



PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia 16-02-2023
L.dz. 53

Łódź, 9 lutego 2023 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej **mgr Martyny Stachowicz-Suhs** pt.

„Charakterystyka makrofagów towarzyszących rakom gruczołu sutkowego w kontekście wpływu witaminy D na mikrośrodowisko guza”

Promotorzy: prof. dr hab. n. biol. Joanna Wietrzyk,
prof. dr hab. n. med. Rafał Matkowski

Nowotworem, który najczęściej dotyka kobiety i stanowi blisko 25% wszystkich przypadków nowotworów na świecie jest rak gruczołu sutkowego. Według WHO, nowotwór ten plasuje się na piątym miejscu jako przyczyna śmierci z powodu choroby nowotworowej. Wśród licznych czynników ryzyka zachorowania na raka gruczołu sutkowego wymienić należy: płeć żeńską, wiek powyżej 50 roku życia, dodatni wywiad rodzinny i/lub nosicielstwo zmian genetycznych (głównie mutacji w genach supresorowych), podwyższone stężenie estrogenów, spożywanie odzwierzęcych tłuszczów nasyconych i alkoholu oraz otyłość. Sugeruje się natomiast, że karmienie piersią i spożywanie ubogo-tłuszczowych produktów mlecznych oraz pokarmów zawierających wapń i witaminę D może chronić przed zachorowaniem na ten typ nowotworu. W kontekście tematu rozprawy doktorskiej uwagę zwraca otyłość i witamina D. Otyłość, która jest źródłem przewlekłego stanu zapalnego sprzyja powstawaniu zmian nowotworowych, gdyż przerośnięte komórki tłuszczowe wraz z naciekającymi je komórkami, w tym układu odpornościowego, wydzielają cytokiny prozapalne, adipokiny i czynniki proangiogenne. Tak powstałe warunki sprzyjają namnażaniu komórek nowotworowych i ich przerzutowaniu. Dodatkowo, czynniki wydzielane przez komórki nowotworowe zaburzają równowagę pomiędzy przeciw-nowotworowymi i pro-nowotworowymi właściwościami komórek układu odpornościowego. Z kolei, witamina D₃ znana jest ze swoich immunomodulujących właściwości, a jej przeciwnowotworowe działanie jest przedmiotem intensywnych badań. Również w tym obszarze prowadzone są badania w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu. Badania przedstawione w rozprawie doktorskiej Pani Martyny Stachowicz-Suhs były realizowane w ramach projektu pt. ” Wpływ witaminy D na makrofagi i fibroblasty towarzyszące

nowotworom gruczołu piersiowego” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki i zostały częściowo opublikowane w dwóch pracach oryginalnych w czasopiśmie o wysokim Impact Factor. Ścisłe ujmując przedmiotem badań recenzowanej pracy była charakterystyka makrofagów towarzyszących przerzutującym i nieprzerzutującym rakom gruczołu sutkowego w kontekście wpływu witaminy D₃/kalcytriolu na ich polaryzację pro- i przeciwnowotworową. Badanie przeprowadzono na myszach obciążonych mysim rakiem gruczołu sutkowego analizując makrofagi towarzyszące nowotworom (TAMs) oraz makrofagi wywodzące się ze szpiku kostnego (BMDMs) oraz na próbkach od pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem gruczołu sutkowego, gdzie analizowano makrofagi pochodzące z monocytów krwi obwodowej (MDMs) oraz TAMs.

Praca doktorska jest wydana w formie bardzo starannego opracowania wydawniczego, liczącego 174 strony. Ma typowy układ rozpraw doktorskich, zawiera: wykaz skrótów, streszczenia, wstęp, założenia i cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, piśmiennictwo, wykaz tabel i rycin oraz suplement.

Wstęp Doktorantka podzieliła na trzy sekcje, w których wyczerpująco opisała makrofagi towarzyszące nowotworom, nowotwór gruczołu sutkowego i towarzyszące mu makrofagi oraz witaminę D₃. Na wyróżnienie zasługują podrozdziały, w których Doktorantka scharakteryzowała znaczenie makrofagów w rozwoju raka gruczołu sutkowego oraz wyniki badań klinicznych oceniających związek witaminy D₃ z ryzykiem rozwoju tego nowotworu. Wyczerpująco przedstawiono również wpływ witaminy D₃ na komórki występujące w mikrośrodowisku guza, w tym komórki nowotworowe, komórki śródbłonna i fibroblasty, zaznaczając jej rolę w proliferacji, apoptozie, przejściu epitelialno-mezenchymalnym i powstawaniu macierzystych komórek nowotworowych. Wpływ witaminy D₃ na proces różnicowania monocytów do makrofagów, na właściwości cytotoksyczne makrofagów wobec patogenów oraz na proces polaryzacji makrofagów został także szeroko opisany. Po lekturze Wstępu czytelnik nie ma wątpliwości, że Doktorantka posiadała dogłębną wiedzę na temat przedstawianego zagadnienia. Założenia i cele badawcze zostały postawione jasno i precyzyjnie. Rozdział Materiał i Metody przygotowano starannie, dokładnie opisując bardzo złożony model badawczy obejmujący badania na mysim modelu raka gruczołu sutkowego oraz badania na pacjentkach z nowotworem gruczołu sutkowego. Bardzo pomocne w zrozumieniu zastosowanych modeli badawczych są schematy zaprezentowane na Ryc. 3-6. Badania posiadają odpowiednie zgody komisji bioetycznych. Rozdział Wyniki jest bardzo rozbudowany, choć dość zwięźle opisuje uzyskane rezultaty. Ogólnie Doktorantka zaprezentowała wyniki na 24 rycinach i w 4 tabelach w rozdziale Wyniki oraz na 6 rycinach i w 3 tabelach w Suplemencie. Rozdział Dyskusja został napisany w sposób przemyślany, często nawiązuje do wyników uzyskanych w ramach realizacji wskazanego wyżej projektu NCN będących przedmiotem innych rozpraw doktorskich. Autorka konfrontuje własne obserwacje z opublikowanymi do tej pory

doniesieniami innych badaczy. Prowadzona dyskusja dowodzi biegłości w posługiwaniu się źródłami naukowymi, umiejętności syntezy i przedstawienia ich w kontekście aktualnej wiedzy. Przedstawiono 11 końcowych wniosków, które korespondują do celów pracy. Bibliografia zawiera 339 pozycji cytowanego piśmiennictwa. Całość pracy jest pisana bardzo syntetycznym językiem, tekst pracy jest głęboko przemyślany, brak jest tutaj zbędnych określeń czy zwrotów.

Komentarze i pytania

Z obowiązku recenzenta chciałabym, aby Doktorantka skomentowała pewne niedociągnięcia. Zwraca uwagę pewna niespójność w prezentacji wyników obejmujących model myszy raka gruczołu sutkowego.

1. W pierwszym szczegółowym celu pracy wskazano, że badania na mysim modelu raka gruczołu sutkowego obejmują linie 4T1, 67NR oraz EO771 i polegają na ocenie ukierunkowania pro- i przeciwnowotworowego TAMs. O ile wyniki dotyczące klasyfikacji fenotypu TAMs w oparciu o markery powierzchniowe wykonano dla wszystkich wskazanych linii, to analiza ekspresji genów nie obejmowała linii EO771, komórek niewrażliwych na przeciwproliferacyjne działanie kalcytriolu. Dlaczego nie wykonano tej analizy?
2. Również w przypadku celu szczegółowego drugiego i trzeciego dotyczącego charakterystyki BMDMs znajduje dwa zapytania: Dlaczego nie wykonano charakterystyki BMDMs pochodzących ze szpiku myszy zdrowych, nieobarczonych nowotworem karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D₃ i traktowanych kalcytriolem różnicowanych w obecności mediów kondycjonowanych znad komórek 67NR? Dlaczego nie wykonano charakterystyki BMDMs pochodzących ze szpiku myszy karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D₃ i traktowanych kalcytriolem obarczonych rakiem gruczołu sutkowego EO771 oraz pochodzących ze szpiku myszy zdrowych, nieobarczonych nowotworem karmionych karmą o różnej zawartości witaminy D₃ i traktowanych kalcytriolem różnicowanych w obecności mediów kondycjonowanych?
3. Wykonano analizę fenotypową BMDMs, analizę ekspresji wybranych mRNA i białek dla linii BALB/c, która stanowiła kontrolę wobec linii 4T1 i 67NR. Natomiast, nie wykonano takowych analiz dla linii C57BL/6 stanowiącej kontrolę wobec linii EO771.

Pozostałe komentarze i pytania

4. Komórki EO771, podobnie jak 4T1, są niewrażliwe na przeciwproliferacyjne działanie kalcytriolu. Jak zatem można tłumaczyć wyniki badań *in vivo*, w których wykazano, że podawanie karmy suplementowanej witaminą D₃, jak i traktowanie myszy kalcytriolem niezależnie od podawanej karmy wzmagало potencjał przerzutowy komórek 4T1, ale nie komórek EO771?

5. Wpływ kalcytriolu na różnicowanie monocytów z krwi obwodowej pacjentek do różnych klas makrofagów był dwójaki, zależał od stopnia zaawansowania nowotworu gruczołu sutkowego (nowotwór zlokalizowany miejscowo, w stadium rozsianym), poziomu 25(OH)D₃ oraz statusu menopauzalnego. Proszę o próbę praktycznego wskazania znaczenia wpływu witaminy D₃ na różnicowanie monocytów w terapii guzów gruczołu sutkowego.
6. Analizując uzyskane wyniki widać, że wpływ witaminy D₃ na polaryzacje makrofagów jest różnicowany i zależy od wielu czynników, które znajdują się w mikrośrodowisku guza. Uwzględniając te obserwacje, jakie powinny być zalecenia dotyczące suplementacji witaminą D₃ dla chorych na nowotwór gruczołu sutkowego.

W dysertacji dostrzegam nieliczne pomyłki stylistyczne i literówki.

Wnioski

Powyższe niedociągnięcia nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej Pani Martyny Stachowicz-Suhs i mojej pozytywnej opinii. Rozprawa doktorska przedstawia wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Recenzowana rozprawa doktorska zawiera elementy nowości naukowej osiągniętej dzięki zastosowaniu złożonych badań na mysim modelu nowotworu gruczołu sutkowego oraz badań na pacjentkach chorych na nowotwór gruczołu sutkowego. Cele pracy zostały osiągnięte, a wyniki zostały częściowo opublikowane w czasopismach z listy JCR o wysokim IF. Tym samym rozprawa doktorska Pani Martyny Stachowicz -Suhs spełnia wszystkie wymogi o uzyskanie stopnia doktora zawarte w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574 ze zm.).

Mając na uwadze koncepcję badawczą oraz wartość poznawczą jaką wnoszą wyniki, składam do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk wniosek o dopuszczenie mgr Martyny Stachowicz-Suhs do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie zgłaszam wniosek o wyróżnienie pracy.

KIEROWNIK
Zakładu Biochemii Kwasów Nukleinowych
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

dr hab. n. med. Agnieszka Śliwińska

Dr hab. n. med. Agnieszki Śliwińskiej prof. uczelni