



dr hab. n. med. Anna A. Brożyna, prof. UMK
Katedra Biologii Człowieka
Instytut Biologii
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
ul. Lwowska 1
87-100 Toruń
e-mail: anna.brozyna@umk.pl

Toruń, 09.01.2025r.

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Strzykalskiej
z tytułu „Zależny od wieku wpływ kalcytriolu i takalcytolu na różnicowanie
limfocytów Th17 przy udziale osteopontyny w mysim raku gruczołu sutkowego”
wykonanej w Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej
Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu
pod kierunkiem promotorów
prof. dr hab. Joanny Wietrzyk oraz dr inż. Mateusza Psurskiego

1. Podstawa formalno-prawna opracowania recenzji

Przedmiotem recenzji jest dysertacja doktorska Pani **mgr Aleksandry Strzykalskiej**, pt. „Zależny od wieku wpływ kalcytriolu i takalcytolu na różnicowanie limfocytów Th17 przy udziale osteopontyny w mysim raku gruczołu sutkowego”. Promotorami rozprawy jest Pani prof. dr hab. Joanna Wietrzyk i Pan dr inż. Mateusz Psurski Matkowski.

Podstawą formalną opracowania recenzji jest pismo z dnia 30 października 2024r. (RN-96/2024) Pana Dyrektora Instytutu, prof. dr hab. Andrzeja Gamiana, w sprawie powierzenia mi oceny rozprawy doktorskiej mgr **Aleksandry Strzykalskiej**, w oparciu o uchwałę Rady Naukowej Instytutu podjętej 10 października 2024 roku.

Recenzja ma na celu ustalenie, czy rozprawa spełnia wymogi określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. z 2023 poz. 742 z późn. zm.). Ocenę końcową oparto na następujących kryteriach: wybór problemu badawczego i tematu rozprawy, cele i hipotezy badawcze, metodyka badań, układ treści oraz zawartość formalna i merytoryczna pracy.

2. Formalna ocena pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma konwencjonalny oraz logiczny układ i spełnia wymagania stawiane dysertacjom doktorskim o charakterze eksperymentalnym. Została napisana klarownym i poprawnym językiem. W większości rozdziałów wydzielono liczne, trafne z merytorycznego punktu widzenia, podrozdziały. Rozprawa liczy 194 strony i

składa się z następujących rozdziałów: Streszczenia w języku polskim i angielskim (4 strony), Wykazu skrótów (3 strony), Wstępu (35 stron), Założeń i celów pracy (1 strona), Materiałów i metod (25 stron), Wyników (47 stron), Podsumowania wyników (3 strony), Dyskusji (18 stron), Wniosków (1 strona), Bibliografii (27 stron, 317 pozycji). Zamieszczono również: spis tabel i rycin (łącznie 4 strony, 38 rycin, 16 tabel) oraz suplement (7 stron, 92 rycin), co ułatwia lekturę pracy oraz wzbogaca ją o graficzne przedstawienie dodatkowych wyników. Ponadto, Doktorantka zamieściła informację o źródłach finansowania badań (projekt NCN pt. „Udział osteopontyny we wpływie kalcytriolu i takalcytolu na różnicowanie komórek Th17 u młodych i starych myszy obarczonych rakiem gruczołu mlekowego”, nr 2019/35/B/NZ5/01). Zbrakło natomiast informacji o publikacji wyników uzyskanych przez Doktorantkę oraz informacji o współautorstwie publikacji innych niż wynikających z realizacji prac w ramach rozprawy doktorskiej. Należy także zaznaczyć, że przygotowanie wykazu skrótów w kolejności alfabetycznej znacznie ułatwiłoby korzystanie z niego. Dodatkowo, nie wszystkie skróty użyte w pracy zostały uwzględnione w ww wykazie (np.: CRE).

3. Ocena wartości merytorycznej

Doktorantka w swojej pracy podjęła się próby oceny wpływu kalcytriolu i jego analogu - takalcytolu, na tempo wzrostu guzów piersi, ich zdolność do przerzutowania a także proces angiogenezy. Ponadto, Doktorantka dokonała charakterystyki odpowiedzi immunologicznej Th17 i Treg w organizmach myszy w trakcie progresji raka gruczołu sutkowego, traktowanych kalcytriolem i takalcytolem. Badania skupiły się szczególnie na wpływie tych związków na ekspresję receptorów dla osteopontyny i ich roli w procesie różnicowania limfocytów, a także na ich regulowaniu ekspresji genów i białek istotnych w procesach proliferacji i różnicowania limfocytów T. Podjęta przez Doktorantkę tematyka badawcza jest niezmiernie ważna z punktu widzenia zrozumienia potencjału terapeutycznego kalcytriolu i jego analogów w zależności m.in. od statusu menopauzalnego. Jest to także niezmiernie aktualny temat, gdyż w ostatnich latach coraz większą wagę przykłada się do holistycznego traktowania procesu nowotworowego, uwzględniającego m.in. mikrośrodowisko guza nowotworowego i oddziaływanie komórek nowotworowych z komórkami prawidłowymi, np.: fibroblastami i limfocytami, a w swoich badaniach Doktorantka skupia się właśnie na układzie immunologicznym, szczególnie komórkach Treg i Th17, których rola w progresji nowotworów wciąż jest nie do końca poznana. Doktorantka w dysertacji także zwraca uwagę na wielokierunkowość działania tych limfocytów oraz na złożony mechanizm regulacji ich działania pod wpływem kalcytriolu i takalcytolu. Uważam, że badania, których realizacji podjęła się Doktorantka poszerzają wiedzę w zakresie potencjału terapeutycznego kalcytriolu i takalcytolu i/lb modulacji odpowiedzi immunologicznej przez te związki u pacjentek z nowotworami piersi w zależności od statusu menopauzalnego.

We **Wstępie** Doktorantka przedstawiła przegląd literatury związanej z zagadnieniami poruszonymi w pracy. Rozdział ten jest stosunkowo obszerny, bardzo dobrze napisany od

strony merytorycznej, jak i stylistycznej i pokazuje znajomość literatury przedmiotu Doktorantki. Szczegółowo zostały przedstawione zagadnienia związane z charakterystyką nowotworów piersi, uwzględniając epidemiologię, klasyfikacje i nowoczesne terapie stosowane w leczeniu tych nowotworów. Doktorantka osobne podrozdziały poświęciła: mechanizmom działania witaminy D, jej analogom oraz roli witaminy D w karcynogenezie, w tym karcynogenezie guzów piersi, znaczeniu osteopontyny w regulacji odpowiedzi immunologicznej, a także roli komórek układu immunologicznego, szczególnie limfocytów Treg i Th17 w progresji nowotworów. Rozdział ten wzbogacony został przez 8 rycin opracowanych przez Doktorantkę. W czasie lektury tego rozdziału nasunęły mi się następujące uwagi:

-zabrakło informacji alternatywnych szlaków metabolizmu witaminy D, szczególnie szlaków w które zaangażowany jest CYP11A1, a także na temat pochodnych witaminy D, powstających w tych szlakach, które wykazują wysoką aktywność biologiczną; wprawdzie Doktorantka wspomina o analogach witaminy D, ale jedynie w kontekście syntezy analogów do zastosowań terapeutycznych;

-podobnie, brakło informacji na temat alternatywnych receptorów dla witaminy D (ROR alfa i ROR gamma), które są również badane przez Doktorantkę w kontekście modulacji działania komórek układu immunologicznego, szczególnie limfocytów Th17.

Pomimo powyższych uwag, uważam, że dane zawarte w tym rozdziale są przedstawione w sposób zrozumiały i stanowią dobrze przygotowane teoretyczne wprowadzenie oraz uzasadnienie do podjętej w badaniach naukowych tematyki.

Jako osobny rozdział wyodrębniono **Założenia i cele pracy**, które obejmowały scharakteryzowanie:

- efektu przeciwnowotworowego kalcytriolu i takalcytolu poprzez określenie ich wpływu na wzrost guzów, proces przerzutowania i angiogenezy w dwóch modelach raka piersi u myszy;

- odpowiedzi immunologicznej Th17 i Treg w progresji raka gruczołu sutkowego u myszy traktowanych kalcytriolem i takalcytolem, z uwzględnieniem oceny fenotypowej populacji limfocytów Th17 oraz ekspresji wybranych receptorów dla osteopontyny;

- wpływu kalcytriolu i takalcytolu na ekspresję genów i białek kluczowych w procesach proliferacji i różnicowania limfocytów Th17;

- roli receptorów dla osteopontyny w różnicowaniu limfocytów Th17 pod wpływem kalcytriolu i takalcytolu w modelu raka gruczołu sutkowego.

O ile cele główne i pośrednie ocenianej dysertacji zostały opisane poprawnie, o tyle założenia/hipotezy pracy w mojej ocenie nie zostały przedstawione. Nie zmienia to jednak faktu, że podejmowana tematyka badawcza i postawione cele badawcze reprezentują ważne

badania naukowe, które pozwalają na lepsze zrozumienie wpływu kalcytriolu i takalcytolu na proces progresji nowotworu piersi w zależności od statusu menopauzalnego, modulację odpowiedzi immunologicznej, szczególnie limfocytów Th17 oraz limfocytów supresorowych Treg. Ponadto, choć Doktorantka tego nie wskazuje bezpośrednio, zaplanowane doświadczenia również wpisują się w nurt poszukiwań nowych terapii. Dokładne poznanie mechanizmów regulacji działania komórek układu immunologicznego być może pozwoli na rozwój terapii przeciwnowotworowych opartych na witaminie D lub jej analogach.

Rozdział **Materiały i metody** został podzielony na 5 podrozdziałów i zawiera opis użytych odczynników, charakterystykę użytych linii komórkowych, opis użytych zwierząt doświadczalnych wraz z zaplanowanymi i przeprowadzonymi badaniami in vivo oraz ex vivo. Doktorantka również w sposób graficzny przedstawiła schemat zaplanowanych na danym materiale tkankowym badań. Na uwagę zasługuje szeroki wachlarz użytych metod eksperymentalnych, w tym technik opartych na modelu zwierzęcym, na ustalonych liniach komórkowych, technik biologii molekularnej, takie jak RT-PCR, immunofenotypowanie przy użyciu cytometrii przepływowej. Należy zaznaczyć, że doświadczenia zostały dokładnie zaplanowane, z uwzględnieniem odpowiednich kontroli, np.: kontroli „sham”, co pozwoliło na ocenę rzeczywistego wpływu badanych związków na wzrost guzów czy przerzutowanie. Dodatkowo, Doktorantka do badań wprowadziła także modele mysie przed- i pomenopauzalne, co także stanowi dodatkową wartość uzyskanych wyników. Należy podkreślić, że Doktorantka zaznaczyła które badania wykonywała we sama lub w współpracy, a które były zlecane jednostkom zewnętrznym.

Wszystkie metody zostały zastosowane prawidłowo, choć nasunęło się pytanie o dawkę/stężenie rozpuszczalnika podawanego zwierzętom.

W rozdziale **Wyniki**, podzielonym na tematyczne podrozdziały, Doktorantka dokonała omówienia rezultatów wyników przeprowadzonych badań dotyczących analizy wpływu kalcytriolu i takalcytolu na wzrost guzów, masę ciała myszy, angiogenezę, zdolności do przerzutowania, a także na parametry morfologiczne i biochemiczne krwi oraz fenotyp limfocytów Treg i Th17. Dostyc obszerny opis i graficzną prezentację uzyskanych wyników Doktorantka zakończyła dodatkowym rozdziałem - **Podsumowaniem wyników**, w którym, w sposób systematyczny, wypunktowała najważniejsze uzyskane wyniki. Lektura tej części dysertacji obrazuje ogrom pracy, jaki Doktorantka włożyła w realizację badań oraz ich analizę i graficzne przedstawienie.

Za najciekawsze, w mojej ocenie, należy uznać wyniki in vivo oraz ex vivo wskazujące na zróżnicowane działanie kalcytriolu i takalcytolu na badane modele guzów sutka. Wyniki te pokazały, że komórki nowotworowe w modelu przedmenopauzalnym cechują się inną wrażliwością na działanie badanych związków w porównaniu do modelu pomenopauzalnego, w którym odnotowano spadek liczby przerzutów do płuc po traktowaniu kalcytriolem oraz do wątroby po traktowaniu kalcytriolem i takalcytolem (model 4T1) oraz spadek wartości PE po traktowaniu takalcytolem (model 67NR). Powyższe obserwacje wskazują, iż potencjalne rozbieżności w badaniach epidemiologicznych dotyczących działania witaminy D mogą mieć

m.in. źródło w statusie menopauzalnym pacjentek, a także, że pacjentki w okresie pomenopauzalnym mogą odnieść potencjalnie większą korzyść z terapii opartych na witaminie D. Również profilowanie odpowiedzi immunologicznej zależne było od statusu menopauzalnego, co także wskazuje na konieczność jego uwzględnienia w planowanych badaniach i opracowywanych terapiach, nie tylko hormonalnych, a co Doktorantka również podkreśliła w dyskusji oraz wypunktowała we Wnioskach („w modelu przedmenopauzalnym raka 4T1, populacja Th17 pod wpływem leczenia witaminą D3 zyskuje charakter pronowotworowy. W modelu pomenopauzalnym dominuje populacja Th17 o charakterze przeciwnowotworowym, a populacja pronowotworowych komórek Treg obniża się”, „kalcytriol i takalcytol wyciszają odpowiedź ze strony komórek Treg, jednocześnie zwiększając udział populacji Th17 w pomenopauzalnym modelu 4T1. W przypadku traktowania myszy obarczonych rakiem gruczołu sutkowego 4T1 kalcytriolem, zwiększeniu udziału komórek Th17 oraz obniżeniu liczby komórek Treg towarzyszy zahamowanie tworzenia przerzutów do wątroby i płuc po zastosowaniu kalcytriolu”).

Po rozdziale prezentującym uzyskane wyniki Doktorantka zamieściła **Dyskusję**, w której skonfrontowała uzyskane wyniki z danymi literaturowymi z zakresu tematycznego poruszanego w ocenianej pracy, m.in. w kontekście wpływu kalcytriolu i/lub takalcytolu na wzrost guza, immunosupresję i fenotyp limfocytów. W tym rozdziale Doktorantka dodała również graficzną prezentację uzyskanych wyników w zakresie leczenia kalcytriolem i takalcytolem na parametry związane z procesem nowotworowym oraz populację limfocytów Th17 i Treg, co znacznie ułatwia poruszanie się w zawiłościach uzyskanych wyników, podobnie jak tabelarycznie zostały przedstawione wyniki wpływu blokowania poszczególnych receptorów dla osteopontyny na różnicowanie limfocytów Th17 i Th1. Wprawdzie uzyskane wyniki są dyskutowane tylko z kilkoma publikacjami, zwłaszcza biorąc pod uwagę ogólną liczbę cytowanych artykułów, ale należy uwzględnić dosyć szczególny cel projektu ukierunkowany na określone modele nowotworów, profilowanie układu immunologicznego oraz testowane związki.

Mając na uwadze uzyskane wyniki chciałabym dodatkowo prosić Doktorantkę o przedstawienie planów lub perspektyw dalszych badań.

Podsumowując, praca napisana jest dojrzałym i poprawnym językiem, jest przygotowana dokładnie i estetycznie. Ryciny i tabele są adekwatne do treści rozdziałów, na ogół dobrej jakości, przejrzyste i zawierają wiele cennych informacji.

4. Ocena końcowa

Przedstawione wyniki pracy doktorskiej Pani Aleksandry Strzykalskiej stanowią istotny wkład w scharakteryzowanie wpływu kalcytriolu i jego analogu – takalcytolu na biologię raka piersi. Sposób zaplanowania i przeprowadzenia badań, przedstawienia podstaw teoretycznych podjętego problemu badawczego, sposób prezentacji oraz interpretacja wyników dowodzą, że Doktorantka ma nie rozległą wiedzę dotyczącą przedmiotu badań, a także umiejętność analizy uzyskanych wyników. Kandydatka wykazała znaczące

doświadczenie w planowaniu i prowadzeniu prac badawczych. Autorka zastosowała wiele metod eksperymentalnych i odpowiednio zinterpretowała uzyskane wyniki, co potwierdza Jej naukową dojrzałość. Moje uwagi i komentarze również drobne usterki redakcyjne, błędy stylistyczne, literowe, czy drobne błędy przy bazie bibliograficznej, których nie zamieszczałam w niniejszej recenzji, nie podważają wysokiej wartości pracy. W mojej ocenie Doktorantka w pełni rozwiązała oryginalny problem badawczy, jaki przed sobą postawiła.

5. Wniosek końcowy

Uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska **mgr Aleksandry Strzykalskiej** pt. „**Zależny od wieku wpływ kalcytriolu i takalcytolu na różnicowanie limfocytów Th17 przy udziale osteopontyny w mysim raku gruczołu sutkowego**” spełnia wszelkie wymagania określone wymogi określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. z 2023 poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym przedkładam Radzie Naukowej Instytutu wniosek o dopuszczenie mgr Aleksandry Strzykalskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Kierownik
Katedra Biologii Człowieka

dr hab. Anna Brożyna, prof. UMK
tel. 56 611 45 99