



UNIVERSITY
OF WARSAW

CeNT CENTRE
OF NEW
TECHNOLOGIES

Warszawa, 18.04.2024

dr hab. Agnieszka Kobiela, Prof. uczelni
Kierownik Laboratorium Biologii Molekularnej Nowotworów
Centrum Nowych Technologii,
Uniwersytetu Warszawskiego
S. Banacha 2c, pokój 03.42
02-097 Warszawa
tel: + 48 22 55 43 735
e-mail: a.kobiela@cent.uw.edu.pl

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Szostakowskiej-Rodzoś
p.t.: „Molekularna analiza oraz znaczenie kliniczne krążących komórek nowotworowych
(CTC) w zaawansowanym raku piersi zidentyfikowanych z zastosowaniem systemu
CytoTrack”
wykonanej pod kierunkiem dr. hab. Ewy Grzybowskiej
oraz promotora pomocniczego, dr Anny Fabisiwicz
z Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Państwowego Instytutu
Badawczego

Rozprawa doktorska pani mgr Małgorzaty Szostakowskiej-Rodzoś dotyczy ustalenia wartości klinicznej krążących komórek nowotworowych (CTCs) w zaawansowanym, luminalnym raku piersi oraz ich charakterystyka molekularna. Ocena i analiza molekularna CTCs może stanowić nieinwazyjny test dla wykrycia wczesnej fazy choroby, niemożliwej do rozpoznania za pomocą obecnie dostępnych narzędzi diagnostycznych. Obserwacja i analiza liczby i fenotypów CTC podczas leczenia powinna się także przyczynić do poprawy wyników leczenia chorych poprzez zastosowanie usprawnionego systemu diagnostyki oraz monitorowania terapii pacjentów, umożliwiającego w uzasadnionych przypadkach niezwłoczne wdrożenie leczenia lub jego zmianę. Profilowanie genetyczne CTCs może dać sposobność do wypracowania metod indywidualizacji terapii u chorych. Niestety nadal brakuje potwierdzonych klinicznie metod efektywnej izolacji CTC, oraz korelacji między ilością, fenotypem a progresją choroby, stąd podjęcie tej tematyki przez Doktorantkę jest w pełni uzasadnione. W trakcie swoich badań Pani Szostakowska-Rodzoś wykazała, że obecność ≥ 5 CTCs jest ważnym czynnikiem prognostycznym, pogarszającym rokowania pacjentek z luminalnym rakiem piersi, a rosnąca liczba CTC podczas leczenia zwiększała niekorzystny czynnik ryzyka. Ponadto rozpoznano, że

utrzymująca się niska liczba CTCs (<5 CTC) podczas leczenia jest pozytywnym czynnikiem prognostycznym dla pacjentek z zaawansowanym rakiem piersi z przerzutami. Odkrycia te mają ogromne znaczenie dla poprawy rokowania w przypadku raka piersi z przerzutami oraz mogą pomóc klinicystom w monitorowaniu pacjentów podczas leczenia systemowego. Ponadto Doktorantka opisała różnicę w ekspresji EpCAM między klastrami CTCs a pojedynczymi CTC. Co istotne pokazała, że wysoka heterogenność CTCs w statusie EpCAM podkreśla fenotypową plastyczność pojedynczych komórek. Wyniki tych badań mają duże znaczenie kliniczne jak również stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

Formalny opis rozprawy

Rozprawa liczy 109 stron maszynopisu, jest napisana w języku angielskim i ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. Rozpoczyna się streszczeniami w języku polskim i angielskim, po których następuje Wstęp (27 stron) podzielony na 6 podrozdziałów. Następnie wymienione są cztery główne cele pracy. Materiały w formie 4 podrozdziałów oraz Metodologia w formie 5 podrozdziałów liczy 11 stron. Wyniki (33 strony) są podzielone na 4 podrozdziały. Dyskusja liczy 3 strony, a po niej następuje jednostronicowe podsumowanie i materiały dodatkowe w postaci dwóch rycin i dwóch tabeli. Bibliografia zawiera 152 pozycje literaturowe.

Ocena merytoryczna

Rozdział zatytułowany „Wstęp” stanowi bardzo dobre przedstawienie aktualnego stanu wiedzy i wyczerpująco wprowadza do tematyki badań przedstawionych w rozprawie. Dobór i kolejność przedstawionych treści są logiczne i właściwe. Doktorantka omawia epidemiologię, czynniki ryzyka, diagnostykę, typy biologiczne nowotworów piersi oraz obecne sposoby leczenia, w tym terapię hormonalną. Następnie skupia się na progresji nowotworów piersi, podkreślając istotną rolę i opisując szczegółowo przejście epitlialno-mezenchymalne oraz fenomen wolnokrążących komórek nowotworowych oraz ich znaczenie w progresji nowotworu oraz możliwości ich wykorzystania w diagnostyce. Moja ocena Wstępu jest bardzo wysoka. Doktorantka bardzo jasno przedstawia problemy badawcze, zwracając szczególną uwagę na te elementy, które stały się podstawą do sformułowania celów pracy. Wstęp dowodzi bardzo dużej wiedzy Doktorantki oraz umiejętności korzystania i wyciągania wniosków z tej wiedzy.

Cele pracy, w postaci czterech zwięźle i klarownie opisanych celów, zostały poprawnie sformułowane i zrealizowane w trakcie badań. Obejmują one:

1. Optymalizację i ocenę współczynnika odzysku niezależnego od EpCAM systemu wykrywania CTC CytoTrack.
2. Analizę fenotypu i genotypu pojedynczych CTC i klastrów CTC wykrytych za pomocą systemu CytoTrack.
3. Ocenę wartości prognostycznej CTC i zmian liczby CTC w trakcie leczenia.
4. Analizę heterogenności CTC u pojedynczych pacjentów oraz między pacjentami.

Metodologia zawiera zwięzły, lecz całościowy opis technik wykorzystywanych w rozprawie i obejmuje wachlarz metod biologii molekularnej i biologii komórki, takich jak hodowla komórkowa, barwienie immunofluorescencyjne, analiza pojedynczych komórek, sekwencjonowanie czy też izolacja DNA z preparatów parafinowych. Na szczególną uwagę zasługuje opis metodologii związanej z użyciem CytoTrack.

W rozdziale **Wyniki** opisano logiczny i spójny ciąg doświadczeń służący realizacji założonych celów, a uzyskane rezultaty przedstawiono na 14 rycinach i w 12 tabelach. W toku badań Doktorantka w przekonujący sposób udokumentowała optymalizację analizy CTC przy użyciu CytoTrack. Zoptymalizowała nowatorską, niezależną od EpCAM metodę wykrywania CTC. Średni współczynnik odzysku dla tej metody w tych badaniach wynosił ~79% przy bardzo wysokiej swoistości, ponieważ Doktorantka potwierdziła, że nie zidentyfikowała żadnych wyników fałszywie dodatnich w kontrolach ujemnych od zdrowych dawców.

Co jest kluczowe, użycie metody CytoTrack pozwoliło na wykazanie różnicy w ekspresji EpCAM pomiędzy klastrami CTC a pojedynczymi CTC. Wysoka heterogeniczność CTC jeśli chodzi o status EpCAM podkreśla wysoką plastyczność pojedynczych komórek wolnokrążących we krwi. Doktorantka wykazała również, że wartość prognostyczna dużej liczby CTC (≥ 5 CTC) utrzymywała się w okresie obserwacji, co więcej, za niekorzystny czynnik ryzyka uznano także rosnącą liczbę CTC podczas leczenia. Poza tym stały niski poziom liczby CTC (< 5 CTC) podczas leczenia został zidentyfikowany jako dobry czynnik prognostyczny w przerzutowym raku piersi. Dodatkowo Doktorantka potwierdziła dużą heterogenność genomową krążących komórek nowotworowych, wyniki tego badania podkreślają użyteczność kliniczną wykrywania i zliczania CTC podczas leczenia przerzutów chorych na raka piersi.

Odkrycia te mają istotne znaczenie kliniczne ponieważ opracowanie testów w postaci biopsji do nieinwazyjnego monitorowania chorych za pomocą biopsji płynnych pozwoli na skuteczną

diagnostykę oraz monitorowanie postępu choroby nowotworowej w czasie leczenia jak również odpowiednie dobranie metod leczenia. CTC w raku piersi wykazują znaczną plastyczność fenotypową dlatego dotychczasowe stosowanie markerów takich jak epithelialny EPCAM, powoduje, że część CTC z próbek pacjentów pozostaje niewykryta i postęp choroby i wskazanie do terapii może być mylnie oceniony. Dlatego badania przedstawione w doktoracie przyczynią się do rozwoju testów diagnostycznych niezależnych od EPCAM.

„Dyskusja” zawiera podsumowanie uzyskanych wyników w odniesieniu do danych literaturowych. Dyskusja jest stosunkowo krótka ale wskazuje niewątpliwie, iż Doktorantka posiada umiejętność krytycznej i wyważonej oceny uzyskanych wyników oraz formułowania wniosków końcowych a także biegle porusza się w dostępnej w swoim obszarze badań literaturze.

Rozprawę zamykają przedstawione w formie opisowej wnioski, które są poprawnie i zwięźle sformułowane.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Praca jest napisana starannie i przejrzysto, jedynie rozkład rycin, czy ujednolicenie opisów wykresów byłoby wskazane przed złożeniem wyników do publikacji. Doktorantka nie ustrzegła się kilku błędów literowych, co w żaden sposób nie umniejsza pracy.

Najważniejsze uwagi i pytania:

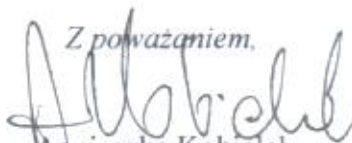
1. Ponieważ wyniki badań nie zostały jeszcze opublikowane, trudno określić udział poszczególnych autorów, proszę o szczegółowe wyjaśnienie, które eksperymenty zostały wykonane niezależnie przez Doktorantkę.
2. Jakie są możliwości techniczne wykorzystania systemu CytoTrack i izolacji materiału z pojedynczych CTC do wykonania analizy sekwencjonowania całego transkryptomu?
3. W badaniach heterogenności EPCAM wśród CTCs na podstawie ilości EPCAM/pankeratyny, wykazano, że 44% CTC posiadało niską ekspresję EPCAM, tylko 0,5% nie ekspresjonowało EPCAM (więc 55,5% posiadało wysoką ekspresję EPCAM ryc. 11). Na podstawie tych wyników wydaje się, że CellSearch system wyłapujący CTC na podstawie ekspresji EPCAM powinien być wystarczający aby wyłapać 99,5% CTC?
4. Jaką rolę według Doktorantki może odgrywać wysoka ekspresja EPCAM umożliwiająca tworzenie klastrów CTC w rozwoju choroby z przerzutami?

Niedociągnięcia edytorskie nie wymagające odniesienia się w czasie rozprawy:

Graficznie, niektóre ryciny wymagają dopracowania. Czasami pojawia się na jednej pustej stronie pojedynczy wykres z dużymi opisami (np. ryc. 10), natomiast na innej rycinie (np. ryc. 14) ułożone gęsto wykresy mają tak małą czcionkę, że uniemożliwia to odczytanie danych.

Podsumowanie

Na podstawie przedstawionej rozprawy uważam, że pani mgr Małgorzata Szostakowska-Rodzoś wykazała się szeroką wiedzą teoretyczną w tematyce swoich badań, umiejętnościami zaplanowania i wykonania doświadczeń realizując założone cele oraz zdolnością do prawidłowego wyciągania wniosków z przeprowadzonych eksperymentów. Efektem badań Doktorantki są bardzo istotne z punktu klinicznego dane, które mogą poprawić diagnostykę raka piersi. Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wymogi określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.) oraz Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1669 z późn. zm.). Wnoszę do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie - Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie mgr Małgorzaty Szostakowskiej-Rodzoś do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,

Agnieszka Kobiela