

## Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Natalii Łabędź

### Wpływ witaminy D<sub>3</sub> na fibroblasty towarzyszące nowotworom gruczołu sutkowego

Choroby nowotworowe są ogromnym problemem medycznym i społecznym. Mimo nieustannych postępów w ich diagnozowaniu i leczeniu, zapadalność i umieralność z tego powodu jest wciąż wysoka. Do najczęstszych należą nowotwory gruczołu sutkowego. Stanowią one heterogenną grupę o zróżnicowanych cechach morfologicznych, molekularnych i klinicznych. Poznanie tych wykładników, pozwoliło na wprowadzenie nowoczesnych, ukierunkowanych metod leczenia. Niemniej konieczne są dalsze badania procesów neogenezy, ale także poznanie wszelkich czynników środowiskowych, w tym żywieniowych, które mogą mieć wpływ na zapadalność i manifestację kliniczną nowotworów gruczołu sutkowego. Doktorantka swoje zainteresowanie skierowała na witaminę D<sub>3</sub>, która powszechnie jest stosowana w wielu wskazaniach, często w sposób niekontrolowany. Przypisuje się jej udział w regulacji procesów odpornościowych, apoptozy, migracji oraz proliferacji i różnicowaniu komórek, w tym komórek nowotworowych. Wykazują one ekspresję dla jej receptorów, a nawet enzymy uczestniczące w metabolizmie metabolitów tej witaminy. Uznaje się, że kalcytriol może również regulować angiogenezę guzów, adhezję i migrację komórek nowotworowych oraz ma wpływ na ich inwazyjność. Takie właściwości potwierdzono w licznych badaniach nowotworów różnych narządów. Wyniki tych badań jednak są zróżnicowane, zarówno korzystne, jak i wątpliwe. W badaniach eksperymentalnych stwierdzano również promowanie migracji komórek nowotworowych pod wpływem kalcytriolu. Względnie mało doniesień dotyczy tych badań w nowotworach gruczołu sutkowego, co również stanowiło dla Doktorantki inspirację do podjęcia własnych badań w tym temacie.

Celem badań była ocena wpływu witaminy D<sub>3</sub> na fibroblasty towarzyszące nowotworom gruczołu sutkowego. Wybór fibroblastów do eksperymentu wynikał ze znajomości ich cech i roli w patogenezie chorób zapalnych i nowotworowych. Stanowią one integralną część guzów nowotworowych i mają wpływ na ich progresję przy udziale różnych

mechanizmów. Przypisuje się im zdolność do zmiany macierzy, promowanie tworzenia naczyń krwionośnych, pobudzanie proliferacji i migracji komórek nowotworowych, a także do zmian w ich metabolizmie. Z drugiej strony, pojawiają się również doniesienia o ich aktywności przeciwnowotworowej, szczególnie we wczesnych fazach rozwoju nowotworów. Te rozbieżne opinie również uzasadniają celowość podjęcia własnych badań.

W badaniach Doktorantka wykorzystała fibroblasty wyizolowane z guzów i płuc myszy obciążonych komórkami raka gruczołu sutkowego oraz fibroblasty z guzów sutka kobiet o zróżnicowanym poziomie metabolitu witaminy D<sub>3</sub> w osoczu. W modelu hodowli komórkowej fibroblastów oceniła wpływ różnych dawek witaminy D<sub>3</sub> na proces ich aktywacji, z uwzględnieniem stanu hormonalnego i klinicznego pacjentek.

Innym ważnym celem badań była ocena wpływu fibroblastów stymulowanych kalcytriolem na właściwości komórek raka gruczołu sutkowego *in vitro*.

Bogaty program badań był dobrze zaplanowany i w całości zrealizowany, przy użyciu wielu metod diagnostycznych, w tym testów immunoenzymatycznych, cytometrii przepływowej, immunofluorescencji, łańcuchowej reakcji polimerazy (real-time PCR) i izolacji magnetycznej komórek. Eksperymenty na zwierzętach zostały przeprowadzone za zgodą i Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach we Wrocławiu (nr uchwały 66/2018) oraz zgodnie z Dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady nr 2010/63/EU na temat ochrony zwierząt laboratoryjnych.

Bogaty program badań zapewnił wiele cennych wyników. Na ich podstawie Doktorantka sformułowała następujące wnioski:

1. Wysoki poziom metabolitów witaminy D<sub>3</sub> w osoczu myszy wywiera odmienny efekt w fibroblastach obecnych w miejscu przerzutowania i CAFs guza pierwotnego w mysich modelach raka gruczołu sutkowego 4T1 i E0771.
2. Zwiększenie poziomu metabolitów witaminy D<sub>3</sub> w osoczu myszy obciążonych 4T1 skutkuje rozwojem fibroblastów opornych na czynniki promujące ich aktywację w miejscu przerzutowania. Wskazuje na to obniżenie poziomu  $\alpha$ SMA, PDGFR $\beta$  i TNC w komórkach.
3. Deficyt witaminy D<sub>3</sub> w organizmie myszy obciążonych komórkami raka gruczołu sutkowego 4T1 wraz z administracją kalcytriolu zwiększają poziom  $\alpha$ SMA, PDPN i TNC w fibroblastach obecnych w miejscu przerzutowania, uwrażliwiając je na czynniki promujące ich aktywację.

4. Zarówno wysoki poziom metabolitów witaminy D3 w osoczu, jak i administracja kalcytriolu do organizmu myszy obciążonych komórkami E0771, w którym już rozwinął się rak gruczołu sutkowego może skutkować powstawaniem CAFs o tym samym fenotypie (PDPN+, TNC+) świadczącym o zwiększonej aktywacji i właściwościach pronowotworowych, zarówno w kontekście immunosupresji, jak i promocji procesów zaangażowanych w przerzutowanie raka gruczołu sutkowego.
5. Stymulacja ex vivo CAFs pochodzących od pacjentek o zróżnicowanych cechach klinicznych za pomocą kalcytriolu może zarówno promować i hamować pronowotworową aktywność fibroblastów.
6. W przypadku CAFs pochodzących od pacjentek z deficytem witaminy D3 stymulacja ex vivo pokazuje przeważający przeciwnowotworowy efekt kalcytriolu. Obniżeniu ulega poziom CCL2, TNC, IDO1 i MMPs zaangażowanych w indukcję stanu immunosupresji i promocję przerzutowania. Komórki raka gruczołu sutkowego linii MDA-MB-231 stymulowane medium z CAFs pochodzących od pacjentek z deficytem witaminy D3 wykazują obniżony poziom OPN i ZEB1 - ważnych induktorów progresji raka gruczołu sutkowego.
7. Działanie kalcytriolu ex vivo nie zależy wyłącznie od samej charakterystyki CAFs, ale i od podtypu komórek raka gruczołu sutkowego, na jaki oddziałują. Stymulowane kalcytriolem CAFs mogą zwiększać (wzrost poziomu OPN) lub obniżać (obniżenie tempa migracji) złośliwość komórek MCF-7 (typ luminalny A) tak, jak i obniżać złośliwość komórek potrójnie ujemnego raka gruczołu sutkowego MDA-MB-231 poprzez obniżenie poziomu OPN.
8. Biorąc pod uwagę niejednoznaczny wpływ witaminy D3 i kalcytriolu in vivo i ex vivo niezbędne są dalsze badania, które pozwolą jednoznacznie rozstrzygnąć zasadność suplementacji witaminą D3 w różnych podtypach raka gruczołu sutkowego.

Na podstawie tych niejednoznacznych wyników Doktorantka wnioskuje, że fibroblasty towarzyszące nowotworom stanowią heterogenną grupę komórek, a efekt kalcytriolu na różne ich podgrupy może być odmienny. Witamina D<sub>3</sub> może zarówno wspierać pro-nowotworową aktywność fibroblastów, jak i ją hamować.

Doktorantka podkreśla również, że działanie kalcytriolu na komórki nie zależy wyłącznie od samej charakterystyki fibroblastów, ale i od podtypu raka gruczołu sutkowego na jaki oddziałują.

Biorąc pod uwagę niejednoznaczny wpływ witaminy D<sub>3</sub> in vivo i ex vivo, Doktorantka wnioskuje, że niezbędne są dalsze badania, które pozwolą ustalić zasadność i granice jej suplementacji w różnych podtypach gruczołu sutkowego. Panujące przekonanie o znaczącym działaniu przeciwnowotworowym witaminy D<sub>3</sub> wymaga naukowego potwierdzenia w dalszych badaniach. Wyniki badań Doktorantki mogą być pewnym ostrzeżeniem przed nadmierną i bezwarunkową suplementacją tej witaminy w chorobach nowotworowych. Poziom związków biologicznie aktywnych, takich jak hormony, neuroprzekaźniki, a także witaminy, nie może być zbyt wysoki, jak i zbyt niski. Naruszenie ich hemostazy skutkuje zaburzeniem procesów metabolicznych w organizmie i promuje powstawanie i chorób. W tym kontekście, wyniki uzyskane przez Doktorantkę mają ważne znaczenie poznawcze, ale i implikacje utylitarne.

Oprócz wartości merytorycznych rozprawa doktorska wyróżnia się:

- szczegółowym wprowadzeniem i uzasadnieniem celowości podjętych badań
- starannym doborem materiału do badań
- precyzyjną metodyką badań
- wzorowo przeprowadzoną analizą statystyczną wyników
- przejrzystym przedstawieniem uzyskanych wyników
- rzeczowo przeprowadzoną dyskusją
- obszernym i aktualnym piśmiennictwem

W bardzo obszernej dysertacji trudno było uniknąć drobnych uchybień językowych, które w żadnym stopniu nie wpływają na jej wartość.

Szczegółowe podsumowanie wyników w osobnym podrozdziale ułatwia ich zrozumienie i ogólną ocenę. Natomiast pewną uwagę budzą wyciągnięte wnioski. Chociaż odpowiadają na zaplanowane cele pracy, mogłyby być bardziej uogólnione, z pominięciem licznych skrótów. Ograniczenie licznych skrótów wyrazowych nie umniejszyłoby wartości pracy i zasad jej konstrukcji naukowej.

Rozprawa doktorska liczy 191 stron, zawiera 10 rozdziałów wraz z podrozdziałami i załącznikami, 18 tabel i 64 rycin. Starannie dobrane i aktualne piśmiennictwo obejmuje 305 pozycji, zawartych w większości w międzynarodowych czasopiśmie o uznanej randze naukowej. Zredagowana jest zgodnie z przyjętymi zasadami, z zachowaniem odpowiednich

proporcji między rozdziałami. Wyróżnia się dobrym opracowaniem statystycznym i technicznym. Stanowi samodzielny dorobek naukowy, który jest kontynuacją wcześniej prowadzonych badań. Rozprawa spełnia wszystkie ustawowe warunki stawiane tego typu opracowaniom.

W związku z powyższym z pełnym przekonaniem składam wniosek do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Natalii Łabędź do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej dysertacji.

Łódź, 10.03.2023

Recenzent - dr hab.n.med.prof.UM

Cezary Chojnacki

PROF. DR HAB. N. MED. CEZARY CHOJNACKI  
Katedra Żywności i Żywienia Klinicznego  
Kliniki Gastroenterologicznej  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
*Cezary Chojnacki*  
dr hab. n. med. Cezary Chojnacki



## Wniosek

### o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Natalii Łabędź

#### nt.: *Wpływ witaminy D<sub>3</sub> na fibroblasty towarzyszące nowotworom gruczołu sutkowego*

Choroby nowotworowe są ogromnym problemem medycznym i społecznym. Mimo postępów w diagnostyce i leczeniu nadal konieczne są badania nad poznaniem wszelkich czynników, w tym środowiskowych i żywieniowych, które mogą mieć wpływ na zapadalność i historię naturalną tych chorób. Doktorantka swoje zainteresowania skierowała na witaminę D<sub>3</sub>, którą powszechnie uważa się za substancję przeciwnowotworową i zaleca się suplementację w sposób niekontrolowany. Głównym celem badań była ocena wpływu tej witaminy na fibroblasty towarzyszące nowotworom gruczołu sutkowego. W obszernych badaniach na modelu zwierzęcym i materiale ludzkim uzyskała wiele interesujących, chociaż niejednoznacznych wyników. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka wnioskuje, że fibroblasty towarzyszące nowotworom stanowią heterogenną grupę komórek, a efekt witaminy D<sub>3</sub> na różne ich podgrupy może być odmienny. Witamina D<sub>3</sub> może zarówno wpierać pro-nowotworową aktywność fibroblastów, jak i ją hamować. Doktorantka podkreśla również, że działanie kalcytriolu na komórki nie zależy wyłącznie od samej charakterystyki fibroblastów, ale i od podtypu raka gruczołu sutkowego na jaki oddziałują. Wnioskuje również, że niezbędne są dalsze badania, które pozwolą ustalić zasadność i granice jej suplementacji w różnych podtypach gruczołu sutkowego.

Oprócz cennych wartości merytorycznych rozprawa doktorska wyróżnia się:

- szczegółowym uzasadnieniem celowości podjętych badań;
- starannym doбором materiału do badań;
- nowoczesną metodyką badań;
- przejrzystym przedstawieniem uzyskanych wyników;
- rzeczowo przeprowadzona dyskusją;
- obszernym i aktualnym piśmiennictwem.

Wszystkie powyższe walory stanowią uzasadnienie przedstawionego wniosku.

dr hab. n. med. prof. UM Cezary Chojnacki

KIEROWNIK  
Zakładu Żywienia Klinicznego  
i Diagnostyki Gastroenterologicznej  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

*Cezary Chojnacki*  
Dr hab. n. med. Cezary Chojnacki

