



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia 22-01-2025
L.dz. 32

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”.

Praca doktorska została wykonana pod kierunkiem Prof. dr hab. Joanny Wietrzyk

(promotor pomocniczy dr inż. Mateusz Psurski)

w Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.

Rak gruczołu sutkowego, potocznie - rak piersi, jest najczęstszym nowotworem złośliwym rozpoznawanym u kobiet i drugą w Polsce – po raku płuca, przyczyną ich śmierci spowodowaną przez nowotwory złośliwe. Pomimo, iż etiologia większości przypadków raka piersi jest nieznana, opisywanych jest wiele różnych czynników, mogących mieć wpływ na powstawanie tego nowotworu. Należą do nich przede wszystkim czynniki genetyczne, hormonalne, środowiskowe, czynniki związane z dietą, prokreacją czy narażeniem na promieniowanie jonizujące. Według danych epidemiologicznych ryzyko rozwoju raka piersi w życiu kobiety wynosi ok. 12% i wyraźnie wzrasta wraz z wiekiem, ze szczytem zachorowań przypadającym pomiędzy 50 a 70 rokiem życia. Warto wspomnieć, iż nowotwór ten, choć znacznie rzadziej, może również występować u mężczyzn, a ryzyko zachorowania na raka piersi w tej grupie również wzrasta z wiekiem.

Mimo znacznego postępu jaki dokonał się w ciągu ostatnich lat w zakresie diagnostyki raka piersi, zwłaszcza dzięki programom przesiewowym dla kobiet oraz nowym, często celowanym strategiom terapeutycznym, efekty leczenia są wciąż dalekie od oczekiwań. Związane jest to głównie z wysokim zróżnicowaniem raka piersi pod względem obrazu klinicznego, morfologicznego oraz molekularnego. Wybór metod leczenia w odpowiednich stopniach zaawansowania opiera się na ocenie klinicznej i patomorfologicznej, a stosowana terapia obejmuje leczenie chirurgiczne, radio- i hormonoterapię, terapię biologiczną oraz systemową chemioterapię adjuwantową i neoadjuwantową. Poza leczeniem samego nowotworu, terapia uwzględnia również dolegliwości jakie dają przerzuty, a

Instytut Pediatrii

Katedra Immunologii Klinicznej i Transplantologii | Zakład Immunologii Klinicznej

ul. Wielicka 265, 30-663 Kraków, tel. +48 12 658 24 86, faks +48 12 658 17 56

www.cm-uj.krakow.pl

także działania niepożądane związane z zastosowanym protokołem leczniczym np. niedokrwistość, neutropenię czy osteoporozę.

Na tym tle, w przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej, mgr Aleksandra Strzykalska podjęła się zbadania wpływu biologicznie aktywnej formy witaminy D (kalcytriolu) oraz jej analogu (takalcytolu) na przebieg mysiego raka gruczołu sutkowego w kontekście różnicowania limfocytów Th17 przy udziale osteopontyny. Podjęcie takiej tematyki badawczej zostało wyczerpująco uzasadnione, albowiem niski poziom witaminy D w surowicy jest uważany za czynnik ryzyka zachorowania na raka piersi i ma również znaczenie prognostyczne w tej grupie chorych. Z kolei, podawanie kalcytriolu u kobiet w okresie po menopauzie stanowi obiecującą strategię w leczeniu raka piersi z ekspresją receptorów estrogenowych. Jednakże, ze względu na ryzyko wywołania osteoporozy u tych kobiet konieczna jest suplementacja wapnia, stąd też coraz powszechniejsze jest stosowanie analogów kalcytriolu, np. takalcytolu, które posiadają podobną do witaminy D aktywność przeciwnowotworową, przy zredukowanym działaniu niepożądanym, związanym z hiperkalcemią i nasileniem osteoporozy. Rola samych limfocytów Th17 w przebiegu raka piersi nie jest jednoznaczna. Z jednej strony, komórki te biorą udział w procesach promujących rozwój guza, np. poprzez wpływ na powstawanie mieloidalnych komórek supresorowych (MDSC) czy różnicowanie do limfocytów Treg, a z drugiej, dzięki swojej plastyczności mogą ulegać również konwersji do limfocytów Th1 o aktywności przeciwnowotworowej. Choć pionierskie badania na tym polu prowadzone przez Promotora Doktorantki wskazują na odmienny wpływ kalcytriolu i jego analogów na aktywność limfocytów Th17 w przebiegu raka gruczołu sutkowego u myszy młodych i w okresie postmenopauzalnym, rola osteopontyny w tym procesie nie została w pełni wyjaśniona. Wszystko to sprawia, iż podjęty temat rozprawy doktorskiej jest istotny zarówno ze względów czysto poznawczych, jak i w kontekście aspektów praktycznych, mając potencjalnie duże znaczenie translacyjne. Wartość naukową przeprowadzonych badań dodatkowo potwierdza fakt ich finansowania przez NCN w ramach projektu OPUS.

Rozprawa liczy 174 strony druku i posiada układ typowy dla prac doświadczalnych. Poprzedza ją streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz skrótów użytych w tekście, a zamyka suplement, zawierający dodatkowe ryciny.

Obszerny „Wstęp” wprowadza czytelnika w problematykę podjętych badań, poczynając od charakterystyki i klasyfikacji raka gruczołu sutkowego. W kolejnych podrozdziałach Autorka przedstawia epidemiologię i czynniki ryzyka raka piersi, szczegółowo omawia systemy klasyfikacji tego nowotworu, opisuje proces przerzutowania i przytacza stosowane obecnie formy leczenia, obejmujące również nowoczesne strategie immunoterapii. Dalej Autorka przechodzi do opisu witaminy D, jej funkcji biologicznej i roli w rozwoju i leczeniu nowotworów, aby następnie opisać osteopontynę i jej funkcje w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej, zwłaszcza w kontekście progresji choroby nowotworowej. Ostatni podrozdział „Wstępu” dotyczy roli wybranych komórek układu odpornościowego w progresji nowotworów, ze szczególnym uwzględnieniem roli limfocytów Th17 i innych subpopulacji limfocytów Th oraz limfocytów Treg. Napisanie całej tej części rozprawy wymagało od Autorki dużo wysiłku, gdyż dotyczyło różnorodnych zagadnień, których złożenie w logiczną całość nie było łatwe. Doktorantka wywiązała się z tego zadania bez zarzutu, a cały „Wstęp” posiada ogólnie edukacyjny charakter, dodatkowo poparty czytelnymi i kolorowymi rycinami, obrazującymi opisywane aspekty.

Założenia i cele pracy zostały jasno sformułowane, a podjęte w nich zadania były niezwykle ambitne. Doktorantka podjęła się w nich bowiem oceny efektu przeciwnowotworowego kalcytriolu i jego analogu na wzrost, przerzutowanie i angiogenezę guzów dwóch typów mysiego raka gruczołu sutkowego, wywodzących się z komórek linii 4T1, które po wszczepieniu dają *in vivo* model odpowiadający IV stadium zaawansowania ludzkiego potrójnie ujemnego raka piersi; oraz z komórek linii 67NR - dających *in vivo* model ludzkiego nieprzerzutującego raka piersi. Warto zauważyć, iż wybór takich modeli badawczych jest ważny dla aspektów translacyjnych podjętych badań. W swojej pracy Doktorantka zaplanowała również zbadać fenotyp limfocytów Th17 i innych limfocytów T CD4⁺ w kontekście ekspresji wybranych receptorów dla osteopontyny w różnych tkankach chorych

zwierząt, przeanalizować rolę tych receptorów w różnicowaniu limfocytów Th17 w obecności witaminy D i jej analogu, a także ocenić ekspresję wybranych genów istotnych w procesie proliferacji i różnicowania limfocytów CD4⁺ ogólnie oraz białek kluczowych dla przebiegu tych procesów, już wybiórczo, w samych limfocytach Th17. Wszystkie te badania Doktorantka zaplanowała wykonać zarówno w grupach myszy młodych, jak i 40-tygodniowych poddanych owariektomii, w modelu post-menopauzalnym. W tym miejscu należy podkreślić ogrom zaangażowania Doktorantki w realizację tych zadań, gdyż tak obszernie postawione cele badawcze mogłyby z powodzeniem stać się podstawą do realizacji kilku rozpraw doktorskich.

Kolejna część pracy - „Materiały i metody”, to dwudziestosześciostronicowy opis metod badawczych wykorzystanych w pracy, uzupełniony 13 tabelami i 2 rysunkami. Procedury laboratoryjne są właściwie dobrane a ich opis, w znakomitej większości, szczegółowy. Uwagę zwraca tu bardzo szeroki zakres zastosowanych metod badawczych, uwzględniający również techniki molekularne wykorzystane do genotypowania zwierząt czy analizy ekspresji genów na poziomie mRNA. Niektóre z użytych w badaniach metod to zaawansowane technologicznie, nowoczesne techniki, jak np. metoda Jess Simple Western służąca do zautomatyzowanej oceny ekspresji białek czy technika obrazowania ultrasonograficznego, wykorzystana do oceny perfuzji guzów nowotworowych. W tej części pracy pewien niedosyt pozostawia jednak opis procedur prowadzonych na zwierzętach, poczynawszy od braku danych o całkowitej liczbie zwierząt wykorzystanych do badań, niejasnej informacji o liczebności poszczególnych grup zwierząt, po brak opisu kontroli efektywności zabiegu owariektomii. W tym kontekście, przy tak wielowątkowych badaniach, dla zobrazowania ich pełnej koncepcji, w moim odczuciu pomocne byłoby wprowadzenie schematu przedstawiającego wszystkie grupy badane, ich liczebność i wykorzystanie na poszczególnych etapach realizacji badań. W aspekcie metodologii, bardzo interesowałaby mnie również informacja o kontrolach użytych do badań metodą cytometrii przepływowej, zwłaszcza tych służących do oceny swoistości wiązania poszczególnych przeciwciał i tych pozwalających na weryfikację zjawiska tzw. „spillover spreading” pomiędzy barwnikami fluorescencyjnymi. Z obowiązku recenzenta muszę też zwrócić uwagę na fakt, iż do oceny żywotności komórek stosuje się odpowiednie barwniki fluorescencyjne, a nie przeciwciała, jak niewłaściwie Doktorantka zakwalifikowała Fixable Viability Dye eFluor 780. Dysonans językowy budzą też użyte niekiedy skróty myślowe czy niezręczności stylistyczne, jak np. „zawartość próbówki przelewano do filtra”, „komórki policzono przy użyciu roztworu Trypan Blue” czy określenia slangowe typu „pelet” i „supernatant”, zamiast polskich odpowiedników - „osad” i „nadsącz”. Są to jednak drobne mankamenty, które nie umniejszają wartości merytorycznej tej części rozprawy.

Rozdział „Wyniki”, to najobszerniejsza część pracy. Doktorantka na 46 stronach, z użyciem 25 wykresów i 1 tabeli obszernie przedstawiła rezultaty swoich badań. Ich uzupełnieniem jest suplement, zawierający 9 dodatkowych rycin zamieszczonych na końcu rozprawy. Tę część pracy Doktorantka rozpoczyna od oceny aktywności przeciwnowotworowej użytych preparatów kalcytriolu i jego analogu. Autorka zestawiała uzyskane wyniki, porównując wpływ badanych związków na wielkość i unaczynienie guzów oraz masę ciała myszy młodych i w modelu post-menopauzalnym w trakcie trwania eksperymentu. W przypadku myszy w modelu post-menopauzalnym po owariektomii, dodatkową kontrolę stanowiły zwierzęta bez usuniętych jajników, poddane tylko chirurgicznemu nacięciu powłok ciała. W tym kontekście zastanawiające jest, dlaczego do pewnych analiz, np. oceny zmian masy ciała zwierząt grupa ta została włączona, a do innych już nie.

W dalszym etapie, Doktorantka przedstawiła wyniki badań *ex vivo*, poczynając od analizy parametrów morfologii krwi. Już to podstawowe badanie pozwoliło na zaobserwowanie istotnych różnic w składzie ilościowym leukocytów krwi, dokumentując u myszy z guzami 4T1 bardzo wyraźną leukocytozę, spowodowaną głównie wzrostem liczby krążących granulocytów i monocytów. Zmiany te występowały zarówno u zwierząt młodych, jak i w modelu post-menopauzalnym, a podawanie witaminy D lub jej analogu wartości tych parametrów jeszcze zwiększało. W rozprawie nie doszukałem się jednak interpretacji tego zjawiska w kontekście jego potencjalnego znaczenia dla odpowiedzi przeciwnowotworowej organizmu. Podczas obrony pracy chętnie więc poznam opinię Doktorantki na ten temat.

Dalej, Doktorantka przedstawiła wyniki analiz wpływu podawanej witaminy D lub jej analogu na wybrane parametry biochemiczne osocza, w tym poziom aminotransferaz oraz oceny aktywności przeciwprzerzutowej tych preparatów u myszy z rakiem 4T1. W tym ostatnim aspekcie Doktorantka oceniała liczbę przerzutów nowotworowych w odległych narządach (wątroba, śledziona, płuca, mózg, szpik kostny) oraz badała potencjał komórek 4T1 z tych narządów do tworzenia kolonii. Uzyskane wyniki wykazały zmniejszoną hepatotoksyczność takalcytolu w porównaniu z witaminą D oraz potwierdziły działanie hamujące obu preparatów na powstawanie odległych przerzutów u myszy z nowotworem typu 4T1 (tu jednak skuteczność witaminy D była wyższa).

Kolejny podrozdział przedstawia wyniki oceny fenotypowej limfocytów T CD4⁺ w tkankach zwierząt z rakiem gruczołu sutkowego, traktowanych witaminą D bądź jej analogiem. Wyniki te wskazują, iż w obrębie guza nowotworowego i płuc odsetek limfocytów T CD4⁺ istotnie wzrastał po podaniu tokalcytolu, a po podaniu witaminy D efekt taki zaobserwowano jedynie w tkance płucnej. Do tego fragmentu rozprawy mam jednak dwie uwagi. Po pierwsze, nie wszystkie limfocyty T CD4⁺ to limfocyty pomocnicze, jak podaje tu Doktorantka. Populacja ta obejmuje bowiem również limfocyty Treg, których działanie jest zgoła inne i z pewnością występują one w badanych tkankach, co zresztą dokumentuje sama Doktorantka nieco dalej na Rycinie 24. Zapewne do opisanych tu badań Doktorantka użyła komórek od zmodyfikowanych genetycznie myszy z ekspresją białka zielonej fluorescencji (GFP) znajdującego się pod kontrolą promotora dla mysiego czynnika FoxP3, co pozwoliło na eliminację z analizy cytofluometrycznej limfocytów Treg. Dla klarowności przekazu, informacja ta powinna jednak być podana na schemacie analizy (Rycina 17A) oraz w opisie tych wyników. Druga uwaga ma charakter metodyczny i dotyczy sposobu identyfikacji limfocytów T CD4⁺ w materiale tkankowym metodą cytometrii przepływowej. Na przedstawionym schemacie zabrakło mi etapu wyodrębnienia do analizy tylko leukocytów, np. w oparciu o ekspresję antygeny CD45. W konsekwencji, nie jest jasne w jakim stopniu populacja limfocytarna, identyfikowana w materiale tkankowym jedynie na podstawie parametrów morfologicznych (dot-plot I.) jest „kontaminowana” innymi niż limfocyty komórkami, o podobnych do nich wartościach parametrów *Forward* i *Side Scatter* (FSC i SSC). Jest to dość istotny aspekt, gdyż finalnie może powodować zaniżenie wartości odsetkowych badanych populacji limfocytów.

W kolejnym podrozdziale Doktorantka drobiazgowo przedstawiła wyniki analiz ekspresji receptorów dla osteopontyny na powierzchni limfocytów T CD4⁺ w różnych tkankach u myszy z rakiem 4T1, traktowanych witaminą D lub jej analogiem. Zadanie to było bardzo pracochłonne bowiem Doktorantka podjęła się tutaj zbadania ekspresji 4 znanych receptorów dla osteopontyny i to zarówno w modelu przed- jak i post-menopauzalnym. Liczba przebadanych tu próbek została dodatkowo zmnożona różnorodnym materiałem tkankowym wykorzystanym do tych oznaczeń – śledziona, płuca, guz, węzły chłonne i krew. Przedstawione wyniki wskazują na niewielki wpływ witaminy D i jej analogu na ekspresję tych receptorów na limfocytach T CD4⁺ – istotne statystycznie zmiany odnotowano w odniesieniu do ekspresji CD29 i CD51 na limfocytach w tkance guza po traktowaniu zwierząt takalcytolem w modelu post-menopauzalnym, CD29 i CD44 na limfocytach w krwi po traktowaniu witaminą D w modelu post-menopauzalnym oraz CD44 na limfocytach w śledzionie w modelu przed menopauzalnym.

W dalszej części tego rozdziału Doktorantka przedstawia wyniki badań oceniających wpływ kalcytriolu i takalcytolu na poziom limfocytów Th17 i Treg w różnych tkankach w obu typach raka gruczołu sutkowego u myszy młodych i w modelu post-menopauzalnym. Populację Th17 Doktorantka identyfikowała na podstawie cytoplazmatycznej produkcji IL-17 po stymulacji komórek danej tkanki PMA z jonomycyną w obecności brefeldyny A. Interesująca jest tu obserwacja wyraźnego wzrostu odsetka limfocytów Th17 w tkance guza 4T1 po podaniu witaminy D u zwierząt w modelu post-menopauzalnym. Należy żałować, iż nie udało się uzyskać odpowiedniej liczby komórek do przeprowadzenia analogicznej oceny w materiale z guzów myszy młodych. Liczę, iż w czasie obrony Doktorantka poda potencjalne przyczyny takiego stanu rzeczy. W kontekście tych wyników zastanawia mnie również, jak obecność w hodowli różnych typów komórek z badanych tkanek i ich produktów, w tym cytokin oraz samej witaminy D lub jej analogu może wpływać na poziom

limfocytów Th17? Wprowadzenie dodatkowej kontroli w postaci próbek niestymulowanych PMA z jonomycyną mogłoby rzucić nieco więcej światła na ten aspekt. Kwestię tę pozostawiam jednak otwartą do przedyskutowania podczas obrony pracy.

W przypadku limfocytów Treg, były one identyfikowane w oparciu o ekspresję „zielonego” czynnika FoxP3 oraz obecność antygenu CD25, a ich odsetek istotnie się obniżył w krwi zwierząt z nowotworem 4T1 w modelu post-menopauzalnym po podaniu witaminy D oraz ich węzłach chłonnych po podaniu takalcytolu.

Kolejne podrozdziały Doktorantka poświęciła opisowi analiz wpływu witaminy D i jej analogu na ekspresję wybranych genów, kluczowych dla różnicowania limfocytów T CD4⁺ oraz ekspresji białek szlaków sygnałowych istotnych dla różnicowania już samych limfocytów Th17. Analizy te zostały poprzedzone wynikami oceny czystości izolowanych ze śledzion limfocytów T CD4⁺. Izolacje te przeprowadzano metodą sortowania magnetycznego z wykorzystaniem selekcji pozytywnej, a przedstawione dane wskazują na duże zanieczyszczenie limfocytów T CD4⁺, zarówno komórkami pochodzenia nowotworowego, jak i innymi leukocytami. Doktorantki powinna ustosunkować się do tej kwestii i przedyskutować potencjalny wpływ tej relatywnie niskiej czystości komórek CD4⁺ na wyniki ekspresji badanych genów i białek wybranych szlaków sygnałowych.

Ostatnie podrozdziały tej części rozprawy zostały poświęcone wynikom analiz stężenia aktywnej formy witaminy D, naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) i osteopontyny. Związki te oznaczano w osoczu zwierząt z nowotworami 4T1 lub 67NR w modelu przed- i post-menopauzalnym po podaniach kalcytriolu lub takalcytolu. Doktorantka wykazała tu istotnie wyższe stężenie witaminy D w osoczach zwierząt, którym była ona podawana, co potwierdza jej dobre wchłanianie z przewodu pokarmowego w tej grupie zwierząt. Dodatkowo, we wszystkich grupach zwierząt z nowotworami, bez podawania witaminy D lub jej analogu stwierdzono wyższe stężenie osteopontyny w osoczu. Poziom osteopontyny dodatkowo mierzono w nadsączach z hodowli zarówno komórek CD4⁺, jak i wyindukowanych *in vitro* limfocytów Th17 od myszy z rakiem 4T1 w modelu przed- i post-menopauzalnym, po stymulacji PMA i jonomycyną. W odniesieniu do tych analiz nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami.

Na zakończenie tego wielowątkowego rozdziału Doktorantka przedstawiła wyniki wskazujące na istotną rolę wybranych receptorów dla osteopontyny, tj. CD44, CD51 i CD29 w procesie różnicowania śledzionowych limfocytów T CD4⁺ do indukowanych komórek Th17 (iTh17) oraz dalej, w kierunku limfocytów Th1 u myszy z guzem 4T1 w modelu przed- i post-menopauzalnym, w kontekście użycia witaminy D i jej analogu. Dane te mogą być podstawą do opracowania przyszłych nowych form immunoterapii nowotworów, nakierowanych na różnicowanie limfocytów Th17 w kierunku limfocytów Th1.

W „Podsumowaniu wyników” Doktorantka zwięźle rekapituje rezultaty swoich badań z poszczególnych etapów ich realizacji. Moja drobna uwaga dotyczy wniosku nr 2 z badań nad toksycznością zastosowania kalcytriolu i takalcytolu, w kontekście ich wpływu na skład ilościowy leukocytów – zaobserwowane zmiany ilościowe występowały w pełnej krwi a nie osoczu, jak pisze Doktorantka – osocze pozbawione jest bowiem elementów morfotycznych. Nie mogę jednak zgodzić się ze sformułowaniami odnoszącymi się do zmian ekspresji IL-17 w limfocytach T CD4⁺ oraz receptorów dla osteopontyny na tych komórkach pod wpływem witaminy D lub jej analogu. Zmianie ulegał bowiem odsetek (poziom) komórek produkujących IL-17 oraz posiadających na swojej powierzchni receptory dla osteopontyny, a nie ekspresja samych białek, jak konkluduje Doktorantka. O zmianach ekspresji danego białka moglibyśmy mówić w aspekcie analiz cytometrycznych jedynie na podstawie porównania średniej intensywności fluorescencji (MFI) badanych komórek, która jednak nie była tu oceniana.

Ze swej strony pragnę podkreślić ogromny wysiłek Doktorantki włożony w wykonanie i przeanalizowanie wyników tak szeroko zakrojonych badań. Ze względu na ich mnogość i stopień skomplikowania nie zawsze udało się je odpowiednio zrealizować, chociażby w kontekście doboru właściwych układów kontrolnych. Sporo do życzenia pozostawiają też aspekty analizy cytofluorymetrycznej. Mimo tych mankamentów, wyniki przedstawionych badań dostarczają

wartościowych obserwacji dotyczących wpływu witaminy D i jej analogu na różnicowanie limfocytów Th17 przy udziale osteopontyny u myszy z rakiem gruczołu sutkowego, zarówno w modelu przed-, jak i post-menopauzalnym. Właściwe ich wyselekcjonowanie i zestawienie z pewnością zaowocuje dobrymi publikacjami z tej tematyki.

Na uznanie zasługuje również „Dyskusja”. W tej części rozprawy, Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością przedmiotu i wnikliwie ustosunkowała się do uzyskanych wyników w kontekście literatury, biorąc również pod uwagę istotny dorobek w tym zakresie Zespołu swojego Promotora. Autorka przekonująco uzasadnia wybór modelu badawczego z użyciem komórek dwóch różnych typów raka gruczołu sutkowego oraz modelu przed- i post-menopauzalnego raka piersi. Na tle piśmiennictwa światowego dyskutuje celowość zastosowania kalcytriolu i jego analogu w leczeniu tego nowotworu. Autorka podkreśla odmienny status immunologiczny, a tym samym różną odpowiedź na stosowane kalcytriolu lub jego pochodnych organizmów młodych i w wieku post-menopauzalnym. Odmienne funkcjonowanie układu odpornościowego w zależności od wieku w różny sposób wpływa również na kształtowanie środowiska guza. W tym kontekście Doktorantka odnosi się do przebiegu choroby w wybranych przez siebie modelach, przytacza rolę osteopontyny i jej receptorów komórkowych oraz populacji limfocytów Treg i Th17 w różnych jednostkach chorobowych ze szczególnym odniesieniem do raka piersi i dyskutuje ją w kontekście własnych wyników i wcześniejszych badań Zespołu.

Rozprawę podsumowują 2 schematy oraz tabela, obrazujące wpływ kalcytriolu i takalcytolu na oceniane parametry w obu badanych typach raka gruczołu sutkowego w modelu przed- i post-menopauzalnym, oraz jasno sformułowane „Wnioski” końcowe. Spis Tabel i Rycin poprzedza listę piśmiennictwa, która obejmuje 317 pozycji starannie dobranych publikacji. Spośród tych cytacji, szereg odnosi się do artykułów opublikowanych przez Promotora Doktorantki, którego dorobek na tym polu badań jest nie do przecenienia. Całość rozprawy zamyka Suplement, zawierający 9 dodatkowych rycin, pomocnych do zilustrowania odpowiednich fragmentów wyników badań.

Na zakończenie swojej recenzji pragnę podkreślić, iż dysertacja doktorska mgr Aleksandry Strzykalskiej prezentuje wyniki oryginalnych badań i jest interesująca, tak z naukowego, jak i potencjalnie translacyjnego punktu widzenia. Przedstawione badania są logiczną kontynuacją zainteresowań naukowych Promotora Doktorantki na tym polu i stanowią istotny wkład dla racjonalnego stosowania witaminy D i jej analogów w terapii raka piersi. Osobiście jestem zwolennikiem prezentacji rozprawy doktorskiej właśnie w formie monografii. W przeciwieństwie do zbioru publikacji, tzw. „spinki”, taka forma daje bowiem recenzentowi możliwość prześledzenia różnych aspektów podjętych przez doktoranta badań. Zwykle, znaczna ich część nie będzie przedmiotem publikacji, ale ich prezentacja daje całościowy obraz zakresu zaplanowanych badań oraz zaangażowania samego doktoranta. W tym konkretnym przypadku, Doktorantka wykazała się wręcz tytaniczną pracą, a ilość zebranych przez Nią danych jest olbrzymia i jestem przekonany, iż po odpowiednim ich wyselekcjonowaniu będą one podstawą dla wartościowych publikacji.

Podsumowując, stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.187 ust.1-4 Ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (t.j. Dz.U. 2023 r. poz. 742 z późn.zm.). W związku z powyższym, zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu z wnioskiem o dopuszczenie mgr Aleksandry Strzykalskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne.

Kraków, 15.01.2025

Katedra Immunologii Klinicznej
i Transplantologii UJ CM


dr hab. n. med. Jarosław Baran, prof. UJ