

dr hab. n.med. Jarosław Baran
Zakład Immunologii Klinicznej,
Katedra Immunologii Klinicznej i Transplantologii,
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum,
ul. Wielicka 265, 30-663 Kraków

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Agaty Pawlik pt. „Wpływ kalcytriolu oraz jego analogów na proces zapalny towarzyszący rozwojowi mysiego raka gruczołu sutkowego”.

Praca doktorska została wykonana pod kierunkiem Prof. dr hab. Joanny Wietrzyk w Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.

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 – 70 rokiem życia.

Mimo znacznego postępu jaki dokonał się w ciągu ostatnich lat w zakresie diagnostyki raka piersi, zwłaszcza roli programów przesiewowych w wykrywaniu wczesnych stadiów nowotworu oraz nowych, często celowanych strategii terapeutycznych, 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. Poza leczeniem samego nowotworu, terapia uwzględnia również dolegliwości jakie dają przerzuty, a także działania niepożądane związane z zastosowanym protokołem leczniczym np. niedokrwistość, neutropenia, osteoporoza, nudności i wymioty.

W przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej, mgr Agata Pawlik podjęła się zbadania wpływu witaminy D oraz jej analogów na wzrost i przerzutowanie komórek mysiego raka gruczołu sutkowego 4T1, który stanowi zwierzęcy model IV stadium zaawansowania ludzkiego raka piersi. Cel ten autorka realizowała pośrednio, oceniając wpływ witaminy D i jej analogów na układ odpornościowy myszy młodych oraz 60-tygodniowych w modelu postmenopauzalnym. Podjęcie takiej tematyki badawczej było ze wszech miar uzasadnione, albowiem niski poziom witaminy D w surowicy jest uważany za czynnik ryzyka zachorowania na raka piersi i ma również znaczenie prognostyczne. Z kolei

podawanie kalcytriolu u kobiet w okresie po menopauzie stanowi obiecującą strategię w zapobieganiu lub leczeniu raka piersi z ekspresją receptorów estrogenowych. Dodatkowo, w trakcie leczenia innych typów tego nowotworu często stosuje się suplementację witaminą D oraz wapniem, w celu zapobieżenia rozwojowi osteoporozy w tej grupie kobiet.

Rozprawa liczy 181 stron druku i posiada układ typowy dla prac doświadczalnych. Poprzedza ją streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz skrótów użytych w tekście, a zamyka spis rycin i tabel oraz załączniki.

Obszerny wstęp wprowadza czytelnika w problematykę podjętych badań, poczynając od charakterystyki zapalenia i jego roli w inicjowaniu procesu nowotworowego. W kolejnych podrozdziałach autorka przedstawia rolę różnych populacji komórek układu odpornościowego w reakcji na rozwijający się nowotwór, przytaczając przykłady ich aktywności zarówno pro- jak i przeciwnowotworowej, szczegółowo omawia rolę wybranych cytokin w przebiegu choroby nowotworowej, by płynnie przejść do opisu raka piersi, jego klasyfikacji i aktualnych form terapii. Wstęp kończy podrozdział poświęcony charakterystyce, funkcji biologicznej i roli witaminy D w rozwoju i leczeniu nowotworów. 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 dobrze, ale niekiedy nie zdołała uniknąć błędów lub mankamentów, na które z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę. Autorka rozpoczyna wstęp od podrozdziału zatytułowanego „Rola stanu zapalnego w procesach patologicznych”. Jest to dość niefortunne sformułowanie, bo sam proces zapalny jest reakcją patologiczną i w zależności od przebiegu może być krótkotrwały (zapalenie ostre) lub długotrwały, inicjując dalsze zaburzenia homeostazy ustroju. W podrozdziale tym, autorka stwierdza, iż: „Zapalenie... uważane jest za element mechanizmu odporności wrodzonej...” (str. 19). Nie do końca mogę się z tym stwierdzeniem zgodzić, jako że proces zapalny towarzyszy zarówno reakcjom odporności wrodzonej, jak i nabytej (adaptacyjnej). Dalej, charakteryzując proces zapalny, doktorantka pisze o „wzmocnionym ruchu plazmy z krwioobiegu do ogniska zapalnego”. Autorka zapewne ma tu na myśli tworzenie wysięku towarzyszącego zapaleniu, nie mniej jednak mechanizm jego powstawania jest inny i wymaga bardziej precyzyjnych sformułowań. Podobnie, użycie skrótu myślowego, iż witamina D jest hormonem syntetyzowanym z promieni słonecznych (str. 42) nie powinno mieć miejsca w rozprawie doktorskiej. Natomiast podrozdział zatytułowany „Klasyfikacja nowotworów piersi” nie w pełni odpowiada przedstawionej w nim treści, jako że sugeruje opis różnych rodzajów nowotworów piersi, również tych łagodnych, tymczasem odnosi się jedynie do charakterystyki raka piersi. Wszystkie te błędy w nomenklaturze nie wpływają jednak znacząco na ogólnie edukacyjny charakter tej części rozprawy, dodatkowo poparty czytelnymi i kolorowymi rycinami.

Cel nadrzędny oraz cele pośrednie pracy zostały jasno sformułowane, a podjęte w nich zadania były niezwykle ambitne. Doktorantka podjęła się w nich bowiem przeanalizowania całej gamy parametrów immunologicznych związanych z reakcją zapalną towarzyszącą rozwojowi nowotworu, poczynawszy od składu jakościowego populacji limfocytów krwi, śledzion oraz węzłów chłonnych myszy z rakiem gruczołu sutkowego w grupach zwierząt kontrolnych (tylko z nowotworem) oraz traktowanych witaminą D lub jednym z jej dwóch analogów, i to w kilku punktach czasowych. Dodatkowo, doktorantka zdecydowała się na ocenę poziomu prozapalnych cytokin w osoczu krwi, w obrębie tkanki nowotworowej oraz cytokin produkowanych przez splenocyty po ich poliklonalnej stymulacji *in vitro*, a także podjęła się oceny ekspresji genów związanych z różnicowaniem się limfocytów T CD4⁺ do subpopulacji komórek efektorowych, głównie Th17 w śledzionach, węzłach chłonnych i

guzach nowotworowych. Za cel przyjęła również zbadanie profilu genów związanych z produkcją białek ostrej fazy w wątrobie i funkcją prozapalnej populacji limfocytów Th17 w śledzionie. Analizy te doktorantka zaplanowała wykonać zarówno w grupach myszy młodych, jak i starych w modelu postmenopauzalnym. W tym miejscu należy podkreślić ogrom zaangażowania doktorantki w realizację tych badań, gdyż tak obszernie postawione cele badawcze mogłyby z powodzeniem stać się podstawą do realizacji kilku rozpraw doktorskich.

Kolejna część pracy, „Materiały i metody”, to dwudziestotrzystronicowy opis metod badawczych wykorzystanych w pracy, uzupełniony dziewięcioma tabelami i jednym rysunkiem, przedstawiającym schematycznie przebieg eksperymentu *in vivo*. Procedury laboratoryjne są właściwie dobrane a ich opis szczegółowy. Uwagę zwraca bardzo szeroki zakres zastosowanych metod badawczych, uwzględniający również metody molekularne oparte o zaawansowaną analizę ekspresji genów na poziomie mRNA i białka z wykorzystaniem odpowiednich macierzy. Drobną uwagę do tego rozdziału dotyczy analizy fenotypowej wybranych populacji komórkowych metodą cytometrii przepływowej, zwłaszcza tych uzyskiwanych ze śledziony i węzłów chłonnych. Komórki takie, szczególnie po ich rozmrożeniu, powinny być oceniane w cytometrze przepływowym również pod kątem ich żywotności, w celu wyeliminowania z analizy komórek martwych. Komórki martwe bowiem, a takie na pewno były obecne w rozmrażanym materiale, mają zdolność do nieswoistego wiązania przeciwciał i zafałszowywania uzyskanych wyników. W tej części pracy spory niedosyt pozostawia natomiast opis procedur prowadzonych na zwierzętach, począwszy od braku danych o liczbie zwierząt wykorzystanych do badań, liczebności poszczególnych grup, po informacje związane z kontrolą efektywności zabiegu owariektomii czy sposobem pobierania krwi do badań. Wszystkie te informacje są istotne dla oceny jakości uzyskanych wyników.

Kolejny rozdział – „Wyniki”, to najobszerniejsza część pracy. Doktorantka na 46 stronach, z użyciem 24 wykresów obszernie przedstawiła rezultaty swoich badań. Uzupełnieniem wyników jest 6 załączników zamieszczonych na końcu rozprawy. Tę część pracy rozpoczyna ocena aktywności przeciwnowotworowej i przeciwprzerzutowej użytych preparatów kalcytriolu i jego analogów. Autorka zestawiała uzyskane wyniki, porównując wpływ badanych związków na masę ciała, wielkość guzów i liczbę przerzutów w płucach myszy młodych i starych w modelu postmenopauzalnym, po owariektomii. W przypadku myszy starych po owariektomii, dodatkową kontrolę stanowiły zwierzęta bez usuniętych jajników, poddane tylko chirurgicznemu nacięciu powłok ciała. W zestawieniu tym, zastanawia fakt dokonywania pomiarów masy ciała i objętości guzów w obu grupach zwierząt w innych punktach czasowych (innych dniach eksperymentu), co komplikuje porównanie uzyskanych wyników pomiędzy grupami zwierząt młodych i starych. Natomiast oceny liczby przerzutów w płucach dokonywano już w tych samych dla obu grup, wybranych punktach czasowych, tj. 21, 28 i 33 dniu obserwacji. Wyjaśnienia wymaga tu z kolei duża rozbieżność w liczebności zwierząt w obu grupach (znacznie mniejsza liczba w grupach zwierząt starych) oraz brak wyników w grupie zwierząt starych bez usuniętych jajników (kontrola N/OV) w 28 dniu badania (Ryc.11b).

W dalszej kolejności, doktorantka przedstawiła wyniki badań przesiewowych ekspresji genów związanych z różnicowaniem limfocytów T CD4⁺ do populacji efektorowych, tj. Th1, Th2, Th17 i Treg w śledzionach i węzłach chłonnych myszy młodych z rakiem gruczołu sutkowego oraz samej tkanki nowotworowej pobranej od myszy starych, w obu wypadkach, traktowanych kalcytriolem lub jednym z jego analogów. Badania takie

wykonano w dwóch punktach czasowych, tj. w dniu 21 i 28 dla śledzion, 14 i 28 dla węzłów chłonnych myszy młodych oraz w jednym punkcie czasowym, tj. w dniu 21 dla tkanki nowotworowej uzyskanej od myszy starych, każdorazowo porównując wyniki względem grupy kontrolnej zwierząt, którym podskórnie podawano 80% glikol propylenowy. Uzyskane wyniki normalizowano względem genów kontrolnych. W tym zestawieniu nie jest jasne, dlaczego u myszy starych nie przeprowadzono takich badań również z wykorzystaniem śledzion, bo o braku możliwości ich wykonania z wykorzystaniem węzłów chłonnych, doktorantka wspomina w rozdziale „Materiały i metody”. Wyjaśnienia wymaga również, dlaczego analogicznego badania, w celach porównawczych, nie wykonano dla tkanki nowotworowej pobranej od myszy młodych, a jedynie od osobników starych. W tym kontekście, należy żałować, iż nie udało się przeprowadzić tych samych analiz u myszy starych i młodych w identycznych punktach czasowych, co znacznie ułatwiłoby porównanie badanych parametrów w obrębie obu grup zwierząt i dodatkowo podniosło wartość takich rezultatów. W tej grupie wyników na osobny komentarz zasługuje fakt użycia kilku różnych genów kontrolnych do normalizacji ekspresji badanych genów, np. dla węzłów chłonnych myszy młodych aż 3 takie geny zostały wykorzystane.

W dalszej części tego rozdziału doktorantka przedstawia wyniki z przesiewowych oznaczeń poziomów wybranych cytokin oraz chemokin ostrej fazy stanu zapalnego, wykonanych zarówno dla supernatantów z hodowli aktywowanych splenocytów myszy młodych, jak i osoczy myszy młodych i starych, traktowanych kalcytriolem lub jego analogami. Do tego celu doktorantka wykorzystwała zestawy macierzy cytokinowych, umożliwiające ocenę w badanym materiale równoczasowo poziomu od kilkunastu do kilkudziesięciu białek. W tym kontekście zastanawia, dlaczego do oceny poziomów cytokin w osoczach myszy młodych doktorantka użyła zestawów umożliwiających detekcję 40 cytokin, a do tego samego celu u myszy starych użyła zestawów innego producenta, umożliwiających pomiar tylko 12 białek. Biorąc pod uwagę fakt, że oba systemy różniły się zapewne w stopniu czułości detekcji, a dodatkowo, pomiarów tych dokonywano w różnych punktach czasowych - dzień 21 i 33 dla myszy młodych i dzień 14 i 28 dla myszy starych, porównanie uzyskanych wyników w obrębie zwierząt młodych i starych wydaje się mało miarodajne.

Kolejny podrozdział zatytułowany „Analiza wyselekcjonowanych w badaniach przesiewowych czynników zaangażowanych w szlak odpowiedzi zapalnej w modelu mysiego raka gruczołu sutkowego” omawia wyniki oznaczeń istotnych parametrów reakcji zapalnej, w tym ekspresji genów dla 4 wybranych białek ostrej fazy w wątrobie czy analizę fenotypową limfocytów krwi obwodowej, ale tylko poziomy niektórych wybranych cytokin, podlegały wcześniejszym badaniom przesiewowym i to w nieco odmiennych punktach czasowych. Wybór tych nowych punktów czasowych dla oznaczeń metodą ELISA poziomu cytokin, tych oznaczanych i nieoznaczanych we wcześniejszych badaniach przesiewowych w grupach myszy młodych i starych wymaga jednak dodatkowych wyjaśnień. Przedstawiona z kolei analiza ilościowa i jakościowa subpopulacji limfocytów krwi obwodowej została przeprowadzona z należytą fachowością i dotyczyła wszystkich wybranych punktów czasowych. Szkoda, iż w tej części badań doktorantka nie pokusiła się o oznaczanie leukocytozy, jako jednego z podstawowych parametrów klinicznych świadczących o toczącym się procesie zapalnym. W tej części autorka skoncentrowała się na badaniu subpopulacji limfocytów, podczas gdy oznaczenie składu odsetkowego leukocytów krwi nawet metodą cytometrii przepływowej w oparciu o parametry FSC/SSC, pozwoliłoby dodatkowo zidentyfikować zmiany w poziomie innych populacji, zwłaszcza wzrost poziomu granulocytów, odpowiedzialnych zapewne za postępujący spadek odsetka limfocytów,

obserwowany przez doktorantkę w trakcie trwania eksperymentu. Dalsze przedstawione w tym podrozdziale wyniki badań obejmują bardzo dokładną analizę fenotypową subpopulacji limfocytów w śledzionach myszy młodych i starych we wszystkich wybranych punktach czasowych, co pozwala na kinetyczne śledzenie zachodzących zmian i ich porównywanie w obrębie tych grup zwierząt. W kolejnych podrozdziałach doktorantka przedstawiła jeszcze wyniki badań wpływu kalcytriolu i jego analogów na ekspresję genów związanych z aktywnością limfocytów Th17 w śledzionach oraz izolowanych splenocytach CD4+ od myszy młodych i starych z rakiem sutka, po ich stymulacji w kierunku limfocytów Th17. W tak wyindukowanej populacji iTh17 oceniała również poziom IL-17A. Dodatkowo, w mysich śledzionach w 28 dniu eksperymentu badała również ekspresję genu dla receptora witaminy D oraz osteopontyny. Wyniki analogicznych badań związanych z limfocytami Th17 doktorantka przedstawiła w odniesieniu do węzłów chłonnych pobranych od myszy młodych. Brak wystarczającej ilości materiału z węzłów chłonnych od myszy starych uniemożliwił jej wykonanie takich oznaczeń w tej grupie zwierząt.

Ostatnia część tego rozdziału podejmuje analizę poziomu wybranych cytokin w lizatach tkanki nowotworowej pochodzącej od myszy młodych i starych w dwóch wybranych punktach czasowych (dzień 21 i dzień 33).

W „Podsumowaniu wyników” doktorantka na 6 stronach zwięźle rekapitułuje uzyskane w poszczególnych etapach badań wyniki. Autorka stwierdza, iż witamina D i jej analogi modulują układ odpornościowy gospodarza, prowadząc do nasilonego przerzutowania komórek nowotworowych u myszy młodych. Obserwacja ta została dodatkowo potwierdzona w publikacji z tego tematu badań, której doktorantka jest współautorem.

Ze swej strony pragnę podkreślić ogromny wysiłek doktorantki włożony w wykonanie i przeanalizowanie wyników tak szeroko zakrojonych badań. Niestety, ze względu na ich mnogość i stopień skomplikowania nie zawsze udało się je odpowiednio zrealizować w kontekście doboru odpowiednich punktów czasowych, materiału biologicznego czy nawet metod badawczych, umożliwiających późniejsze porównanie uzyskanych wyników w obrębie badanych grup zwierząt. Jest to niekiedy przyczyną braku spójności w niektórych fragmentach prezentowanych wyników. Nie zawsze w pełni adekwatne do treści, tytuły poszczególnych podrozdziałów tej części pracy, dodatkowo komplikują śledzenie opisu rezultatów. Mimo tych mankamentów, wyniki dostarczają wartościowych obserwacji dotyczących wpływu witaminy D i jej analogów na szereg parametrów układu odpornościowego myszy z rakiem gruczołu sutkowego. Właściwe ich zestawienie, zwłaszcza w obrębie grup myszy młodych, może zaowocować kolejnymi 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. Autorka uzasadnia wybór modelu badawczego z użyciem linii raka gruczołu sutkowego 4T1 i na tle piśmiennictwa światowego argumentuje celowość zastosowanie kalcytriolu i jego dwóch analogów, różniących się istotnie mechanizmem działania. Podkreśla odmienny status immunologiczny, a tym samym różną odpowiedź na stosowane leczenie w trakcie choroby nowotworowej organizmów młodych i starych. Odmienne funkcjonowanie układu odpornościowego organizmów młodych i starych w różny sposób wpływa również na kształtowanie środowiska guza. Na tym tle doktorantka odnosi się do przebiegu choroby w wybranym przez siebie modelu raka piersi. Dalej przytacza rolę czynników humoralnych, osteopontyny, TGFβ i innych cytokin oraz populacji limfocytów Treg i Th17 w rozwoju choroby nowotworowej, zwłaszcza raka piersi i dyskutuje ją w kontekście własnych wyników.

Rozprawę podsumowują „Wnioski”, w których doktorantka z jednej strony zwraca uwagę na immunosupresyjny wpływ witaminy D i jej analogów na układ odpornościowy zwłaszcza myszy młodych, stymulujący powstawanie przerzutów w płucach, a z drugiej, wskazuje na prozapalne działanie zastosowanych związków, poprzez ich wpływ na indukcję subpopulacji limfocytów Th17. Oba te stwierdzenia wzajemnie się wykluczają, ale ten na pozór sprzeczny związek może być wytłumaczony faktem, iż limfocyty Th17 są bardzo plastyczną populacją komórkową i w zależności od czynników środowiskowych nie muszą wykazywać aktywności prozapalnej, mogą natomiast łatwo różnicować do limfocytów Treg o aktywności immunosupresyjnej. Rozwianie tych wątpliwości wykracza jednak poza ramy niniejszej pracy.

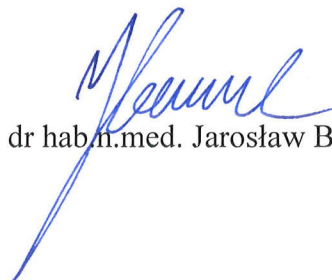
Piśmiennictwo obejmujące 283 pozycje starannie dobranych publikacji. Spośród licznych cytacji, kilka odnosi się do artykułów opublikowanych przez Promotora doktorantki, której dorobek na tym polu badań jest znaczący.

Przedostatnim rozdziałem rozprawy jest spis rycin i tabel, a całość zamykają załączniki dokumentujące wartości liczbowe zmiany ekspresji badanych genów oraz gęstości optycznych dla pomiarów spektrofotometrycznych poziomu cytokin.

Na zakończenie swojej recenzji pragnę podkreślić, iż dysertacja doktorska mgr Agaty Pawlik prezentuje wyniki oryginalnych badań i jest interesująca, tak z naukowego, jak i potencjalnie klinicznego punktu widzenia. Jest wartościowym wkładem w rozwój badań nad racjonalnością stosowania witaminy D i jej analogów w terapii raka piersi. Jestem przekonany, iż przedstawione w dysertacji wyniki, po odpowiednim wyselekcjonowaniu będą podstawą do wartościowych publikacji doktorantki.

Podsumowując, stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim. W związku z powyższym, zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu z wnioskiem o dopuszczenie mgr Agaty Pawlik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 07.07.2018


dr hab. n.med. Jarosław Baran