



Wrocław, 3 czerwca 2018 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr Agaty Pawlik

pt. „Wpływ kalcytriolu oraz jego analogów na proces zapalny towarzyszący rozwojowi mysiego raka gruczołu sutkowego”

wykonanej w Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej
Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu
pod kierunkiem promotora - **prof. dr hab. Joanny Wietrzyk**

OCENA MERYTORYCZNA PRACY

1. Temat pracy, trafność podjętej problematyki badawczej i jej oryginalność

We współczesnej onkologii ogromne znaczenie mają nie tylko udoskonalone techniki chirurgiczne, radioterapeutyczne czy klasyczna chemioterapia i hormonoterapia, ale również nowe klasy leków przeciwnowotworowych lub ich kombinacji z substancjami potęgującymi działanie przeciwnowotworowe. Większość z nich koncentruje się obecnie na ingerencji w proces odpowiedzi immunologicznej. Są to nie tylko klasyczne już przeciwciała blokujące receptory powierzchniowe jak np. trastuzumab, pertuzumab, cetuksymab ale również przeciwciała blokujące tzw. punkty kontrolne układu odpornościowego (immune checkpoints) takie jak niwolumab, pembrolizumab czy ipilimumab. Coraz częściej zadaniem terapii nie jest bezpośredni toksyczny wpływ leku na komórki nowotworu złośliwego ale przełamanie tolerancji immunologicznej oraz wykształcenie efektywnej odpowiedzi odpornościowej. Dlatego badania nad wpływem kalcytriolu oraz jego analogów, substancji o udowodnionym wpływie modulującym układ odpornościowy, nabrały nowego wymiaru i dużego znaczenia poznawczego. Zwłaszcza, że coraz bardziej poszukiwane są terapie zwiększające efektywność i tolerancję w porównaniu do standardowych metod leczenia a próby kliniczne z użyciem kalcytriolu u chorych na nowotwory hematologiczne okazały się obiecujące.

Założenia przyjęte przez Autorkę rozprawy są oryginalne i ciekawe z punktu widzenia poznawczego ale i praktycznego. Uważam, że podejmowanie tej tematyki badań jest uzasadnione i pożądane. Miejsce, sekwencja i sposób stosowania suplementacji witaminy D w nowotworach złośliwych pozostaje bowiem obiektem licznych kontrowersji i badań klinicznych. Najlepszym dowodem na aktualność badanego zagadnienia jest dwoiste stanowisko Niemieckiego Towarzystwa Ginekologii Onkologicznej (z marca 2018 roku; <https://www.ago-online.de/en/guidelines-mamma/march-2018/>) w tej kwestii stosowania witaminy D jako substancji mającej zmniejszać ryzyko nawrotu u pacjentów stosujących diety zbilansowaną. Podobnie ambiwalentne wyniki badań obserwuje się w raku jajnika (Yin L, Grandi N, Raum E, Haug U, Arndt V, Brenner H. Meta-analysis. Circulating vitamin D and ovarian cancer risk. *Gynecol Oncol* 2011;121(2):369–75.) W związku z powyższym tematykę podjętego badania uważam za bardzo ważną i oryginalną.

2. Uzyskane rezultaty i ich znaczenie dla nauki i praktyki

W wyniku przeprowadzonych badań, analizy statystycznej wyników Doktorantka sformułowała 10 wniosków będących jednoznaczną odpowiedzią na ustalone cele pracy. Wskazują, m. innymi, że zastosowane pochodne witaminy D nie wpływają na wzrost guza pierwotnego 4T1, jednak stymulują przerzutowania do płuc mysiego raka gruczołu sutkowego u myszy młodych. Dodatkowo udowodniła na modelu mysim immunosupresyjne działanie kalcytriolu i jego analogów.

Obserwacje poczynione przez Doktorantkę mają zatem **istotne implikacje poznawcze i kliniczne**.

3. Poprawność formalno językowa, stylistyczna i interpunkcyjna

Praca napisana jest poprawnym językiem, z użyciem prawidłowej stylistyki i terminologii. Szczegółowa lektura pracy pozwoliła wprawdzie wykryć literówki i niezręczności stylistyczne czy interpunkcyjne, jednak w mojej opinii nie wpływają one na całość dysertacji. Wartość merytoryczna pracy idzie w parze z umiejętnością argumentacji i polemiki. Edycja pracy jest prawidłowa i niezwykle staranna.

OCENA METODOLOGICZNA PRACY

A. Dobór literatury, umiejętność wykorzystywania źródeł

Piśmiennictwo obejmujące 283 pozycje bezpośrednio związane z tematyką pracy, w dużej części opublikowanych w ostatnim dziesięcioleciu a aż 53 spośród nich, czyli 19% – w ostatnim pięcioleciu. Piśmiennictwo jest właściwie dobrane i odpowiednio cytowane. Autorka poprawnie prezentuje swoje poglądy, oraz jest w stanie sprawnie je wspierać posługując się wynikami badań własnych oraz piśmiennictwem.

B. Poprawność formułowania problemów i hipotez (założeń badawczych)

Cele badań sprecyzowano jednoznacznie i rzeczowo. Badanie oparte jest na modelach myszy młodych oraz modelu mysim pomenopauzalnym. Zasadniczym celem, osiągniętym poprzez realizację 7 celów pośrednich było zbadanie wpływu kalcytriolu oraz jego analogów (PRI-219, PRI-2205) na wzrost i przerzutowanie mysiego raka gruczołu sutkowego 4T1. Należy podkreślić, że dane doświadczalne są bardzo starannie udokumentowane i opisane a pieczołowita obserwacja zwiększa wartość badania. Wnioski są jednoznaczną odpowiedzią na ustalone cele pracy.

C. Trafność doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętność ich zastosowania

Rozdział dotyczący metod użytych w badaniach zajmuje 23 strony i opisuje badane modele doświadczalne oraz metodykę pracy. Należy podkreślić, że niezwykle starannie opisana metodyka wnosi do pracy dodatkowy walor w postaci możliwości potencjalnego powtórzenia doświadczeń w identycznych i/lub innych modelach zwierzęcych i nowotworowych oraz porównania wyników. Założenia i metody pracy, dobór badanych modeli doświadczalnych i analiza uzyskanych wyników (w tym analiza biostatystyczna) nie budzą żadnych zastrzeżeń. Wnioski są wyważone i wynikają z przeprowadzonych badań i ich analizy. Doktorantka podkreśla poznawcze implikacje wyników pracy poparte danymi z piśmiennictwa.

D. Prawidłowość układu pracy i struktury podziału treści

Dysertacja posiada tradycyjny układ: na 181 stronach zawiera spis treści, wykaz stosowanych skrótów, 6 rozdziałów, zakończona jest wnioskami, spisem piśmiennictwa, tabel i rycin, załącznikami oraz opatrzona streszczeniami w języku polskim i angielskim. Trzydzieści jeden rycin oraz 10 tabel i 7 załączników jest doskonałej jakości i znakomicie ilustruje wyniki. W części rycin Doktorantka posłużyła się bardzo małą czcionką, ale lupa do oceny mikrozwapnień w mammografiach diagnostycznych znakomicie pomogła Recenzentowi w ich odszyfrowaniu. Sugerowałbym jednak użycie w dalszych publikacjach tego materiału większych opisów (zwłaszcza w przypadku rycin 26 i 27).

Wstęp zawarty jest na 37 stronach. Jest napisany przejrzysto, stanowi syntezę najnowszych poglądów na temat roli układu immunologicznego, stanu zapalnego, ich mediatorów, metabolizmu i roli witaminy D oraz podstaw terapii systemowej raka piersi. Ta część pracy, biorąc pod uwagę znaczącą ilość materiałów naukowych opisujących te tematy, napisana jest bardzo dobrze i świadczy o umiejętności Doktorantki zwięzłego korzystania z piśmiennictwa. Bardzo doceniam rzeczowość wstępu i skoncentrowanie się na opisie zagadnień bezpośrednio związanych z tematyką dysertacji. Doktorantka bardzo umiejętnie uniknęła umieszczenia we wstępie nadmiaru powszechnie znanych faktów, co jest najczęstszą dolegliwością rozpraw doktorskich. Dzięki temu nie została zaburzona proporcja pomiędzy wstępem a resztą rozprawy a sam wstęp odpowiednio i rzeczowo wprowadza w tematykę badań.

Na kolejnych 46 stronach Doktorantka sprawozdaje wyniki badań posługując się czytelnymi wykresami, załącznikami i tabelami znakomicie ilustrującymi uzyskane dane.

Podsumowanie, omówienie wyników i dyskusja spisane na 19 stronach oparte są o najnowsze doniesienia naukowe. Są - podobnie jak wstęp pracy - merytoryczne. Podsumowując - układ i podział pracy są prawidłowe.

UWAGI I PROPOZYCJE

Z obowiązku Recenzenta chciałbym zwrócić uwagę i uściślić następujące kwestie:

- I. Proces EMT powinniśmy tłumaczyć na język polski raczej jako „przejście nabłonkowo-mezenchymalne” a nie „epitelialno-mezenchymalne” (strona 35).
- II. Rozdział dotyczący epidemiologii (strona 36) wymaga uściślenia. Doktorantka podaje, że ACS szacuje liczbę nowych zachorowań na raka piersi w 2018 roku na ponad 2 mln. Musiał wkraść się błąd bowiem na całym świecie rocznie obserwuje się około 1 mln 700 tys. nowych zachorowań rocznie, w tym w USA około 240 tysięcy rocznie a w Polsce około 18 tysięcy rocznie. Liczba przewidywanych zgonów również wymaga doprecyzowania, gdyż rokowanie w raku piersi jest na ogół dobre, jedne z najlepszych wyników na świecie osiągnęte są właśnie w USA, gdzie według SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Results Program* - rejestr nowotworów obejmujący część populacji USA) standaryzowane przeżycie 5-letnie wśród białych kobiet leczonych w latach 2002-2006 wynosi 91.7%, wśród czarnych kobiet 77.9% i średnio w całej populacji 90.2%. Najprawdopodobniej całkowita chorobowość w USA została omyłkowo zacytowana w miejscu liczby nowych zachorowań.
- III. Również rozdział dotyczący klasyfikacji nowotworów piersi wymaga doprecyzowania. Należy oddzielić klasyfikację histologiczną (wg WHO) ocenianą na podstawie badania fenotypu mikroskopowego raka od klasyfikacji molekularnej bazującej na analizie ekspresji genów oraz od podtypów biologicznych różniących się ekspresją białek i receptorów. Z kolei rak zapalny to jedna z manifestacji klinicznych zaawansowanego miejscowo raka piersi – nie

- jest rak zapałny odrębnym podtypem biologicznym ani molekularnym ani histologicznym. Zależności pomiędzy poszczególnymi klasyfikacjami doskonale zobrazowane są m. in. w pracach Korsching E i wsp. J Clin Pathol 2008;61:553-560 oraz Mayer IA i wsp. Clin Cancer Res 2014;20:782-790. Z kolei najnowsze klasyfikacje histologiczna i kliniczna znajduje się na stronie internetowej CAP (College of American Pathologists) w zakładce Cancer Protocol Templates.
- IV. Podtyp biologiczny "triple negative breast cancer" posiada obecnie w języku polskim nazwę „raka piersi potrójnie ujemnego” a nie „negatywnego” (strona 38).
 - V. Na stronie 41 w zarysie terapii systemowej Autorka nie wspomniała o klasycznym już przeciwciele przeciwko receptorowi HER2 jakim jest trastuzumab – zarejestrowanym również w Polsce ważnym leku.
 - VI. Proponuję również odważniej używać precyzyjniejszego określenia rak zamiast nowotwór, gdyż rozprawa dotyczy raka, czyli nowotworu złośliwego. Dlatego zamiast użytego „nowotwory ER pozytywne” posłużyłbym się „raki wykazujące ekspresję ER”.

Wszystkie wymienione zastrzeżenia w żaden jednak sposób nie umniejszają wartości pracy. **Po wnikliwej lekturze dysertacji Pani mgr Agaty Pawlik oceniam ją bardzo wysoko.** Jest to obszerne i samodzielne opracowanie i rozwiązanie problemu naukowego przy użyciu nowoczesnych metod i jest dowodem umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. **Dlatego stawiam wniosek o wyróżnienie i nagrodzenie niniejszej rozprawy doktorskiej przez Radę Naukową Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu** za rzetelne opracowanie nowatorskiego i ważnego tematu badawczego. Badanie jest bowiem ważnym głosem w dyskusji na temat miejsca kalcytriolu i jego pochodnych w onkologii. Konkluzje Autorki ukazują Jej świadomość, że przeprowadzone doświadczenia i analizy mają charakter wstępny i stanowią solidną podstawę do dalszych badań. Ponadto należy podkreślić, że część wyników została opublikowana w recenzowanym czasopiśmie naukowym - to dowodzi wysokiej jakości naukowej uzyskanych wyników.

PODSUMOWANIE

Zdaniem Recenzenta, oceniana **monografia Pani mgr Agaty Pawlik** pt. „Wpływ kalcytriolu oraz jego analogów na proces zapałny towarzyszący rozwojowi mysiego raka gruczołu sutkowego” wykonana w Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod kierunkiem promotora - prof. dr hab. Joanny Wietrzyk, **spełnia kryteria przypisane** w art.13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki (Załącznik do obwieszczenia Marszałka Sejmu RP z dnia 2 grudnia 2014 r. – Dz. U. poz. 1852) **rozprawom na stopień naukowy doktora.**

Dlatego zwracam się z pełnym przekonaniem do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu o dopuszczenie Pani mgr Agaty Pawlik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

2 wyrażam na umowę,
Rafał Matuszko