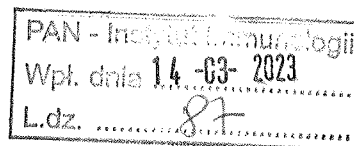


UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych



dr hab. n. med. Anna A. Brożyna, prof. UMK
Katedra Biologii Człowieka
Instytut Biologii
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
ul. Lwowska 1
87-100 Toruń
e-mail: anna.brozyna@umk.pl

Toruń, 09.03.2023r.

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr Natalii Łabędź
z tytułu „Wpływ witaminy D na fibroblasty towarzyszące nowotworom
gruczołu sutkowego”
wykonanej w Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej
Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu
pod kierunkiem promotorów
prof. dr hab. Joanny Wietrzyk oraz prof. dr hab. Rafała Matkowskiego

1. Podstawa formalno-prawna opracowania recenzji

Przedmiotem recenzji jest dysertacja doktorska Pani mgr Natalii Łabędź, pt. „Wpływ witaminy D na fibroblasty towarzyszące nowotworom gruczołu sutkowego”. Promotorami rozprawy jest Pani prof. dr hab. Joanna Wietrzyk i Pan prof. dr hab. Rafał Matkowski.

Podstawą formalną opracowania recenzji jest pismo z dnia 10 stycznia 2023r. (RN-6/2023) Pana Dyrektora Instytutu, prof. dr hab. Andrzeja Gamiana, w sprawie powierzenia mi oceny rozprawy doktorskiej mgr Natalii Łabędź, w oparciu o uchwałę Rady Naukowej Instytutu podjętej 08.12.2023 roku.

Recenzja ma na celu ustalenie, czy rozprawa spełnia wymogi określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. z 2021 poz. 478 ze zm.). Ocenę końcową oparto na następujących kryteriach: wybór problemu badawczego i tematu rozprawy, cele i hipotezy badawcze, metodyka badań, układ treści, oraz zawartość formalna i merytoryczna pracy.

2. Formalna ocena pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma konwencjonalny oraz logiczny układ i spełnia wymagania stawiane dysertacjom doktorskim o charakterze eksperymentalnym. Została napisana klarownym i poprawnym językiem. W większości rozdziałów wydzielono liczne, trafne z merytorycznego punktu widzenia, podrozdziały. Rozprawa liczy 191 stron i

składa się z następujących rozdziałów: Streszczenia (2 strony), Wstępu (26 stron), Założeń i celów pracy (1 strona), Materiałów i metod (31 stron), Wyników (49 stron), Podsumowania wyników (6 stron), Dyskusji (21 stron), Wniosków (2 strony), Bibliografii (25 stron, 305 pozycji). Zamieszczono również: wykaz używanych skrótów (3 strony), wykaz rycin i tabel (6 stron, 54 ryciny, 18 tabel) oraz załączniki (6 stron, 12 rycin), co ułatwia lekturę pracy oraz wzbogaca ją o graficzne przedstawienie dodatkowych wyników. Ponadto, Doktorantka zamieściła informację o źródłach finansowania badań (projekt NCN pt. „Wpływ witaminy D na makrofagi i fibroblasty towarzyszące nowotworom gruczołu piersiowego”, nr 2017/27/B/NZ5/01167, kierownik: prof. dr hab. Joanna Wietrzyk) oraz wynikach opublikowanych przez Doktorantkę w artykułach, z czego w jednym jest pierwszym autorem:

- **Łabędź N**, Stachowicz-Suhs M, Psurski M, Anisiewicz A, Banach J, Piotrowska A, Dzięgiel P, Maciejczyk A, Matkowski R, Wietrzyk J.: Modulation of Fibroblast Activity via Vitamin D3 Is Dependent on Tumor Type-Studies on Mouse Mammary Gland Cancer, *Cancers (Basel)* 2022 Sep 21;14(19):4585. doi: 10.3390/cancers14194585;

- Anisiewicz A, Kowalski K, Banach J, **Łabędź N**, Stachowicz-Suhs M, Piotrowska A, Milczarek M, Kłopotowska D, Dzięgiel P, Wietrzyk J.: Vitamin D Metabolite Profile in Cholecalciferol- or Calcitriol-Supplemented Healthy and Mammary Gland Tumor-Bearing Mice, *Nutrients*. 2020 Nov 6;12(11):3416. doi: 10.3390/nu12113416.

3. Ocena wartości merytorycznej

Podjęta przez Doktorantkę tematyka badawcza jest niezmiernie ważna z punktu widzenia zrozumienia potencjału terapeutycznego witaminy D3 oraz jej roli w kształtowaniu mikrośrodowiska guza nowotworowego, zwłaszcza w profilowaniu fibroblastów towarzyszących nowotworom. Jest to także bardzo aktualny temat, gdyż przez wiele lat badania nad nowotworami skupiały się głównie na komórkach nowotworowych. Natomiast holistyczne spojrzenie na proces inicjacji i rozwoju nowotworu oraz postęp nauki w tej dziedzinie pozwolił na odkrycie istotnej roli mikrośrodowiska guza, które może zarówno hamować, jak i promować rozwój nowotworu. Mikrośrodowisko guza nowotworowego jest także istotnym, potencjalnym celem ukierunkowanych molekularnie terapii antynowotworowych. Dlatego uważam, że badania, których realizacji podjęła się Doktorantka poszerzają wiedzę w zakresie szeroko pojętej biologii nowotworów gruczołu piersiowego, które są najczęściej występującymi nowotworami u kobiet. Warty podkreślenia jest także interdyscyplinarny charakter pracy.

Wstęp jest przeglądem literatury związanej z zagadnieniami poruszonymi w pracy. Rozdział ten jest stosunkowo obszerny, bardzo dobrze napisany od strony merytorycznej, jak i stylistycznej i pokazuje znajomość literatury przedmiotu Doktorantki. Szczegółowo zostały przedstawione zagadnienia związane z ogólną charakterystyką nowotworów piersi, plejotropową rolą witaminy D3, mikrośrodowiskiem nowotworów, ze szczególnym uwzględnieniem fibroblastów, w tym fibroblastów towarzyszących nowotworom, oraz

wpływem witaminy D na fibroblasty prawidłowe i towarzyszące nowotworom. Rozdział ten wzbogacony został poprzez 5 rycin opracowanych przez Doktorantkę. W czasie lektury tego rozdziału nasunęły mi się następujące uwagi:

-zabrakło choćby krótkiej informacji na temat aktywnych biologicznie metabolitów witaminy D, które zostały zidentyfikowane *in vivo* oraz wykazują także działanie przeciwnowotworowe;

-na str. 20 pojawia się zdanie „W łagodnych, początkowych zmianach rakowych (...)”; jest to niefortunny skrót myślowy, gdyż określenie „rakowe” odnosi się w naukach biologiczno-medycznych do złośliwych nowotworów nabłonkowych.

Pomimo powyższych uwag, uważam, że dane zawarte w tym rozdziale są przedstawione w sposób zrozumiały i stanowią dobrze przygotowane teoretyczne wprowadzenie do podjętej w badaniach naukowych tematyki.

Jako osobny rozdział wyodrębniono **Założenia i cele pracy**, które obejmowały scharakteryzowanie wpływu witaminy D3 na fibroblasty towarzyszące nowotworom gruczołu sutkowego w modelach mysich (myszy zdrowe oraz myszy obciążone 1 z 4 linii raka gruczołu sutkowego, karmione dietą o różnej zawartości witaminy D3 i otrzymujące doustnie kalcytriol) oraz w materiale tkankowym pobranym od pacjentek z rakiem gruczołu sutkowego, o różnym poziomie metabolitu witaminy D3 w osoczu. O ile cele główne i pośrednie ocenianej dysertacji zostały opisane szczegółowo, o tyle założenia pracy w mojej ocenie zostały przedstawione dosyć powierzchownie. Nie zmienia to jednak faktu, że podejmowana tematyka badawcza i postawione cele badawcze reprezentują ważne badania biomedyczne, które pozwalają na lepsze zrozumienie procesu nowotworowego, mechanizmów immunosupresji i lekooporności/lekowrażliwości. Wpisują się też we wciąż aktualne zapotrzebowanie na nowe cele molekularne do terapii przeciwnowotworowych, gdyż, pomimo znacznych postępów skuteczności terapii onkologicznych, choroby nowotworowe są jedną z wiodących przyczyn zgonów.

Rozdział **Materiały i metody** został podzielony na 5 podrozdziałów i zawiera opis użytych odczynników, przeciwciał, pożywek hodowlanych, zestawów ELISA i innych. Ponadto, zawiera charakterystykę użytych linii komórkowych, skład medium hodowlanego, opis warunków hodowli, a także opis użytych zwierząt doświadczalnych wraz z warunkami hodowli. W podrozdziale Metody przedstawiono badania *in vivo*, *ex vivo* i *in vitro* na materiale pochodzącym od myszy, badania na materiale pochodzącym od pacjentek, w tym analizę wybranych białek, analizę *ex vivo* i analizę *in vitro*, oraz analizę statystyczną. Na uwagę zasługuje szeroki wachlarz użytych metod eksperymentalnych, w tym technik opartych na ustalonych liniach komórkowych oraz hodowlach pierwotnych, techniki biologii molekularnej, takie jak RT-PCR, immunofenotypowanie przy użyciu cytometrii przepływowej, analizy aktywności enzymów, czy analizy ekspresji białek. Wszystkie metody zostały zastosowane prawidłowo. Pomimo dosyć szczegółowych opisów tego rozdziału pojawiło kilka niedociągnięć i pytań/wątpliwości:

-dlaczego stymulację witaminą D zastosowano tylko w warunkach in vivo, natomiast nie stosowano jej w warunkach in vitro w badaniach na modelach mysich;

-w doświadczeniach in vitro na materiale zwierzęcym zabrakło badań z użyciem kalcytriolu (co wykonano w badaniach na materiale ludzkim); należy zaznaczyć, że witamina D3 i jej pochodne wykazywać mogą pewne różnice w wywoływaniu określonych efektów biologicznych; takie badania wzbogaciłyby pracę i dostarczyły dodatkowych danych do analiz porównawczych;

-nie podano liczebności grup badawczych w badaniach in vivo w obu modelach;

-w badaniach in vitro nie doprecyzowano czy stosowano płodową surowicę bydlęcą oczyszczaną czy nieoczyszczaną węglem aktywnym; filtrowanie surowicy węglem aktywnym powoduje zmniejszeniem stężenia związków steroidowych, w tym witaminy D3 i jej pochodnych, stwarzając bardziej kontrolowane warunki doświadczeń w eksperymentach in vitro;

-Doktorantka podaje, że analizowała intensywność fluorescencji, jednak nie przedstawiała sposobów przygotowania obrazów do takich pomiarów; czy w cyfrowej analizie preparatów mikroskopowych znakowanych metodą immunofluorescencyjną stosowano wzorce fluorescencji lub inne formy normalizacji obrazów;

-co zdecydowało o stosowaniu w doświadczeniach mediów kondycjonowanych a nie kultur.

W rozdziale **Wyniki**, podzielonym na tematyczne podrozdziały, Doktorantka dokonała omówienia rezultatów wyników przeprowadzonych badań dotyczących analizy wpływu witaminy D3 na mysie fibroblasty prawidłowe i towarzyszące nowotworom oraz wpływ witaminy D3 na fibroblasty towarzyszące nowotworom pochodzące z guzów pacjentek. Dostyć obszerny opis i graficzną prezentację (Ryciny 8-54) uzyskanych wyników Doktorantka zakończyła dodatkowym rozdziałem - **Podsumowaniem wyników**, w którym, w sposób systematyczny, wypunktowała najważniejsze wyniki uzyskane w badaniach in vivo, ex vivo i in vitro w modelu mysim, porównanie guzów w materiale klinicznym, wyniki analizy ex vivo i in vitro w modelu ludzkim oraz analizy z utrwalonymi liniami komórkowymi traktowanymi medium kondycjonowanym. Lektura tej części dysertacji obrazuje ogrom pracy, jaki Doktorantka włożyła w realizację badań oraz ich analizę i graficzne przedstawienie. Szkoda, że niektóre dane graficzne są mało czytelne lub nieczytelne i nie reprezentują uzyskanych wyników, np.: obrazy preparatów mikroskopowych znakowanych immunofluorescencyjnie (np.: Rycina 22, Rycina 23), czy zdjęcia komórek w teście rysy (Rycina 49). W tym rozdziale zabrakło też graficznego przedstawienia danych dla badań in vivo prezentowanych w podrozdziale 12.1, zwłaszcza, że opis tych wyników jest dostyć lakoniczny. Uwzględniając fakt znacznego zróżnicowania odpowiedzi fibroblastów na traktowanie witaminą D3 uważam, że warto byłoby również sprawdzić ekspresję CYP24A1 w modelu mysim, jako jednego z najsilniej regulowanych przez witaminę D3 enzymów i, jak wskazano we Wstępie, zaangażowanego w metabolizm 1,25(OH)2D3. Doktorantka takie badania przeprowadziła

jedynie dla badań w modelu ludzkim. Należy natomiast podkreślić, że Doktorantka zaznaczyła, że badania przedstawione w ocenianej dysertacji stanowią część większego projektu oraz określiła, jakie badania wykonała sama, a jakie zostały wykonane przez współpracowników oraz wykonawców zewnętrznych.

Za najważniejsze należy uznać, na co zwraca także uwagę Doktorantka, wykazanie różnego wpływu kalcytriolu na zdolność do przerzutowania w zależności od zawartości witaminy D3 w diecie; zróżnicowanej odpowiedzi fibroblastów prawidłowych i towarzyszących nowotworom na witaminę D3 - w zależności od szeregu czynników zewnętrznych komórki te wykazywały fenotyp przeciw- jak i pronowotworowy. Profil ekspresji białek w fibroblastach zależał zarówno od rodzaju diety, jak i od modelu raka piersi. Również zmiany fenotypowe, odpowiedź na stymulację w warunkach *ex vivo*, tempo proliferacji, zdolność tworzenia kolonii obydwu typów fibroblastów uzależnione były od diety myszy, od których izolowano fibroblasty oraz od poziomu witaminy D3. Również w badaniach na materiale klinicznym Doktorantka wykazała m.in. zależny od statusu menopauzalnego i poziomu witaminy D3 w surowicy krwi obwodowej wpływ kalcytriolu na fibroblasty towarzyszące nowotworom. Natomiast w badaniach z użyciem medium kondycjonowanego wykazano m.in. osłabienie migracji komórek raka gruczołu sutkowego, ekspresji E-kadheryny po stymulacji fibroblastów kalcytriolem, ale zróżnicowaną ekspresję OPN w zależności od modelu, czy też poziomu witaminy D3 u pacjentek, od których izolowano fibroblasty.

Po rozdziale prezentującym uzyskane wyniki Doktorantka zamieściła **Dyskusję**, w której skonfrontowała uzyskane wyniki z danymi literaturowymi z zakresu tematycznego poruszanego w ocenianej pracy, m.in. w kontekście wpływu kalcytriolu na unaczynienie guza, ekspresję określonych białek, w tym markerów aktywacji, w fibroblastach prawidłowych i towarzyszących nowotworom w różnych modelach badawczych, zdolności tych fibroblastów do indukowania środowiska immunosupresyjnego i promowania/hamowania wzrostu guza nowotworowego. W tym rozdziale Doktorantka pogrubioną czcionką wskazała na najważniejsze i najciekawsze wyniki oraz przedstawiła ich interpretację. Szkoda, że nie zostały one przedstawione w rozdziale zatytułowanym **Wnioski**, który w obecnej formie jest skróconym podsumowaniem wyników. Umieszczenie w tym rozdziale wymienionych powyżej informacji ułatwiłoby lekturę dysertacji oraz jeszcze wyraźniej podkreśliło znaczenie uzyskanych wyników. Ponadto, w Dyskusji znalazły się opisy wyników prac eksperymentalnych nad przepływem krwi, których Doktorantka nie przedstawiła we wcześniejszych rozdziałach, a które znalazły się w opublikowanym przez Doktorantkę artykule. Natomiast, w mojej ocenie, Autorka niepotrzebnie zamieściła w tym rozdziale dwie tabele podsumowujące wyniki uzyskane dla fibroblastów izolowanych z modeli myszy. Tabele te stanowią cenny dodatek do ocenianej pracy, gdyż prezentują w skondensowany i przejrzysty sposób część wyników. Jednak powinny one być umieszczone w rozdziale Podsumowanie wyników. Z obowiązku recenzenta muszę wspomnieć o używaniu niepoprawnej nazwy analogu witaminy D stosowanego w medycynie - zamiast nazwy

kalcyportiol Doktorantka używała nazwy kalcyportiol. Nie można uznać tego błędu za błąd literowy, gdyż niepoprawna nazwa pojawia się kilkakrotnie w treści pracy.

Podsumowując, praca napisana jest dojrzałym i poprawnym językiem, jest przygotowana dokładnie i estetycznie. Ryciny i tabele są adekwatne do treści rozdziałów, na ogół dobrej jakości, przejrzyste i zawierają wiele cennych informacji.

4. Ocena końcowa

Przedstawione wyniki pracy doktorskiej Pani Natalii Łabędź stanowią istotny wkład w scharakteryzowanie biologii mikrośrodowiska raków gruczołu piersiowego, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu witaminy D3, której plejotropowe działanie jest coraz lepiej poznane. Sposób przeprowadzenia badań, przygotowania pracy oraz jej prezentacja, a także interpretacja uzyskanych wyników dowodzą, że Doktorantka ma nie tylko rozległą wiedzę dotyczącą przedmiotu badań, ale także umiejętność analizy uzyskanych wyników. Szeroki zakres zastosowanych metod badawczych oraz sposób analizy uzyskanych wyników świadczą o dojrzałości naukowej Autorki i dużym stopniu samodzielności w pracy naukowej. Moje uwagi i pytania przedstawione powyżej, jak również drobne usterki redakcyjne, błędy stylistyczne, literowe, czy drobne błędy przy bazie bibliograficznej, których nie zamieszczałam w niniejszej recenzji, nie podważają wysokiej wartości pracy. Uważam, że Doktorantka w pełni rozwiązała oryginalny problem badawczy, jaki przed sobą postawiła.

5. Wniosek końcowy

Uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Natalii Łabędź pt. „**Wpływ witaminy D na fibroblasty towarzyszące nowotworom gruczołu sutkowego**” spełnia wszelkie wymagania określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 poz. 478 ze zm.). W związku z powyższym przedkładam Radzie Naukowej Instytutu wniosek o dopuszczenie mgr Natalii Łabędź do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, w uznaniu szerokiego zakresu badań i wartościowych, oryginalnych wyników, rekomenduję wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

Kierownik
Katedra Biologii Człowieka
Brożyna
dr hab. Anna Brożyna, prof. UMK
tel. 56 611 45 99