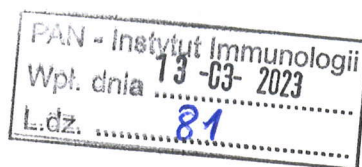




UNIwersYTET
WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ BIOLOGII I BIOTECHNOLOGII
KATEDRA BIOCHEMII



Olsztyn, dnia 9 marca 2023 r.

Dr hab. Anna Cieślińska, prof. uczelni
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
Wydział Biologii i Biotechnologii
Katedra Biochemii
ul. Oczapowskiego 1A
10-719 Olsztyn
anna.cieslinska@uwm.edu.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Martyny Stachowicz-Suhs

pt.

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

Przedstawiona do oceny dysertacja Pani mgr Martyny Stachowicz-Suhs pt. „Charakterystyka makrofagów towarzyszących rakom gruczołu sutkowego w kontekście wpływu witaminy D na mikrośrodowisko guza” została wykonana w Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem Promotorów: **Pani prof. dr hab. n. biol. Joanny Wietrzyk** oraz **Pana prof. dra hab. n. med. Rafała Matkowskiego**. Podstawą formalną wykonania recenzji jest pismo z dnia 12 stycznia 2023 roku **Pana prof. dra hab. Andrzeja Gamiana**, Dyrektora Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu (pismo nr RN-7/2023) oraz dokumentacja w postaci papierowej wersji pracy doktorskiej.

Ogólna charakterystyka rozprawy doktorskiej

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska w postaci monografii porusza ważną tematykę związaną z rolą witaminy D w procesach nowotworzenia. W niniejszej pracy Doktorantka opisuje wyniki badań, których głównym celem była charakterystyka makrofagów towarzyszących przerzutującym oraz nieprzerzutującym rakom gruczołu sutkowego w kontekście wpływu witaminy D₃ oraz kalcytriolu na ich ukierunkowanie w kierunku pro- lub przeciwnowotworowym. Badania były prowadzone na modelach mysich raka gruczołu sutkowego oraz na materiale biologicznym uzyskanym od pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem gruczołu sutkowego.



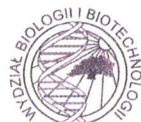
KATEDRA BIOCHEMII
UNIwersYTET WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE
ul. Oczapowskiego 1a, 10-719 Olsztyn
tel. (89) 523 39 90 d.filipiak@uwm.edu.pl
fax (89) 535 20 15 www.uwm.edu.pl/biolbioch



Badania podjęte przez Panią Magister są bardzo ważne z punktu widzenia poznawczego, ale również aplikacyjnego. Rak gruczołu sutkowego jest najczęściej występującym nowotworem diagnozowanym u kobiet, zarówno w Polsce jak i na świecie. Głównym celem terapii przeciwnowotworowych są komórki nowotworowe, ale coraz częściej zwraca się uwagę na interakcje pomiędzy komórkami nowotworowymi, a komórkami układu odpornościowego z otaczającego mikrośrodowiska. Oddziaływania te odgrywają istotną rolę w rozwoju, progresji i powstawaniu przerzutów, a różnicowanie się komórek organizmu w kierunku pro- lub przeciwnowotworowym i przyczyny tych procesów stają się bardzo ważnym aspektem w terapii antynowotworowej. W pracy doktorskiej Pani Magister podjęła się badania wpływu witaminy D₃ oraz kalcytriolu na polaryzację pro- lub przeciwnowotworową makrofagów. Dobór problematyki badawczej zaproponowany przez Doktorantkę wpisuje się istotnie w najnowsze trendy badań nad rolą witaminy D i jej wpływem na organizm człowieka. Szlak metaboliczny witaminy D stanowi sieć skomplikowanych połączeń między sprawnym działaniem białek zaangażowanych w proces przejścia nieaktywnej formy witaminy D w jej aktywny metabolit, kalcytriol. Receptory dla witaminy D są obecne na wielu komórkach, dlatego odgrywa ona kluczową rolę w układzie hormonalnym, który kontroluje homeostazę wapnia, reguluje układ odpornościowy i wpływa na szereg innych procesów związanych z prawidłowym funkcjonowaniem organizmu.

Formalny opis rozprawy

Rozprawa licząca 174 strony ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. Rozprawę rozpoczyna **Spis treści, Wykaz skrótów**, a następnie **Streszczenie** w języku polskim oraz angielskim. Pierwszy rozdział stanowi **Wstęp** liczący 26 stron i zawierający 3 główne podrozdziały, które wprowadzają czytelnika w tematykę pracy oraz zakres badań opisanych w dysertacji. Kolejny rozdział to **Założenia i cel pracy**, w którym Autorka przedstawia cel główny wraz z podaniem celów szczegółowych rozprawy. Trzeci rozdział stanowi opis **Materiałów i metod** (18 stron), z podziałem na 3 główne części dotyczące badań przeprowadzonych z użyciem mysiego modelu raka gruczołu sutkowego, badań przeprowadzonych z wykorzystaniem materiału biologicznego pochodzącego od pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem gruczołu sutkowego oraz metod stosowanych w pracy. **Wyniki**, liczące aż 57 stron, podzielone zostały na dwie części (każda część zakończona podsumowaniem najważniejszych wyników) i 13 mniejszych podrozdziałów. W następującej po tym rozdziale **Dyskusji** (22 strony) Doktorantka omawia najważniejsze problemy naukowe rozprawy, natomiast rozdział **Wnioski** syntetycznie podsumowuje wyniki uzyskane w pracy. Praca doktorska Pani mgr Martyny Stachowicz-Suhs kończy się rozdziałem obejmującym **Piśmiennictwo, Spis rycin i tabel** oraz ośmiostronicowym **Suplementem**. Na podkreślenie zasługuje fakt dużej liczebności piśmiennictwa cytowanego w niniejszej pracy – 339 pozycji literaturowych, w większości pochodzących z okresu ostatnich 10 lat. Moim zdaniem praca posiada właściwą pracom doktorskim strukturę. Ponadto, 20 tabel (+4 tabele w Suplemencie) i 30 rycin (+6 rycin w Suplemencie) ułatwiają czytelnikowi zrozumienie omawianego tematu, analizowanie wyników, jak też znacząco podnoszą wartość naukową całego opracowania.





Merytoryczna ocena rozprawy doktorskiej

Pierwszy rozdział Dysertacji stanowi napisany w sposób interesujący **Wstęp**, w ramach którego Autorka dokonała przeglądu najbardziej aktualnej wiedzy oraz poglądów dotyczących aspektów związanych z tematem pracy. Doktorantka jako pierwsze scharakteryzowała makrofagi towarzyszące nowotworom, określiła ich rolę w progresji nowotworowej, a następnie wymieniła czynniki wpływające na polaryzację makrofagów w kierunku przeciwnowotworowym.

W kolejnym podrozdziale Pani Magister skupiła się na omówieniu raka gruczołu sutkowego (epidemiologia, klasyfikacja i czynniki zwiększające ryzyko zachorowania), a także opisała rolę makrofagów w procesie sprzyjającym jego rozwojowi. W trzecim podrozdziale Wstępu Autorka bardzo obszernie omówiła metabolizm witaminy D₃ i jej związek między ryzykiem zachorowania na raka, wpływem na mikrośrodowisko nowotworów, a także przedstawiła mechanizmy działania kalcytriolu w komórkach raka gruczołu sutkowego. Pewnym niedosytem w tej części pracy jest, według mnie, brak informacji na temat białka wiążącego witaminę D w kontekście białek związanych z biologiczną funkcją kalcytriolu (Autorka wymienia VDR, CYP24A1 oraz CYP27B1). W związku z tym zwracam się do Pani Magister z prośbą o informację, czy białko wiążące witaminę D (VDBP, VDB) może także mieć wpływ na biologiczną funkcję kalcytriolu i jego przeciwnowotworowe działanie?

Wstęp zamyka bardzo interesujący podrozdział, bezpośrednio dotyczący tematu pracy i opisujący wpływ witaminy D₃ na makrofagi. W tej części pracy Pani Magister przytacza także badania, które zostały wykonane wcześniej w Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej IITD PAN i dowiodły, że kalcytriol w makrofagach wywodzących się ze szpiku zdrowych myszy wzmocnił ich różnicowanie się w kierunku M2, czyli pronowotworowym.

Podsumowując, dobór informacji przytoczonych we **Wstępie** świadczy o wnikliwej znajomości problematyki badawczej Doktorantki. W mojej opinii Autorka omówiła wszystkie zagadnienia niezbędne dla zrozumienia uzyskanych wyników, a bardzo dobra znajomość literatury i umiejętność przekazania zdobytej wiedzy świadczy o przygotowaniu Autorki do podjęcia niniejszych badań.

Z obowiązku recenzenta przedstawiam kilka drobnych uwag do tej części pracy:

1. W pracy Autorka używa wymiennie skrótu dla kalcydiolu „25(OH)D” lub „25(OH)D₃” – w publikacjach naukowych spotyka się obie formy, ale wskazane jest używanie jednej formy w całej pracy, w związku z tym proszę o ujednoczenie (podobnie w Dyskusji).
2. Nagłówek strony 6 i 7: jest „Wykaz skrótów”, powinno być „Spis treści”.

Założenia i cel pracy zostały jasno przedstawione i zamieszczone jako oddzielny rozdział. Głównym celem była charakterystyka makrofagów, które towarzyszą przerzutującym i nieprzerzutującym rakom gruczołu sutkowego w kontekście wpływu witaminy D₃/kalcytriolu na ich polaryzację pro- lub przeciwnowotworową. Aby zrealizować cel główny, Doktorantka przedstawiła także 5 celów szczegółowych.





Rozdział Materiały i metody został opracowany bardzo skrupulatnie. Autorka zastosowała szereg technik z zakresu biologii molekularnej i komórkowej, które umożliwiły przeprowadzenie hodowli *in vitro*, analizę wybranych genów, poziomu białka czy markerów powierzchniowych makrofagów towarzyszących nowotworom (TAMs). Rozdział został opisany w sposób na tyle dokładnie, aby wykazać bardzo dobre opanowanie przez Panią Magister powyższych metod. Bardzo pozytywnie oceniam umieszczone w tym rozdziale schematy (Ryciny 3, 4, 5, 6), które porządkują opisywane eksperymenty. Poprawy wymagałyby jednak rozdzielczość niektórych rysunków.

Podczas analizy tego rozdziału nasunęło mi się kilka pytań/sugestii:

1. Czy podczas optymalizacji metod określono toksyczną dawkę kalcytriolu dla komórek hodowanych w warunkach *in vitro*?
2. Strona 41 – poproszę o podanie ilości samic myszy, które zostały wykorzystane do eksperymentu.
3. Strona 42 – poproszę o podanie składu karmy, do jakiej miały dostęp myszy.
4. Strona 46 – poproszę o podanie liczby pacjentek, które zostały włączone do badań.
5. Strona 56 - ze względu na brak opisu metod ELISA zastosowanych w badaniach, warto by było w tabeli nr 6 podać numery katalogowe użytych zestawów.

Rozdział **Wyniki** jest najobszerniejszym rozdziałem rozprawy doktorskiej. Autorka w syntetyczny sposób przedstawia uzyskane wyniki badań, które są pogrupowane w poszczególnych tabelach i zobrazowane czytelnymi kolorowymi rycinami, z uwzględnieniem wyników analizy statystycznej. Na podkreślenie zasługuje również fakt mnogości oznaczeń różnych parametrów i kompleksowość badań, co świadczy o dużej wszechstronności Doktorantki. Ważnym porządkującym elementem rozdziału jest podsumowanie najważniejszych wyników umieszczone po omówieniu analiz przeprowadzonych z użyciem materiału biologicznego pochodzącego od myszy obciążonych rakiem gruczołu sutkowego oraz z analiz przeprowadzonych z użyciem komórek pochodzących od pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem gruczołu sutkowego.

Podczas analizy tego rozdziału, nasunęło mi się kilka uwag/sugestii:

1. Strona 90 – brakuje opisu ryciny 21
2. Strona 96 – jest „pozmion”, powinno być „poziom”.
3. Strona 110 – jest „Ryc. 28 A” oraz „Ryc. 28 B”; czy Autorka miała na myśli „Ryc. 30 A” oraz „Ryc. 30 B”?

W rozdziale **Dyskusja** Pani Magister umiejętnie dyskutuje wyniki własnych badań na tle licznych doniesień literaturowych. Przebieg Dyskusji jest uporządkowany i merytoryczny, a uzyskane wyniki mają nowatorski charakter. Jest to kolejny dowód na to, że Doktorantka jest dojrzałym i wnikliwym pracownikiem naukowym.





W rozdziale **Wnioski** przedstawionej do oceny Dysertacji Autorka wykazała, że cele rozprawy zostały osiągnięte i stanowią duży wkład w poszerzenie dotychczasowej wiedzy na temat roli witaminy D₃/kalcytriolu na proces nowotworzenia. W pełni zgadzam się z trafnością przedstawionych wniosków. Szczególnie ważne są w mojej opinii rezultaty wskazujące na to, że wysoka ekspresja *Cyp24a1* oraz niska ekspresja *Vdr* są czynnikami, które wpływają na brak wrażliwości komórek nowotworowych na przeciwproliferacyjną aktywność kalcytriolu.

Podczas analizy rozdziału Dyskusja, Wnioski oraz Piśmiennictwo nasunęło mi się kilka uwag/sugestii:

1. Ze względu na omawianie bardzo dużej ilości wyników w rozdziale Dyskusja, warto by było odnosić się w tekście do określonych rycin/tabel zamieszczonych w rozdziale Wyniki, co by ułatwiło czytelnikowi ich analizę.
2. Strona 116 – jest „magrofagów”, powinno być „makrofagów”.
3. Strona 121 – jest „zrowych”, powinno być „zdrowych”
4. Strona 126 (ostatni akapit) oraz 127 – poproszę o doprecyzowanie, czy „poziom VDR” odnosi się do ilości białka czy do ekspresji genu?
5. Pozycje 290 i 298 Piśmiennictwa wymagają uzupełnienia.
6. Pani Magister w swojej Dysertacji określiła szereg istotnych parametrów. Czy któryś z nich szczególnie by Pani poleciła, by mógł pretendować do miana nowego markera i/lub celu terapeutycznego?

Wyżej wymienione uwagi, niedopatrzienia edytorskie i sugestie, wykazane z obowiązku recenzenta, nie umniejszają wartości merytorycznej niniejszej rozprawy doktorskiej.

Podsumowanie

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską Pani mgr Martyny Stachowicz-Suhs uważam, że uzyskane wyniki stanowią dużą wartość zarówno poznawczą, ale także są podstawą do prowadzenia kolejnych doświadczeń naukowych. Jestem też pod wrażeniem dorobku naukowego Doktorantki. Wyniki stanowiące rozprawę zostały już częściowo opublikowane w dwóch pracach: w *Nutrients* (2020) oraz *Cancers* (2022), w których Doktorantka jest współautorką.

W świetle wszystkich powyższych argumentów stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji dysertacja doktorska pt. **„Charakterystyka makrofagów towarzyszących rakom gruczołu sutkowego w kontekście wpływu witaminy D na mikrośrodowisko guza”** autorstwa mgr Martyny Stachowicz-Suhs wnosi znaczący wkład w rozwój dyscypliny i odpowiada wymogom stawianym dysertacjom na stopień naukowy doktora, określonym w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz.U. z 2021 r., poz. 478 ze zm.) i może być podstawą do nadania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.





UNIwersytet
WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ BIOLOGII I BIOTECHNOLOGII

KATEDRA BIOCHEMII

Praca charakteryzuje się dużą wartością poznawczą, szerokim zakresem badań, wykorzystanych metod badawczych zarówno na komórkach ludzkich, jak i na materiale zwierzęcym, a także wpisuje się we współczesny nurt badań nad nowotworami. Świadczy to o dużej dojrzałości, samodzielności naukowej i badawczej Doktorantki.

Biorąc pod uwagę powyższe przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu **wniosek o wyróżnienie niniejszej dysertacji doktorskiej Pani mgr Martyny Stachowicz-Suhs.**

Olsztyn, 09.03.2023 r.

Anna Cieślińska

Dr hab. Anna Cieślińska, prof. uczelni



KATEDRA BIOCHEMII
UNIwersytet WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE

ul. Oczapowskiego 1a, 10-719 Olsztyn
tel. (89) 523 39 90 d.filipiak@uwm.edu.pl
fax (89) 535 20 15 www.uwm.edu.pl/biolbioch