



PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia 20.03.2023
L.dz. 95

KATEDRA I ZAKŁAD HISTOLOGII

80-211 Gdańsk, ul. Dębinki 1

tel. 0 58 349 14 37

fax 0 58 349 14 19

e-mail: histolog@gumed.edu.pl

Prof. dr hab. Michał Żmijewski,
Katedra Histologii,
Gdański Uniwersytet Medyczny,
ul. Dębinki 1a, Pokój 15
80-210 Gdańsk, Pomorskie
Polska
Tel: +48 583491455
Email: mzmijewski@gumed.edu.pl

Gdańsk, 13.03.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani Natalii Łabędź

Tematem przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej **Pani Mgr Natalii Łabędź** jest: „Wpływ witaminy D3 na fibroblasty towarzyszące nowotworom gruczołu sutkowego”.

Promotorami pracy są: **Pani prof. dr hab. Joanna Wietrzyk**, Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej, Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu; oraz **Pan prof. dr hab. Rafał Matkowski** z Dolnośląskiego Centrum Onkologii, Pulmonologii i Hematologii we Wrocław.

1) Ocena merytoryczna

a) trafność podjętej tematyki i jej oryginalność.

Nowotwory stanowią poważny problem zarówno medyczny, jak i społeczny. Szacuje się, że co najmniej 1,5 miliona kobiet zapada rocznie na nowotworu gruczołu sutkowego, a nowotwór ten jest zarazem najczęstszą przyczyną zgonu w tej grupie. Proces nowotworzenia jest skomplikowany i wieloetapowy. Od niedawna wiadomo, że nie tylko komórki nowotworowe są odpowiedzialne za wzrost i progresję guza, ale również istotne jest jego mikrośrodowisko. W tkance guza normalnie występujące komórki organizmu, takie jak fibroblasty, czy komórki układu odpornościowego (makrofagi oraz limfocyty), ulegają „przeprogramowaniu”, tracąc swoje potencjalne własności przeciwnowotworowe. Takie zmienione fibroblasty związane z guzem (ang. CAFs), wspomagają proliferację komórek nowotworowych, ułatwiają jego progresję oraz przerzutowanie. Witamina D oraz jej aktywna forma 1,25(OH)₂D₃ nie tylko odgrywa istotną rolę w regulacji gospodarki wapniowo-fosforanowej, ale również reguluje aktywność, wzrost i różnicowanie wielu typów komórek, co wskazuje na jej potencjalne zastosowanie w profilaktyce oraz terapii nowotworów.

Rozprawa doktorska **mgr Natalii Łabędź** jest kontynuacją badań prowadzonych przez zespół **Prof. dr hab. Joanny Wietrzyk** nad mechanizmami aktywowanymi przez witaminę D w komórkach nowotworowych oraz mikrośrodowisku guza ze szczególnym uwzględnieniem **fibroblastów towarzyszących nowotworom gruczołu sutkowego**. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska przygotowana zastała w formie monografii (Na podstawie, Art. 179 ust. 6-9 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r., poz. 1669 z późn. zm.). Manuskrypt zawiera,

191 ponumerowanych stron, w tym, 54 ryciny oraz 18 tabel. Praca zawiera również załącznik, w którym umieszczono 12 dodatkowych rycin. Rozprawa powstała w oparciu o grant NCN pt. „**Wpływ witaminy D na makrofagi i fibroblasty towarzyszące nowotworom gruczołu piersiowego**” 2017/27/B/NZ5/01167, a uzyskane wyniki zostały już częściowo publikowane w ramach dwóch publikacji (*Nutrients*. 2020 Nov;12(11):3416 oraz *Cancers*. 2022 Jan;14(19):4585), w których **Pani mgr Natalii Łabędź jest odpowiednio czwartym oraz pierwszym autorem.** I chociaż autorka nie zamieściła oświadczeń współautorów określających ich udział w powstaniu ww. prac, to pewną sugestią może być tekst umieszczony w rozdziale „Wyniki” na stronie 77-78. Fragment ten wskazuje na to, że mgr Łabędź zajmowała się opieką nad zwierzętami i wykonała część sekcji badanych zwierząt, w ramach doświadczeń opisanych w czasopiśmie *Nutrients*. Zgodnie z informacjami zawartymi w drugiej pracy (*Cancers*), mgr Łabędź brała udział w opracowaniu metodologii, wykonaniu zadań badawczych, wizualizacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu, a więc jej udział był istotny. Należy podkreślić, że znaczna część badań (badania na materiale klinicznym) nie została jeszcze opublikowana i powinna być traktowana, jako monografia autorki. **Wydaje się, więc, że udział mgr Natalii Łabędź w wykonaniu części doświadczalnej oraz przygotowaniu przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej był znaczący.**

b) opis uzyskanych wyników

Rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Łabędź składa się z dwóch części, pierwszej dotyczącej doświadczeń na **fibroblastach wyizolowanych z myszy**, które karmione były paszą o różnej zawartości witaminy D₃ (**100IU/kg – niedobór, 1000IU/kg – optymalna dawka oraz 5000IU/kg – zwiększona dawka**). Dodatkowo, zwierzętom podawano ortotopowo komórki mysich linii raka gruczoły piersiowego o różnej zdolności do przerzutowania (**4T1 - przerzutujące, 67NR - słabo przerzutujące, E0771 - nieprzerzutujące**). Nie znalazłem jednak opisu w pracy, ani publikacji, w jaki sposób oraz w jakie miejsce podawane były komórki nowotworowe. Druga część prezentowanych badań opierała się o **fibroblasty wyizolowane z guzów pochodzący od pacjentek z nowotworem gruczołu sutkowego** o różnym zaawansowaniu choroby, różnym wieku (przed menopauzą lub po menopauzie) oraz o różnym poziomie 25(OH)D₃ w surowicy (poziom optymalny >30 ng/mL, wartości poniżej 30 ng/mL określano jako deficyt). W przedstawionych badaniach oceniano wpływ suplementacji (poziomu 25(OH)D₃) lub podania 1,25(OH)₂D₃ (tylko model myszy) na własności fibroblastów izolowanych z guzów pierwotnych, przerzutów do płuc; w porównaniu do fibroblastów pochodzących ze zdrowych tkanek. Ważną częścią pracy, było scharakteryzowanie ekspresji markerów komórek CAFs oraz czynników wydzielanych przez te komórki, które mogłyby mieć wpływ na wzrost komórek nowotworowych linii pochodzących z guzów gruczołu sutkowego. Należy podkreślić, że chociaż przyjęty model doświadczalny jest dość skomplikowany, a praca zawiera olbrzymią ilość oznaczeń, to jednak manuskrypt jest napisany w sposób usystematyzowany i przejrzysty, co w dużej mierze ułatwia prześledzenie przedstawionych wyników. Autorka zawarła na siedmiu stronach ponad **30 bardzo szczegółowych wniosków wynikających z badań**, które następnie (już jako właściwe wnioski, strona 153) ograniczone zostały do 8 punktów. Wydaje się, że właśnie ta olbrzymia różnorodność wykonanych doświadczeń oraz oznaczeń, wykorzystanie modeli mysich i ludzkiego spowodowała, że trudno jest wyciągnąć jednoznaczne wnioski dotyczące potencjalnej roli witaminy D₃

i kalcytriolu na rozwój oraz przerzutowanie komórek nowotworów gruczołu sutkowego oraz roli CAFs, w tym procesie. Niemniej jednak, jednym z najistotniejszych wnioskami z przedstawionych badań może być obserwacja, że **stężenie 25(OH)D₃ w surowicy (niedobór vs optymalny poziom) oraz podawanie 1,25(OH)₂D₃, może zarówno aktywować lub hamować aktywność CAFs, a przez to promować lub hamować rozwój komórek nowotworu gruczołu piersiowego**. Autorka wskazuje, że efekt działania witaminy D, w dużej mierze zależy od charakterystyki (podtypu) komórek nowotworowych, czy stopnia zaawansowania choroby nowotworowej. Dalsze badania wykażą, jakie czynniki są odpowiedzialne za tę potencjalną dwoistość witaminy D, co z pewnością przyczyni się do wprowadzenia lepszej profilaktyki, jak również do określenia skuteczności zastosowania witamin D oraz jej analogów w terapii nowotworów.

c) poprawność formalno-językowa, stylistyczna i interpunkcyjna, sposób prezentacji.

Rozprawa napisana jest poprawnie pod względem językowym, co przy tak obszernej pracy wymagało bardzo dużego zaangażowania doktorantki. Z uwagi na rolę recenzenta zwrócić uwagę tylko na jedną literówkę „puc” zamiast „płuc” strona 65. W pracy znajdują się również, być może nie do końca przemyślane stwierdzenia: „Klony liczone ręcznie” (strona 58), oraz „pacjenci z rozpoznaniem rakiem gruczołu sutkowego” (strona 59). W drugim przypadku można było napisać po prostu „pacjentki”.

Rysunki i tabele wykonane są bardzo starannie i znacząco ułatwiają zrozumienie opisywanych zjawisk oraz prezentowanych wyników. Pewne zastrzeżenie budzi jakość mikrofotografii przedstawiających wyniki barwień z wykorzystaniem immunofluorescencji. Część paneli w wersji drukowanej jest zbyt czarna i nic widać na nich komórek (np. Rycina 22, 23, 38 czy 49). Natomiast w wersji elektronicznej (plik pdf) rysunki są czytelne. Na Rycinie 3 dwa razy oznaczone są komórki dendrytyczne (być może chodziło o zaznaczenie „normalnych” fibroblastów na dole po lewej stronie). W opisie fibroblastów zdrowych tkanek pojawia się opis „rezydujące fibroblasty tkanek charakteryzują się bardzo niską aktywnością metaboliczną i transkrypcyjną” (strona 28). W histologii takie komórki nazywane są fibrocytami. Fibroblasty mogą zmieniać swój fenotyp (fibroblast vs fibrocyt) w zależności od potrzeb i nie koniecznie muszą umierać po zakończeniu procesu reparacji tkanki.

2) Ocena metodologiczna

a) dobór literatury

Praca doktorska **Pani magister Natalii Łabędź** zawiera, aż **305 dobrze dobranych odnośników literaturowych**. Na podkreślenie zasługuje również fakt, że zdecydowana większość tych prac pochodzi z ostatnich pięciu lat. Zarówno dobór oraz ilość cytacji wskazuje na to, że autorka świetnie porusza się w badanej tematyce, a prezentowane wyniki dobrze wpisują się w nurt najnowszych badań dotyczących roli witaminy D.

b) poprawność formułowania problemów i hipotez (założeń badawczych).

Wiele badań populacyjnych wskazuje, że odpowiedni poziom witaminy D (>30 ng/mL 25(OH)D₃ w surowicy), obniża częstość występowania oraz hamuje rozwój szeregu nowotworów, w tym nowotworów gruczołu sutkowego. Co więcej, badania *in vitro* na liniach

komórkowych oraz *in vivo* na modelach zwierzęcych wskazują, że witamin D i jej pochodne mogą hamować rozwój komórek nowotworowych. Nie wiele jednak wiadomo o wpływie witaminy D na mikrośrodowisko guza. Przedstawiona rozprawa, jako główny problem badawczy stawia właśnie ocenę wpływu witamin D₃ oraz jej aktywnej formy 1,25(OH)₂D₃ na fenotyp oraz własności fibroblastów pochodzących z tkanki guza. Na stronie 41 rozprawy zawarte są główne cele pracy. I chociaż autorka, nie formułuje hipotezy badawczej, to w sposób systematyczny oraz wielokierunkowy wyznacza cele badawcze prowadzące do oceny wpływu witaminy D₃ na CAFs, a przez to na rozwój samych komórek nowotworowych. Należy zwrócić uwagę, na bardzo rozbudowany schemat doświadczeń oraz wielość zmiennych, które brane były pod uwagę.

c) *trafność doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętność ich zastosowania.*

W przedstawionych badania mgr **Natalia Łabędź** wykorzystwała dwa główne modele badawcze: **mysie modele raka gruczołu sutkowego**, oraz **ludzkie komórki raka gruczołu sutkowego**. Dobór ten jest bardzo trafny, gdyż badania z udziałem zwierzęta umożliwiły ocenę wpływu suplementacji witaminą D oraz podawania 1,25(OH)₂D₃ na CAFs w zależności od stopnia agresywności komórek nowotworowych. Do tego celu użyto trzy linie raka gruczołu sutkowego o różnym potencjale do przerzutowania. Natomiast wykorzystanie drugiego modelu, umożliwiło powiązanie poziomu 25(OH)D₃ u pacjentek, oraz innych parametrów klinicznych (wiek, stopień zaawansowania, czy obecność przerzutów) na aktywność ludzki CAFs izolowanych z guzów.

Autorka zaprezentowała w swojej rozprawie doktorskiej, szeroki wachlarz technik poczynając od oznaczeń histochemicznych (cytometrii przepływowej, mikroskopii fluorescencyjne oraz testów ELISA), biologii molekularnej (qPCR, mikromacierzy oraz oznaczania białek metodą Western Blot) oraz badań funkcjonalnych (prolifracja i mobilność komórek, tworzenia kolonii, czy testów aktywności metaloproteinaz). Warto zwrócić uwagę, że właściwe badania poprzedzone były bardzo skrupulatną i wieloetapową charakterystyką CAFs.

Na przeprowadzenie badań uzyskano odpowiednie zgody: Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach we Wrocławiu (zgoda nr 66/2018) oraz Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu (nr uchwały 603/2018 oraz 855/2019).

Warto zwrócić uwagę, że prezentowane w tej rozprawie wyniki częściowo zostały już poddane ocenie recenzentów i opublikowane w czasopismach *Nutrients* oraz *Cancers*. Jednak, uwagi na funkcję recenzenta mam kilka pytań i uwag dotyczących metodologii oraz prezentowania wyników:

- W pracy (strona 77) brakuje danych dotyczących poziomu metabolitów witaminy D₃ w osoczu zwierząt doświadczalnych. Być może nie były to oznaczenia wykonane przez autorkę, ale wydaje się być to istotne z punktu widzenia późniejszej analizy wyników.
- Wydaje mi się, że dla zrozumienia wpływu pochodnych witaminy D₃ na wzrost guzów warto byłoby również oznaczyć poziom wapnia i fosforanów we krwi badanych zwierząt, szczególnie w grupie suplementarnej 1,25(OH)₂D₃, aby wykluczyć, na przykład: efekt toksyczny.

- W pracy wykonano bardzo dokładną charakterystykę markerów fibroblastów, zarówno w komórkach CAFs, jak również w fibroblastach uzyskanych z tkanek niezmiennych nowotworowo. Dlaczego, tych wyników nie zaprezentowano razem?
- Warto wrócić uwagę, że porównania między grupami, które nie spełniają kryterium $p > 0.05$, nie powinny być umieszczane na wykresach, ani omawiane, chociaż tendencja jest widoczna.
- Rycina 24, oś Y oznaczono „względna ilość *Acta2*”, chodzi zapewne o względny poziom mRNA dla genu *Acta2*, lub w skrócie względny poziom mRNA *Acta2*.
- Jako jeden z wniosków wynikających z pracy, autorka podkreśla, że podanie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, obniża poziom metabolitów witaminy D w osoczu, co wpływa na własności zarówno CAFs, jak i komórek nowotworowych. Autorka nie bierze jednak pod uwagę, że podaje aktywną formę witaminy D_3 , o aktywności wielokrotnie wyższej niż oznaczaną w osoczu $25(\text{OH})\text{D}_3$. Co więcej, podanie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ najprawdopodobniej prowadzi do obniżenia tempa metabolizmu D_3 do $25(\text{OH})\text{D}_3$, a następnie do $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na zasadzie sprzężenia zwrotnego. Tak więc, aby w pełni ocenić wpływ metabolitów witaminy D_3 na badane procesy należałoby jeszcze oznaczyć poziom $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

d) poprawność układu pracy i struktury podziału treści.

Praca jest bardzo obszerna i ma klasyczny układ, zawiera dokładny spis treści, podzielony na szereg podpunktów; streszczenie w języku polskim i angielskim oraz drobiazgowy spis skrótów. Następnie umieszczony jest bardzo przydatny wstęp, systematycznie wprowadzający czytelnika w tematykę, poczynając od charakterystyki nowotworów gruczołu sutkowego. Dalsza część wstępu, poświęcona jest witaminie D i jej roli w zapobieganiu oraz terapii nowotworów, ze wskazaniem na nowotwory gruczołu piersiowego. Następnie autorka charakteryzuje rolę fibroblastów w warunkach fizjologicznych, w tkance nowotworowej oraz potencjalny wpływ witamin D na te komórki. Pewne wątpliwości budzi umieszczenie części wyników we wstępie (strona 23). Praca opiera się na dwóch głównych celach badawczych, które w zasadzie można potraktować, jako jeden - zgodny z tytułem rozprawy, tylko podzielony na szereg zadań badawczych. Prace wykonano na dwóch modelach doświadczalnych, to jest na myszach obciążonych rakiem gruczołu sutkowego oraz tkankach pobranych od pacjentek. Kolejny rozdział liczący 30 stron, opisuje bardzo drobiazgowo materiały i metody. Skrupulatność autorki i bardzo szczegółowy opis metodologiczny zapewne ułatwi powtórzenie doświadczeń, chociaż być może warto byłoby pomyśleć o pewnej standaryzacji podstawowych technik, takich jak Western Blot, czy qPCR. Oczywiście, recenzent zdaje sobie sprawę, z tego, że procedury były modyfikowane na potrzeby poszczególnych doświadczeń, ale zastosowanie tych samych procedur (odczynników) pozytywnie wpływa na powtarzalność uzyskiwanych wyników. W kolejnym rozdziale, umieszczone są bardzo dobrze opisane oraz zilustrowane wyniki prowadzonych badań. Z uwagi na ogromną ilość wykonanych oznaczeń oraz testów, praca zawiera również sześciostronicowe podsumowanie wyników. Dyskusja stanowi omówienie wyników w świetle współczesnej literatury oraz wcześniejszych badań zespołu **Pani Prof. Joanna Wietrzyk**. Wydaje mi się, że dla lepszego zrozumienia uzyskanych rezultatów, dyskusja mogłaby zawierać rysunek/schemat podsumowujący najważniejsze wyniki badań, podobnie jak to autorka uczyniła we wstępie oraz przy opisie metodyki. Pracę zawiera również imponującą

listę 305 cytowanych publikacji oraz spis rycin i tabel, który niestety nie zawiera numerów stron. W aneksie znajdującym się na końcu pracy umieszczono 12 dodatkowych rycin.

Na zakończenie chciałby podkreślić, że rozprawa doktorska **Pani mgr Natalia Łabędź** stanowi znaczący krok do zrozumienia plejotropowego działania witaminy D oraz interakcji komórek nowotworowych z komórkami podścieliska guza. Doktorantka dysponuje bardzo rozbudowanym warsztatem badawczy, a wykonanie opisanych doświadczeń wymagało ogromnego poświęcenia i skrupulatność. Tak, więc wszystkie sugestie i uwagi zawarte w przedstawionej recenzji, w żadnej mierze nie umniejszają dokonań doktorantki oraz wartości poznawczej prezentowanych badań.

3) wnioski końcowe.

Podsumowując, monografia mgr Natalii Łabędź oparta jest na dwóch publikacjach oraz bardzo obszernych badaniach na materiale ludzkim, które w bardzo dokładny sposób dokumentują zmiany zachodzące w fibroblastach izolowanych z guzów lub przerzutów raka gruczołu sutkowego pod wpływem witaminy D₃. Uzyskane wyniki przybliżają nas do zrozumienia mechanizmów odpowiedzialnych za proonkogenny fenotyp fibroblastów związanych z guzem, co może przyczynić się do opracowania nowych terapii, w tym terapii wykorzystujących witaminę D lub jej analogi. Na uwagę zasługują wszechstronne umiejętności autorki, takie jak: praca ze zwierzętami oraz na materiale klinicznym; wyprowadzanie linii pierwotnych; czy bogaty panel wykonanych oznaczeń z zastosowaniem najnowszych technik. Nie mam, więc wątpliwości, że przedstawiana do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018, poz. 1668 z późn. zm.), dlatego też pozwalam sobie przedstawić Wysokiej Radzie Naukowej Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, wniosek o dopuszczenie Pani mgr Natalii Łabędź do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

prof. dr hab. Michał Żmijewski

Katedra i Zakład Histologii
Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk, dnia 13.03.2023

Prof. dr hab. Michał Żmijewski