



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

dr hab. Elżbieta Kołaczowska, prof. UJ
Zakład Hematologii Eksperymentalnej
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Uniwersytet Jagielloński
Gronostajowa 9, 30-387 Kraków
☎ (+48-12) 664-50-65
E-mail: ela.kolaczowska@uj.edu.pl

Kraków, 8 marzec 2023

O C E N A

rozprawy doktorskiej Pani magister Martyny STACHOWICZ-SUHS pt.
„Charakterystyka makrofagów towarzyszących rakom gruczołu sutkowego w kontekście
wplywu witaminy D na mikrośrodowisko guza”

Choroby nowotworowe są według danych WHO drugą przyczyną śmierci na świecie (jedna na sześć śmierci jest z ich powodu), a rocznie na choroby nowotworowe umiera ok. 10 mln osób. W 2020 r. żyło 7.8 miliona kobiet (mężczyźni stanowią tylko 0.5-1% przypadków), u których zdiagnozowano nowotwór gruczołu piersiowego (powszechnie znany jako rak piersi) w ciągu ostatnich 5 lat, co czyni go najczęściej występującym nowotworem na świecie. Choć sukces terapii w leczeniu tego typu nowotworu jest wysoki, w krajach o wysokim dochodzie może sięgać nawet 90%, to krytycznym jest wczesne rozpoznanie i właściwa terapia. Ponadto ten typ nowotworu jest zróżnicowany, a niektóre jego formy charakteryzuje znacznie mniej optymistyczny odsetek wyleczeń. Dlatego badania dążące do poznania nowych mechanizmów przyczyniających się do rozwoju oraz przerzutowania tego typu nowotworów są bardzo istotne i mogą wspomagać tworzenie nowych terapii. W tym zakresie szczególnie istotne są badania mikrośrodowiska nowotworu (ang. *tumor microenvironment*, TME), a nie tylko samych komórek nowotworowych. Na TME składają się liczne komórki związane z tkanką łączną/macierzą zewnątrzkomórkową (ang. *extracellular matrix*, ECM) jak fibroblasty i białka ECM, komórki śródbłona naczyniowego, leukocyty i rozpuszczalne czynniki, w tym cytokiny czy mikropęcherzyki, wydzielane przez te komórki. W obrębie leukocytów, jedną z najważniejszych populacji w TME są makrofagi związane z nowotworami tzw. TAM (ang. *tumor-associated*

macrophages), komórki o dużej plastyczności i heterogenności, które mogą stanowić nawet do 50% masy litych nowotworów. Niestety TAM charakteryzuje głównie fenotyp przeciwwzapalny, pro-nowotworowy, wspomagają one zmutowane komórki także troficznie. **Biorąc pod uwagę powyższe fakty, nie jest zatem zaskakującym, że Doktorantka skoncentrowała swoje badania na makrofagach powiązanych z nowotworem gruczołu sutkowego, a konkretnie nad wpływem na funkcjonowanie tych komórek, a także na sam rozwój nowotworu, witaminy D₃.** Epidemiologiczne i eksperymentalne dane mocno wskazują na odwrotną korelację między niskim poziomem tej witaminy w organizmie a zachorowalnością na takie typy nowotworów jak rak jelita grubego, nowotwór gruczołu krokowego, nowotwory hematologiczne czy właśnie nowotwór gruczołu sutkowego.

Od opisanie tych ostatnich danych Doktorantka rozpoczyna Wstęp, a następnie opisuje wyniki swojego zespołu (jedna publikacja), które wskazują że aktywna forma witaminy D₃ oraz jej analogii wzmagają zależny od osteopontyny i limfocytów Th17 proces przerzutowania w mysim modelu raka piersi wywołanego przez linię 4T1 u młodych myszy. A zatem efekt przeciwny do licznych danych literaturowych, podkreślając potrzebę wyjaśnienia mechanizmów tego zjawiska. W dalszej części Wstępu Doktorantka kolejno wprowadza czytającego w tematykę badań: charakteryzuje same TAM, model nowotworu, rolę TAM w nowotworze gruczołu sutkowego, witaminę D₃ oraz wspomniane już zależności między jej poziomem a przebiegiem raka piersi. **Wstęp dobrze wprowadza do przedmiotu rozprawy**, choć być może większa liczba rycin (zawarte są dwie skromne ilustracje) ułatwiłaby przyswojenie informacji zawartych na 25 stronach. We Wstępie znalazło się kilka nieścisłości, np. sformułowanie „liczba makrofagów we krwi” (str. 20), określenie białka p53 białkiem pro-apoptotycznym (str. 32), przy jego szerokim spektrum działania, czy ponownego rozwijania niektórych skrótów zawartych w spisie poprzedzającym Wstęp. Proces hipoksji, często rozpatrywany przez Autorkę, nigdy nie został zdefiniowany/opisany. **Założenia i Cel pracy poprzedzone są mini wstępem, wyszczególniono także 5 celów szczegółowych, niestety rozdział ten nie zawiera hipotezy naukowej będącej podstawą rozprawy.**

Rozdział Materiały i Metody jest dobrze opracowany, wspomagają go tabele i schematy eksperymentów, co ułatwia zrozumienie ich nierzadko skomplikowanego charakteru. W rozdziale tym brak informacji o liczbie myszy i pacjentów na grupę i choć są one zawarte na zdecydowanej większości rycin w rozdziale Wyniki, brak ich na Ryc. 7 (myszy) oraz Ryc. 16/17/18/20 (liczba powtórzeń). W przypadku próbek od pacjentów, informacje te są bardzo rzetelnie przedstawione na każdej rycinie i to osobno dla każdej grupy pacjentów.

Przedmiotem badań były zarówno komórki mysie jak i zwierzęce, a liczba układów eksperymentalnych, zastosowanych metod badawczych i uzyskanych wyników jest ogromna. Za

bardzo ważną zaletę rozprawy uważam właśnie równoczesne przeprowadzenie badań na modelu mysim choroby i próbkach klinicznych od pacjentek z nowotworem gruczołu sutkowego.

Choć jak wspomniałam powyżej, rozdział Materiały i Metody uważam za dobrze opracowany mam kilka pytań do Doktorantki odnoszących się do jego pewnych podrozdziałów:

- nie znalazłam informacji jak oznaczano liczbę monocytów we krwi myszy (Tabela 8)
- podkreślano, że sprawdzano żywotność komórek wyizolowanych z myszy testem błękitu trypanu (np. str. 44), ale nie podano tej wartości; wartości nie podano także dla monocytów ludzkich, nie określono także testu (str. 48)
- jak sprawdzano sukces zróżnicowania się komórek w BMDM i MDM?
- bramkowanie przedstawione na Ryc. S-1 jest nieinterpretowalne ze względu na rozmiar czcionki i jakość druku (rozmazana czcionka). Proszę o jego przedstawienie na obronie.
- w celu wyizolowania monocytów z krwi ludzkiej zastosowano metodę izolacji sorterem magnetycznym. Była to izolacja pozytywna, w której przeciwciała anti-CD14 przyłączały się do tego markera na monocytach. W metodzie tej przeciwciała są połączone z kulkami magnetycznymi, które pozostają przyłączone do komórek po zakończeniu procedury. Selekcja pozytywna jest szybsza i tańsza niż negatywna, ale obarczona ryzykiem, że przyłączone kompleksy mogą wpływać na fizjologiczne funkcjonowanie komórek działając jak ich blokerzy lub agoniści. Dlaczego zastosowano takie podejście w dobrze metody, jak weryfikowano wpływ kompleksów przeciwciało-kulka na monocyty?
- str. 47 „Wykonano sprawdzenie czystości izolacji (...) stosując przeciwciała anti-CD14 BV-421 oraz anti-CD45”. Nie wyjaśniono jaki sygnał/wartości uznawano za oznaczające czystość monocytów, ani jakie wyniki uzyskano.
- dlaczego nie różnicowano monocytów w fenotyp M2b?
- we wszystkich badaniach *ex vivo*, makrofagi były stymulowane LPS przed oznaczaniem danych parametrów. Jak wyglądały wyniki w przypadku TAM wyizolowanych z tkanek myszy z nowotworem a niestymulowanych LPS, czy przeprowadzano takie oznaczenia?
- badania różnych populacji monocytów/makrofagów: czy dodanie LPS po ich zróżnicowaniu zmieniało fenotyp komórek? Czy powracały do fenotypu M1? Czy było to sprawdzane?

Rozdział Wyniki jest zdecydowanie najobszerniejszym rozdziałem rozprawy. Doktorantka starannie opisuje kolejne doświadczenia i uzyskane dane, są one także zaprezentowane na licznych przejrzystych rycinach i w tabelach. Podrozdziały dotyczące badań na modelu mysim, a potem klinicznym, kończą się wstępnym podsumowaniem wyników, co uważam za pomocne w uporządkowaniu takiej liczby danych. Liczba ta jest zarówno zaletą jak i wadą rozprawy i na pewno

była utrudnieniem dla Doktorantki w wyciągnięciu wniosków końcowych, do czego odniosę się dalszej części recenzji.

Ze względu na obszerność pracy, poniżej przedstawię te wyniki, które uważam za najważniejsze i będące, w mojej opinii, najważniejszymi osiągnięciami rozprawy:

I. Potwierdzenie, że w przypadku niektórych nowotworów gruczołu sutkowego typu przerzutującego (4T1), nadmierna suplementacja witaminą D3 może zwiększać ich przerzutowanie. Podobne obserwacje przeprowadzono w przypadku dodatkowego podania kalcytriolu (1,25(OH)₂D₃, aktywnej formy witaminy D3. Związek ten ma jednak bardzo krótki czas półtrwania i jest usuwany z organizmu po ok. 3-5 (doi: 10.5603/EP.a2023.0008) lub 5-8 godzinach (doi: <https://doi.org/10.1210/jc.2015-3910>). Biorąc pod uwagę, że zwierzęta otrzymywały dawki kalcytriolu co 2 dni, poproszę Doktorantkę o skomentowanie tych dwóch faktów. Jaki fizjologiczny proces naśladowało podanie od razu aktywnej formy witaminy D3 *versus* formy wyjściowej, która może ulec fizjologicznemu metabolizmowi w organizmie?

II. Wykazanie, że w powyższym układzie eksperymentalnym, równocześnie nie dochodzi do wzrostu samego guza, sugerując, że skoncentrowanie się na obserwacji tylko tego parametru w warunkach klinicznych może być mylące.

III. Potwierdzenie fenotypu M2 komórek TAM izolowanych z powyższych guzów (4T1) i jego skorelowanie z poziomem osteopontyny, a także wykazanie nasilenia tego fenotypu w przypadku podniesionego poziomu witaminy D₃. Jednak zmiany w kierunku fenotypu M2 obserwowano także w przypadku nowotworów nieprzerzutujących (linie 67NR i E0771), czy zatem sam fenotyp jest krytyczny, decydujący w zakresie zwiększonego przerzutowania w przypadku guzów 4T1 pod wpływem witaminy D₃?

Jeżeli chodzi o analizy fenotypowe komórek BMDM, zarówno na poziomie markerów powierzchniowych, ekspresji genów, jak i wydzielanych białek, wyniki te należą do trudno interpretowalnych. Wynika to z faktu, że różnice są zniuansowane, często potencjalne różnice wykazują tylko tendencję, ale nie osiągają istotności statystycznej i niekoniecznie korelują ze sobą. Część wyników jest niezrozumiała w kontekście istniejącej literatury naukowej, jak bardzo niski poziom wydzielanej IL-23. Nie są to zarzuty do samej Doktorantki, takie wyniki otrzymała, jednak wymagają zaznaczenia. W tej części pracy, ważnym podejściem było wykonanie dodatkowych badań na BMDM pochodzących od zdrowych myszy, nieobciążonych nowotworem, a stymulowanych medium kondycjonowanym znad komórek nowotworowych. Jako powód tych ostatnich badań Doktoranta podaje, że „komórki BMDM pochodzące od myszy obciążonych komórkami 4T1 okazały się być w jakimś stopniu zanieczyszczone komórkami nowotworowymi”. Które wyniki na to

wskazują? Jaki był to odsetek komórek i jak je wykryto? Jak Doktorantka tłumaczy różnice między tymi dwoma układami eksperymentalnymi – praktycznie brak różnic fenotypowych w BMDM od myszy z guzem *versus* BMDM stymulowane nadsączami znad 4T1, w których wykryto wiele różnic? Czy tylko ewentualne zanieczyszczenie komórkami nowotworowymi?

IV. Charakterystyka linii 4T1, E0771 i 67RN pod kątem ekspresji receptora dla witaminy D3 (VDR) oraz białek istotnych dla jej przemian w organizmie – CYP27B1 (hydroksylaza przekształcająca kalcydiol w kalcytriol) i CYP24A1 (hydroksylaza odpowiedzialna za katabolizm kalcytriolu). Co ciekawe jedna z linii nieprzerzutujących (E0771) miała podobny wzór ekspresji, na poziomie genu, dla VDR i CYP24A1, ale na poziomie białka CYP24A1 był zwiększony tylko w przypadku przerzutującej linii 4T1. Ten enzym jest odpowiedzialny za hydrolizę kalcytriolu. Jak w kontekście tego wyniku interpretuje Pani wyniki wszystkich powyższych badań, czy linia 4T1 nie powinna efektywniej hydrolizować kalcytriol, podczas gdy wydaje się być na niego najbardziej wrażliwa?

V. Podobnie jak w przypadku wyników z badań nad BMDM, makrofagi różnicowane z krwi pacjentek z nowotworem (określane jako MDM), były bardzo skomplikowane, a różnice fenotypowe obserwowane w różnych subpopulacjach tych komórek są trudne w interpretacji. Niemniej można wyciągnąć wniosek, że prawidłowy poziom witaminy D3 u pacjentek przed menopauzą korelował z polaryzacją w kierunku M1, natomiast w przypadku rozsianej form nowotworu, w fenotyp M2.

Rozdział „Dyskusja” jest poprawnie napisany, po nami załączono „Wnioski”. Z nie wszystkimi z nim w pełni się zgadzam i tak:

-wniosek 3: „Ostepontyna odgrywa kluczową rolę w procesie przerzutowania komórek 4T1 (...)” Doktorantka obserwowała tylko korelację między jej poziomem i przerzutowaniem, nie blokowała ani receptora dla tego białka ani nie stosowała antagonistów czy przeciwciał neutralizujących ostepontynę.

-wniosek 5: „Wysoka ekspresja CYP24A1 oraz niska ekspresja VDR są czynnikami warunkującymi brak wrażliwości komórek nowotworowych na przeciwproliferacyjną aktywność kalcytriolu”. Istotnie, oba te zjawiska mogą sprzyjać mniejszej wrażliwości na kalcytriol linii 4T1, choć bezpośrednio (Patrzy wyżej) tego nie badano, ale jak wytłumaczyć fakt, że witamina D3 i kalcytriol wręcz zwiększały przerzutowanie linii 4T1?

Rozprawa jako całość liczy 174 strony, zawiera 30 rycin, 12 tabel oraz suplement z 6 rycinami i 4 tabelami. Rozdział „Literatura” obejmuje 339 pozycji, być może zbyt wiele biorąc

pod uwagę możliwość szczegółowego zapoznania się z całymi artykułami. Niestety rozdział ten został przygotowany bez zachowania staranności i występują w nim liczne błędy. Wydaje się, że w trakcie jego przygotowania zastosowano jedną z dwóch taktyk: przekopiowania w całości danych bibliograficznych dostępnych w PubMed, w takiej formie w jakiej się tam znajdują, albo zastosowano jeden z programów wstawiających cytacje do tekstu typu Mendeley, które pobierają cytacje bezpośrednio z PubMed, co powoduje, że są one obarczone tymi samymi błędami, o ile nie dokona się ich korekty.

Lista błędów zawartych w „Literaturze:

- nazwy czasopism przedstawiane są niekonsekwentnie albo jako skróty albo w pełnym brzmieniu (przykładowe pozycje: 15 vs. 16, 38 vs. 39, 140 vs. 141, 229 vs. 230 itd)
- w kilku przypadkach, podany jest skrót własny nazwy czasopisma, a nie oficjalny, np. OTT (45, 98), IJMS (194), DDDT (266), WJCO (274).
- w większości artykułów podano tylko 3 pierwszych autorów, a następnie dodano formułę „et al.” Ale nie jest ona stosowana konsekwentnie i wielokrotnie wymienieni są wszyscy autorzy (przykładowe pozycje: 87, 90, 92, 98-100 itd.)
- Z kolei czasami przedstawiony jest tylko jeden autor a brak jest pozostałych (przykładowa pozycja: 274)
- w kilku przypadkach w ogóle nie podano autorów (przykładowe pozycje: 72, 318)
- w kilku przypadkach nie podano czasopisma (przykładowe pozycje: 20, 201, 224 itd.)
- kursywa jest generalnie używana w nazwach czasopism (choć czasem jej brak, np. w 39), ale czasami w tytule (np. 33)
- czasami jedyna informacja w miejscu, w którym powinien być rok, tom i numery stron to pojedyncza cyfra/liczba (przykładowe pozycje: 69, 129, 202, 212, 245, 263, 290, 298), niepełne dane także w 148, 160.
- w afiliacjach znajdują się zwroty „published online on...” charakterystyczne dla PubMed (przykładowe pozycje: 10, 20 itd)
- niektóre tytuły, bądź nazwy czasopism, zapisano kapitalikami (przykładowe pozycje: 7, 135, 160, 178 itd)

Choć rozprawa ma charakter monografii, w początkowych rozdziałach podkreślono, że część wyników została już opublikowana w dwóch dobrych publikacjach (IF>6, punkty MEiN = 140). W pierwszej z nich Doktorantka jest piątym Autorem, a w kolejnej drugim. W przypadku artykułu opublikowanego w *Nutrients* opisano wkład w eksperymenty poszczególnych Autorów, choć nie przedstawiono ich w tradycyjnej formie procentowej, nie wymieniono też które dokładnie wyniki zawarte w rozprawie

zostały wcześniej opublikowane (np. posługując się numerami rycin). W przypadku drugiej z publikacji w *Cancers*, nie odnalazłam żadnych informacji w powyższym zakresie.

Reasumując, uważam, że dobrze zaplanowane i przeprowadzone eksperymenty, przyniosły rezultaty, które doktorantka opisała w jasny i szczegółowy sposób, poddając je krytycznej, choć trudnej ocenie. Poproszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do moich uwag i ich dyskusję w trakcie obrony.

Błędy, które z obowiązku recenzenta wyliczam, nie wpływają, na moją wysoką ocenę merytoryczną recenzowanej pracy. Moim zdaniem uzyskane przez Doktorantkę wyniki, będące efektem dobrze zaplanowanych badań oraz konsekwentnie przeprowadzonych doświadczeń, w istotny sposób uzupełniają i poszerzają istniejącą wiedzę na temat funkcjonowania makrofagów w mikrośrodkowisku nowotworu gruczołu piersiowego modulowanego zróżnicowanym poziomem witaminy D₃. Na pewno są także dobrą podstawą do kontynuowania badań w tym zakresie, które pozwolą w pełni zrozumieć zachodzące procesy.

Uważam zatem, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z póź. zm.) w związku z art. 179 ust. 1 z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 z póź. zm.) i zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu o dopuszczenie Pani mgr Martyny Stachowicz-Suhs do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Elżbieta Kołaczowska, prof. UJ