych komórkach. Przeprowadzona w pracy analiza zaangażowania receptorów dla osteopontyny w procesie różnicowania limfocytów Th17 może być istotna w kontekście rozwoju nowych terapii przeciwnowotworowych. Zatem podjęty przez Doktorantkę problem naukowy dobrze wpisuje się w aktualny nurt badań z zakresu onkologii doświadczalnej i terapii nowotworów wykazując także potencjalny aspekt aplikacyjny.

2. Ocena merytoryczna

Praca posiada przejrzystą i uporządkowaną strukturę, obejmuje 174 strony i zawiera 317 pozycji literaturowych. Zawiera dwa streszczenia: w języku polskim i angielskim, które krótko przedstawiają podejmowany temat badawczy, cele oraz najważniejsze wyniki i wnioski uzyskane w pracy. Całość opracowania składa się z obszernego wstępu teoretycznego, celu pracy, przedstawionej metodyki badawczej, szczegółowo opisanych wyników wraz z ich podsumowaniem, dyskusji oraz wniosków. Praca opatrzona jest licznymi tabelami (16) i rycinami (38 + 9 w suplemencie), które stanowią ilustracje do wstępu teoretycznego, porządkują zastosowane materiały i metody oraz prezentują uzyskane wyniki.

We wstępie Doktorantka wyczerpująco przedstawia na 40 stronach problem badawczy i uzasadnia jego podjęcie opisując zagadnienia związane z procesem transformacji nowotworowej zachodzącym na poziomie komórkowym z uwzględnieniem mechanizmu tworzenia przerzutów. Przeprowadza charakterystykę raków gruczołu sutkowego obejmującą ich epidemiologię, czynniki ryzyka, systemy klasyfikacji, terapie stosowane w leczeniu pacjentów. Następnie koncentruje się na omówieniu roli witaminy D i jej analogów podczas rozwoju i progresji raka piersi z uwzględnieniem ich właściwości antyproliferacyjnych i proapoptotycznych. W kolejnej części Doktorantka przedstawia rolę osteopontyny w procesie modulacji odpowiedzi immunologicznej oraz udział wybranych subpopulacji limfocytów w progresji nowotworów, ze szczególnym uwzględnieniem limfocytów Th17 oraz wpływu witaminy D oraz osteopontyny na proces ich różnicowania.

Celem badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej była ocena wpływu kalcytriolu i takalcytolu na populację limfocytów Th17 z uwzględnieniem udziału receptorów dla osteopontyny w procesie różnicowania tych komórek u myszy obciążonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 i 67NR należących do dwóch grup wiekowych odzwierciedlających także status hormonalny kobiet w okresie przedmenopauzalnym i pomenopauzalnym. Cel ten został zrealizowany w oparciu o cele szczegółowe obejmujące ocenę efektu przeciwnowotworowego kalcytriolu i takalcytolu, charakterystykę odpowiedzi immunologicznej limfocytów Th17 i Treg podczas progresji raka gruczołu sutkowego z uwzględnieniem cytometrycznej oceny fenotypu badanych populacji komórek oraz analizy ekspresji genów i białek kluczowych w procesie różnicowania limfocytów T w celu ustalenia roli wybranych receptorów dla osteopontyny w różnicowaniu limfocytów Th17.

W dalszej części pracy Doktorantka przedstawiła zastosowaną metodykę badawczą z uwzględnieniem części doświadczalnej prowadzonej *in vivo* z pomocą zespołu specjalistów Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej, w której Doktorantka uczestniczyła i asystowała w prowadzonych pracach oraz części doświadczalnej prowadzonej *ex vivo*. W tej ostatniej Doktorantka zaprezentowała szeroki warsztat badawczy obejmujący analizę fenotypu komórek za pomocą cytometrii przepływowej, metody hodowli komórkowej (test klonogenny, aktywacja i różnicowanie limfocytów *in vitro*), testy ELISA, real-time PCR, technika western blot w wersji



zautomatyzowanej metodą Jess Simple Western. Analiza statystyczna została wykonana z wykorzystaniem programu GraphPad Prism 7.

W kolejnej części pracy zostały szczegółowo opisane uzyskane wyniki z uwzględnieniem części doświadczalnej przeprowadzonej *in vivo* i *ex vivo* zobrazowane 26 rycinami umieszczonymi w rozdziale „Wyniki” i 9 rycinami zawartymi w „Suplemencie”, co bardzo pomaga w analizie uzyskanych przez Doktorantkę danych. Nie do końca wydaje się jednak uzasadnione przeniesienie części wyników dotyczących w większości linii 67NR do Suplementu (Ryc S-2 do Ryc S-9), ponieważ zaprezentowanie ich w głównym tekście ułatwiłoby porównanie z linią 4T1.

Ostatnią część pracy stanowi podsumowanie wyników, dyskusja i wnioski. Uzyskane w pracy wyniki Doktorantka uporządkowała w rozdziale „Podsumowanie wyników” grupując je według założeń i celów pracy, co ułatwiło przeprowadzenie dyskusji w kolejnej jej części. Doktorantka skonfrontowała uzyskane wyniki z danymi literaturowymi zwracając uwagę na ich podobieństwa i różnice. Przedstawiła również swoją interpretację w tym kontekście. Dyskusja została przeprowadzona w sposób prawidłowy i wyczerpujący. Zabrakło tam jedynie odniesienia do części wyników uzyskanych *in vivo* i dotyczących określenia toksyczności zastosowania kalcytriolu i takalcytolu (masa ciała, morfologia krwi, poziom Ca^{2+} , kreatyniny, aminotransferazy alaninowej, wskaźnik de Ritisa). Wyciągnięte wnioski są uprawnione i adekwatne do postawionych celów. Doktorantka zauważa, że wiek, status hormonalny i podawanie witaminy D lub jej analogów wywierają wpływ na proces angiogenezy obserwowany w nieprzerzutującym modelu raka gruczołu sutkowego myszy 67NR oraz metastazy w przerzutującym modelu tego nowotworu 4T1. Procesy te są dodatkowo regulowane poziomem ekspresji osteopontyny w tkance guza, ekspresją VDR w limfocytach CD4+ oraz stymulacją limfocytów Th17. Ponadto, zależnie od modelu nowotworowego, wieku myszy oraz pochodzenia tkankowego komórek kalcytriol i takalcytol zdolne są do modulowania ekspresji receptorów dla osteopontyny. Doktorantka wykazała, że receptory CD44 i CD51 pełnią istotną rolę w różnicowaniu komórek Th17, natomiast receptory CD44, CD29 i CD51 w różnicowaniu komórek Th1.

3. Uwagi i pytania

Uwagi:

- z przedstawionego opisu metody 5.4.8. wynika, że Fixable Viability Dye eFluor™ 780 jest przeciwciałem, podczas gdy w rzeczywistości jest barwnikiem stosowanym w cytometrii przepływowej do oceny żywotności komórek i wybarwiania komórek martwych;

- na wykresach dotyczących analizy cytometrycznej osie X i Y powinny być opisane nazwami barwników fluorescencyjnych, które były stosowane podczas analizy wg opisu metod i Tabeli 6 (str. 55), tzn. Fixable Viability Dye eFluor™ 780 (zamiast APC-Cy7 - Ryc. 17AIII; Ryc. 24AIII, Ryc. 25AIII, Ryc. 35AIII, Ryc. S-7C, Ryc. S-7D), Green Fluorescence Protein (GFP) (zamiast FITC - Ryc. 24AV), PE-Dazzle594 (zamiast PE-Texas Red - Ryc. 24AIV, Ryc. 25AIV, Ryc. 35AIV), Brilliant Violet 421 (zamiast Horizon V450, Ryc. 35AV, Ryc. S-7C, Ryc. S-7D). Jeszcze lepszym rozwiązaniem byłoby umieszczenie w opisie osi X i Y nazw badanych cząsteczek/antygenów zamiast nazw barwników fluorescencyjnych zastosowanych podczas analizy.



Pytania:

1. Jak można zinterpretować wyniki przedstawione na Ryc. 15 w odniesieniu do występujących różnic w analizowanych parametrach w modelu przedmenopauzalnym i pomenopauzalnym raka gruczołu sutkowego 4T1 i 67NR (w dyskusji ta część wyników nie została ujęta, ale warto byłoby o niej krótko wspomnieć).
2. Jaki był dokładnie wzrost odsetka komórek wykazujących ekspresję CD44 w limfocytach T pomocniczych pochodzących ze śledziony pod wpływem kalcytriolu i takalcytolu w modelu przedmenopauzalnym u myszy obciążonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 (Ryc. 18D)?
3. Z czego mogą wynikać różnice w ekspresji CD29, CD44, CD51 i CD61 w różnych tkankach (Ryc. 18 – Ryc. 22, Ryc. S-4 – Ryc. S-6)? Jakie są doniesienia literaturowe na ten temat? Jak można wytłumaczyć różnice w ekspresji tych receptorów w modelu przedmenopauzalnym i pomenopauzalnym raka gruczołu sutkowego 4T1 i 67NR?

4. Podsumowanie

W obszernym wstępie Doktorantka zaprezentowała nie tylko ogólną, ale również specjalistyczną wiedzę z zakresu onkologii doświadczalnej i immunologii nowotworów.

Kolejne części pracy ukazują, że Doktorantka posiada umiejętność prawidłowego zaprojektowania procesu badawczego rozpoczynając od sformułowania założeń i celów pracy, przygotowania bibliografii, doboru i wykorzystania odpowiednich modeli i metod badawczych, opracowania i przedyskutowania uzyskanych wyników w nawiązaniu do zebranej literatury naukowej, wyciągania wniosków na podstawie otrzymanych wyników. Przedstawione w pracy ryciny są czytelne i informatywne, a ich graficzne opracowanie staranne.

Doktorantka wybrała do rozwiązania niełatwy problem badawczy, ponieważ efekt działania witaminy D w procesie powstawania przerzutów w raku gruczołu sutkowego nie jest do końca jednoznaczny. Do tego dochodzi zdolność witaminy D do modulowania ekspresji osteopontyny, białka wpływającego na różnicowanie limfocytów Th17, a także na proces przerzutowania nowotworów. Dodatkowo, limfocyty Th17, komórki o potencjalnym charakterze zarówno pro- jak i przeciwnowotworowym wykazują ekspresję receptora dla witaminy D i plastyczność w procesie różnicowania z możliwością modulacji zmienności tych komórek w obecności osteopontyny, dla której receptory wykazano na powierzchni limfocytów CD4+. W literaturze brakuje danych dotyczących znaczenia poszczególnych receptorów dla osteopontyny w procesie różnicowania limfocytów Th17 przy zastosowaniu witaminy D lub jej analogów w modelu przerzutującego raka gruczołu sutkowego u zwierząt różniących się statusem hormonalnym. Te zebrane na podstawie literatury dane i założenia wymagały od Doktorantki prawidłowego sformułowania hipotez badawczych. Uzyskanie odpowiedzi na stawiane pytania świadczy o umiejętności doprowadzenia przez Doktorantkę do oryginalnego rozwiązania problemu naukowego.

Doktorantka nie ustrzegła się pewnych błędów językowych i edytorskich oraz niedociągnięć w opisie rycin, ale nie wpływa to na pozytywną ocenę rozprawy.

Podsumowując należy stwierdzić, że:



- przedstawiona rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w zakresie nauk biologicznych, ze szczególnym uwzględnieniem immunologii nowotworów oraz onkologii doświadczalnej;
- recenzowana praca stanowi dowód, że Doktorantka wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej;
- zaprezentowana rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego zdefiniowanego w założeniach i celach pracy.

5. Wniosek końcowy:

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Mgr Aleksandry Strzykalskiej spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (t.j. Dz.U. 2023 poz. 742 z późn. zm.). Zatem wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Mgr Aleksandry Strzykalskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Katedra i Zakład Histologii
Gdański Uniwersytet Medyczny
Lucyna Kaszubowska
dr hab. Lucyna Kaszubowska