

Dr hab. n. biol. Roman Paduch, prof. nadzw.
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
Wydział Biologii i Biotechnologii
Zakład Wirusologii i Immunologii

Lublin, dn. 12.06.2018 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej **mgr Artura Anisiewicza**
pt. "Regulacja mikrośrodowiska guza przez kalcytriol i jego analogi w procesie
przerzutowania mysiego raka gruczołu sutkowego"
wykonanej pod kierunkiem dr hab. Joanny Wietrzyk, prof. nadzw.

Rozprawa doktorska mgr Artura Anisiewicza obejmuje ocenę aktywności kalcytriolu i wybranych dwóch analogów tej aktywnej hormonalnie postaci witaminy D₃ w regulacji mikrośrodowiska guza oraz potencjału do tworzenia przerzutów przez komórki nowotworowe mysiego raka gruczołu sutkowego. Zaletą przedstawionych założeń badawczych, co również wiąże się z dojrzałością naukową Doktoranta, było zaplanowanie i wykonanie eksperymentów zarówno w warunkach *in vivo* z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych jak też i rozszerzenie zakresu ocenianych parametrów poprzez wykonanie testów w hodowlach komórkowych *in vitro*. Cele badawcze zrealizowano w oparciu o nowoczesne techniki, m.in. analizy USG, pomiary markerów powierzchniowych leukocytów krwi obwodowej metodą cytometrii przepływowej, ekspresji mRNA metodą real-time PCR, pomiaru poziomu białek metodami western blotting czy immunoenzymatycznym testem ELISA.

Złośliwy nowotwór gruczołu piersiowego, w obrębie którego większość stanowią raki, jest obecnie najczęstszą zmianą nowotworową u kobiet, która stanowi istotne zagrożenie w każdej grupie wiekowej. Wykrycie zmiany we wczesnym stadium rozwoju, tak jak w przypadku nowotworów rozwijających się w innych organach, umożliwia wdrożenie skutecznego leczenia pozwalającego na uzyskanie wysokiego odsetka przeżyć 5-letnich. Niestety, zmiany wykryte w zaawansowanym stadium, z reguły występują jako postać rozsiana w narządach odległych, głównie w kościach, płucach, skórze, wątrobie czy mózgu. Drogami szerzenia się raka gruczołu piersiowego są zarówno naczynia chłonne jak i

krwionośne. Stąd też wszelkie zabiegi zmierzające do redukcji procesów angiogenezy lub limfangiogenezy stanowią istotny element terapii tej choroby. Ponadto, działania oparte na ograniczaniu parakrynnych oddziaływań w obrębie niszy nowotworowej między komórkami rakowymi a stromą również będą efektywnym postępowaniem zmierzającym do ograniczenia rozsiewu komórek tego nowotworu w organizmie. Z uwagi na fakt, że blisko 70% przerzutów raka gruczołu sutkowego stwierdza się w kośćcu, zasadnym jest analiza w tym procesie charakteru witaminy D₃ związanej, m. in. z prawidłowym rozwojem układu kostnego. Dotychczasowe badania w tym zakresie nie dają jednoznacznej odpowiedzi dotyczącej przeciwnowotworowej aktywności tego czynnika, uzależniając efekt terapeutyczny aktywnej postaci tej witaminy nie tylko od typu nowotworu, stadium klinicznego zaawansowania czy stopnia jego złośliwości, lecz również od innych parametrów takich jak wzajemne międzykomórkowe oddziaływania w obrębie niszy nowotworowej oraz wpływu rozpuszczalnych mediatorów mikrośrodowiska guza. W ocenianej pracy, Autor starał się wykonać kompleksowe badania wskazujące istotne czynniki związane zarówno z układem odpornościowym jak i obecne w komórkach nowotworowych, na które oddziaływać może kalcytriol i jego wybrane pochodne, hamując przerzut i migrację komórek mysiego raka sutka. Ponadto, przeprowadzona została eksperymentalna ocena i porównanie zasadności stosowania tych czynników we wczesnym i zaawansowanym stadium rozwoju raka gruczołu sutkowego. Badania te są oryginalnym i ciekawym podejściem naukowym, które wnoszą istotny wkład poznawczy w dziedzinie immunoonkologii podstawowej z istotnym aspektem klinicznym. Uważam również, że prowadzenie dalszych badań w tym kierunku może ostatecznie uzyskać wartość wdrożeniową. Na tej podstawie uważam wybór tematu rozprawy doktorskiej za uzasadniony.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska opracowana została w układzie klasycznym, który jest charakterystyczny dla prac doświadczalnych. Jest to 172 stronicowy maszynopis podzielony na 7 podstawowych rozdziałów. Tekst uzupełniony został o 32 ryciny obejmujące wykresy i zdjęcia oraz 17 tabel.

Praca napisana została bardzo starannie, z dbałością o poprawność merytoryczną jak i stronę stylistyczną tekstu. Nie mam uwag dotyczących strony edycyjnej manuskryptu. Praca prezentuje istotny poziom naukowy, który oceniam bardzo wysoko.

Przedłożona do recenzji rozprawa zawiera **streszczenie** w języku polskim i angielskim. Autor przedstawił w nim niezbędne informacje dotyczące hipotezy badawczej, podstaw teoretycznych badań, uzyskanych wyników oraz na ich podstawie określił znaczenie kalcytriolu i jego wybranych analogów w oddziaływaniach zachodzących w mikrośrodowisku

guza oraz nabywaniu przez komórki mysiego raka sutka zdolności migracyjnych. Rozdział ten umożliwia szybkie zorientowanie się w zakresie pracy oraz zasadności podjęcia zaproponowanych badań.

Wstęp rozprawy jest bardzo obszernym rozdziałem pracy. Szczegółowo zaprezentowana została w nim aktualna wiedza dotycząca nowotworów gruczołu sutkowego wraz z danymi statystycznymi i podstawowymi klasyfikacjami tej choroby. Opisana została również witamina D₃ i jej rola w funkcjonowaniu organizmu jak również aktywność przeciwnowotworowa w kontekście raka gruczołu sutkowego. Ponadto, Autor przedstawił proces przerzutu komórek pochodzących ze zmian złośliwych oraz rolę wybranych komórek układu immunologicznego zaangażowanych w indukcję środowiska immunosupresyjnego, rozwój oraz nabywanie zdolności przerzutowych przez komórki transformowane nowotworowo. Uważam jednak, że w opisie tym zbyt skrótowo potraktowany został dość istotny etap przerzutu, a mianowicie oddziaływania jakim poddawane są komórki nowotworowe w naczyniach limfatycznych i krwionośnych. Ma to istotne znaczenie dla uzupełnienia dokonanego opisu, zwłaszcza że zainteresowanie Autora skupione było na procesie przerzutu nowotworowego, którego migracja naczyniowa jest jedną z istotnych składowych. Niemniej jednak, wprowadzenie do zagadnień podjętych w dysertacji jest napisane bardzo klarownie i w zrozumiały sposób prezentuje podstawę teoretyczną, na której oparto zaplanowane badania. Ułatwieniem w lekturze tego fragmentu tekstu są również ryciny i tabele, podsumowujące i streszczające niektóre zagadnienia. Mimo wspomnianej drobnej uwagi, uważam że przedstawiony wstęp teoretyczny w sposób wyczerpujący wprowadza w problematykę podjętą w rozprawie doktorskiej.

Cel pracy obejmuje prawidłowo sprecyzowaną hipotezę badawczą. Ponadto, Doktorant wyróżnił 6 celów pośrednich określających zakres zaplanowanych analiz. Są one ze sobą związane, wskazując na ścisłe relacje między ocenianymi zjawiskami zachodzącymi w guzie nowotworowym pod wpływem aktywności kalcytriolu i jego analogów. Zaplanowanie badań w układzie *in vivo* jak i *in vitro* wskazuje również na zrozumienie przez Autora konieczności wykonywania i porównywania badań wykonywanych w obu modelach. Jedynie wtedy można uzyskać całościowy obraz oddziaływań i zależności zachodzących w testowanym schemacie badawczym. Założenia eksperymentalne zaproponowane w ocenianej pracy uważam za trafne i adekwatne do idei zawartej w tytule pracy.

Materiały i metody zostały przedstawione bardzo skrupulatnie. Zaproponowana metodyka bazuje na nowoczesnych technikach doświadczalnych adekwatnie dobranych do postawionych celów pracy. Opis procedur eksperymentalnych jest przejrzysty i dokładny,

pozwalający na odtworzenie przeprowadzonych badań w innych laboratoriach. Autor, podczas wykonywania opisów metodycznych, nie uniknął jednak pojedynczych określeń będących żargonem laboratoryjnym. Nie ma to jednak wpływu na poprawność i jednoznaczność przedstawionego wykazu wykorzystanych materiałów, zastosowanych procedur oraz przeprowadzonych analiz.

Wyniki badań zostały przedstawione oraz opisane w sposób przejrzysty. Autor wykorzystał odpowiedni sposób prezentacji wyników, czyli umieścił wykresy i tabele równoległe z opisującym je tekstem. Pozwala to na szybkie przeanalizowanie uzyskanych wyników i możliwość łatwego porównywania efektów zastosowanych czynników w różnych układach eksperymentalnych. Dobór testów statystycznych oraz wykonane obliczenia nie budzą zastrzeżeń.

W leczeniu raka piersi stosuje się różne schematy chemioterapii, np. AC, FAC, FEC czy CMF. Opierają się one głównie na lekach z grupy antracyklin (doksorubicyna czy epirubicyna), cyklofosfamidzie, gemcytabinie, 5-fluorouracylu, metotreksacie. Ponadto, modyfikuje się schemat AC dodając trastuzumab; rekombinowane, humanizowane przeciwciała monoklonalne IgG1. W swoich badaniach, Doktorant wykorzystał 7 leków przeciwnowotworowych (cisplatynę, doksorubicynę, docetaksel, kamptotecynę, metotreksat, 5-fluorouracyl, tamoksyfen) jako odnośniki o znanej aktywności klinicznej.

Proszę o wyjaśnienie na jakiej podstawie wybrano właśnie ten zestaw cytostatyków do przeprowadzenia porównań aktywności kalcytriolu i jego analogów ze związkami stosowanymi komercyjnie w stosunku do komórek raka gruczołu sutkowego.

Uważam, że zakres uzyskanych wyników wskazuje na imponujący wkład pracy i systematyczność Doktoranta w realizacji wszystkich zaplanowanych badań. Przedstawione wyniki są spójne, a kolejność ich prezentacji jest logiczna pozwalająca na dostrzeżenie następowych relacji między badanymi czynnikami.

Bardzo ciekawym i praktycznym fragmentem tego rozdziału jest podsumowanie w punktach najważniejszych wyników części *in vivo* oraz badań *in vitro* na liniach komórkowych. Ten fragment rozprawy daje sposobność szybkiej weryfikacji przeprowadzonych badań, uzyskanych wyników oraz dokonania obiektywnych podsumowań.

Dyskusja jest bardzo istotnym fragmentem każdej pracy naukowej. Pozwala na weryfikację uzyskanych wyników oraz umożliwia Autorom wykazanie się znajomością zagadnień podnoszonych w prezentowanych pracach badawczych. W ocenianej dysertacji, Autor bardzo umiejętnie interpretuje otrzymane wyniki zarówno bazując na własnej wiedzy jak i dostępnej literaturze światowej. Przeprowadzona dyskusja jednoznacznie wskazuje na

zależność między działaniem przeciwnowotworowym kalcytriolu, a stadium zaawansowania raka gruczołu sutkowego. Autor, w oparciu o literaturę wskazuje na konieczność zachowania ostrożności suplementacją witaminą D₃ diety potencjalnych pacjentów, gdy stwierdzone zostanie u nich zaawansowanie stadium inwazyjnego raka piersi. Jest to bardzo istotne osiągnięcie ocenianej dysertacji, mogące mieć znaczenie praktyczne. Dyskusja przeprowadzona jest w sposób zrównoważony, zważywszy na konieczność zachowania naukowego i obiektywnego charakteru polemiki w trudnej i złożonej problematyce jaką jest wieloetapowość rozwoju nowotworu i zróżnicowanie reaktywności komórek rakowych oraz stromalnych w zależności od stadium zaawansowania choroby. Uważam, że Doktorant prawidłowo interpretuje uzyskane wyniki, prowadzi rzeczową dyskusję oraz dokonuje ciekawych i trafnych podsumowań.

Wnioski przedstawione zostały w 8 punktach. Są one ściśle związane z otrzymanymi wynikami i wskazują na najważniejsze osiągnięcia uzyskane w rozprawie doktorskiej.

Piśmiennictwo obejmuje 355 pozycji, dobranych prawidłowo. Literatura jest aktualna, i związana z zakresem badań podjętych w pracy doktorskiej.

Podsumowując, stwierdzam że Doktorant w całości zrealizował zadania badawcze jakie zostały postawione w celu pracy. Zaproponowana hipoteza badawcza jest ciekawa zarówno z czysto naukowego jak i praktycznego punktu widzenia. Doktorant podjął się wykonania badań wielowątkowych i trudnych do interpretacji. Wykonane eksperymenty jak i przeprowadzona dyskusja udowadniają jednak, że sprostał temu zadaniu, prezentując bardzo dobre zorientowanie w zakresie dotychczasowej wiedzy odnoszącej się do podjętych badań. Doktorant również wykazał się umiejętnością wyboru odpowiednich informacji z danych literaturowych przeprowadzając zwięzłą, przekrojową, a tym samym wartościową dyskusję. Uzyskane wyniki wpisują się w debatę nad skutecznością suplementacji witaminą D₃ diety pacjentów onkologicznych. Są to istotne badania zważywszy na brak jednoznaczności opinii o pozytywnym działaniu tej aktywnej formy witaminy w różnych stadiach zaawansowania choroby nowotworowej.

Pracę oceniam wysoko, mimo drobnych uwag, które mają głównie charakter pytań i prośby o uściślenie przedstawionych informacji.

Rozprawa doktorska mgr Artura Anisiewicza jest więc opracowaniem spełniającym wszystkie warunki wymagane odpowiednią ustawą dla dysertacji doktorskich.

W zawiązku z powyższym, przedkładam Wysokiej Radzie Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie mgr Artura Anisiewicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na potencjalny praktyczny wymiar dysertacji, bardzo szeroki zakres podjętych badań, ciekawą, konsekwentną i rzeczową ich interpretację wnioskuję również o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Artura Anisiewicza stosowną nagrodą.

Zakład Wirusologii i Immunologii UMCS


dr hab. Roman Paduch, prof. nadzw.