



Instytut Biochemii i Biofizyki
Polskiej Akademii Nauk

Pawińskiego 5a; 02-106 Warszawa; tel: +48 22 592 21 45; fax: + 48 22 592 21 90; e-mail: secretariate@ibb.waw.pl; <http://www.ibb.waw.pl>

Dr hab. Elżbieta Speina
Tel.: +48 22 592 3023
e-mail: elasp@ibb.waw.pl

Warszawa, 19.03.2024

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Szostakowskiej-Rodzoś

pt. **Molecular analysis and clinical value of circulating tumor cells (CTCs) identified via CytoTrack system in metastatic breast cancer patients**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana w Zakładzie Onkologii Molekularnej i Translacyjnej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie. Promotorem rozprawy jest prof. dr hab. Ewa Grzybowska a promotorem pomocniczym dr Anna Fabisiewicz.

A) Znaczenie i oryginalność tematu naukowego

Choroby nowotworowe są drugą najczęstszą przyczyną zgonów na świecie, a rak piersi stanowi 1/4 wszystkich nowotworów u kobiet. Ponieważ ta złożona heterogenna choroba często wiąże się z obecnością różnych zmian genomowych i epigenetycznych, stanowi ona wyzwanie zarówno dla naukowców, jak i klinicystów. Duża część nowotworów piersi, w tym rak luminalny, ma mutacje w genach kinaz białkowych aktywowanych mitogenami (MAPK). Ścieżka sygnałowa inicjowana przez te kinazy odgrywa centralną rolę w regulacji proliferacji. Większość ostatnio odkrytych terapii celowanych hamuje znane mechanizmy onkogenne inicjacji i progresji raka piersi, takie jak kaskada sygnałowa MAPK, PI3K/AKT-mTOR lub VEGF. Pomimo znacznych postępów w badaniach molekularnych oraz zastosowaniu terapii celowanych w powiązaniu z klasyczną radio- i chemoterapią, nadal brakuje nowoczesnych metod monitorowania pacjentek podczas terapii pod kątem pojawiania się w ich krwi obwodowej tzw. krążących komórek nowotworowych (ang. *circulating cancer cells*, CTC), które mogłyby stać się markerem efektywności leczenia oraz pojawiania się przerzutów w odległych tkankach, takich jak kości, wątroba, płuca czy mózg.

Oceniany tu projekt pracy doktorskiej próbuje wypełnić ten brak, podejmując badania nad opracowaniem nowatorskich metod bezinwazyjnego obrazowania pojawiających się we krwi komórek neoplastycznych. Standaryzacja takiej metody obrazowania mogłaby stać się bezcennym narzędziem w rękach klinicystów; pozwoliłaby ona określić czy podjęte strategie terapeutyczne przynoszą pożądane efekty i oszacować ewentualny czas przeżycia pacjentek. Ponadto zaprezentowane wielkoskalowe badania molekularne na poziomie pojedynczych komórek CTC i ich klasterów umożliwiły określenie pojawiających się zmian w kluczowych kaskadach sygnałowych oraz odkrycie nowych, nieopisanych dotąd mutacji w genach *ESR1* i *AKT2*, związanych z progresją nowotworu, co poszerza dotychczasową wiedzę i może przyczynić się do opracowania nowych strategii terapeutycznych.

B) Znaczenie wyników

Głównym rezultatem badań było opracowanie i optymalizacja nowatorskiego systemu obrazowania krążących komórek nowotworowych w aspekcie monitorowania pacjentek z rakiem piersi oraz scharakteryzowanie fenotypu i genotypu CTC, zarówno na poziomie pojedynczych komórek, jak i ich zgrupowań, a także ich zmienności, pod kątem zastosowania w praktyce klinicznej. Wykorzystując znane i stosowane już metody obrazowania doprowadzono tu do opracowania nowego, niezależnego od ekspresji EpCAM systemu CytoTrack. System ten zastosowano do zbadania grupy 90 pacjentek ze zdiagnozowanym zarówno pierwotnym rakiem piersi, jak i odległym przerzutem/przerzutami. Obrazowano, a następnie dogłębnie analizowano pod względem molekularnym CTC, pobierając krew w regularnych odstępach czasu i porównując otrzymane dane z czasem przeżycia pacjentek oraz progresją nowotworową. Uzyskane wyniki pokazały, że stworzony system cechuje się bardzo wysoką powtarzalnością i pozwala na rokowanie co do oczekiwanego całkowitego czasu przeżycia, jak i przeżycia wolnego od progresji. Może też dostarczyć informacji czy podjęto właściwą strategię terapeutyczną.

Wyniki tej pracy są wysokiej jakości. Przewiduję, że zostaną opublikowane w wysoko ocenianym czasopiśmie. Ponadto jestem przekonana, iż uzyskane dane będą stanowiły duży krok naprzód w tej dziedzinie i, mam nadzieję, będą kontynuowane aż do wprowadzenia do codziennej praktyki klinicznej nowatorskich metod obrazowania, takich jak zaprezentowana metoda CytoTrack w celu kompleksowego monitorowania pacjentów nowotworowych podczas stosowanych terapii.

C) Metodologia

Rozprawa napisana jest w języku angielskim, przejrzysta i poprawna. Manuskrypt liczący 109 stron zawiera wszystkie elementy typowe dla pracy doktorskiej: wstęp, cele, wyniki, dyskusję i szczegółową metodologię. Cytowana literatura stanowi solidną podstawę badanej i omawianej tematyki – zacytowano ponad 150 publikacji.

- Wprowadzenie jest dobrze skomponowane, zapewnia przegląd wiedzy na temat epidemiologii, diagnozowania i leczenia nowotworów, ze szczególnym uwzględnieniem tych aspektów molekularnych, które są najbardziej istotne dla celów pracy, takich jak współczesna wiedza na temat zmian genetycznych i rozregulowanych szlaków metabolicznych w raku piersi oraz przedstawieniem najnowszych, w tym ukierunkowanych, terapii. Omówiono też narastanie oporności, w tym epigenetycznej, komórek nowotworowych na stosowane leki. Ważną część Wstępu stanowi szczegółowo opisane zjawisko pojawiania się we krwi obwodowej pacjentów nowotworowych tzw. krążących komórek nowotworowych (ang. *circulating tumor cells*, CTC) oraz stosowane współcześnie, w tym zatwierdzone przez FDA, metody ich wykrywania i charakteryzowania, w tym analizy molekularnej na poziomie pojedynczej komórki. Tekst został wsparty dobrze dobranymi i przygotowanymi ilustracjami oraz tabelami. Cytowana literatura jest adekwatna do opisywanej tematyki.
- Zaproponowane cele badawcze, ujęte w cztery zwarte punkty, zostały dobrze określone i są spójne z istniejącym stanem wiedzy w badanej dziedzinie.
- Sekcja Materiały i Metody uwzględnia wszystkie niezbędne szczegóły, które z pewnością będą pomocne dla zainteresowanych kontynuacją badań nad tematyką zaprezentowaną w tej pracy.
- Podjęte doświadczenia w celu udzielenia odpowiedzi na pytania naukowe, które pojawiły się podczas badań, zostały starannie zaprojektowane i wykonane przy użyciu skutecznych podejść z wykorzystaniem zaawansowanych technik molekularnych i bardzo wnikliwej statystycznej analizy danych za pomocą odpowiednio dobranych testów. Dane są ilustrowane dobrze dopracowanymi tabelami, wykresami i obrazami. Walidacja wyników została przeprowadzona prawidłowo.
- Sekcja Dyskusji, choć kompaktowa, jest umiejętnie poprowadzona i poparta literaturą przedmiotu; świadczy o dobrej znajomości tematu przez Autorkę.

- Wnioski kończące pracę zawierają najważniejsze refleksje płynące z ocenianej tu rozprawy. Manuskrypt uzupełnia materiał dodatkowy w postaci Aneksu prezentującego zidentyfikowane mutacje i polimorfizmy, zarówno w CTC jaki i guzach pierwotnych.

D) Pytania i uwagi

Po przeanalizowaniu rozprawy, myślę, że jest kilka interesujących kwestii, które mogą zasługiwać na dalsze omówienie podczas obrony pracy doktorskiej.

- a) Czy w polskich ośrodkach leczenia nowotworów stosuje się już techniki obrazowania CTC zaaprobowane przez FDA, typu CellSearch i Parsortix? Czy system CytoTrack, niezależny od ekspresji EpCAM może wejść do praktyki klinicznej? Jeśli tak to w jakim przedziale czasowym można by się tego spodziewać?
- b) Dlaczego grupę pacjentek zdecydowano się podzielić na dwie podgrupy, tzn. poniżej i powyżej 65 roku życia. W przeprowadzonych następnie analizach nie dostrzegłam stratyfikacji ze względu na wiek. Jeśli różnice nie wyszły istotne statystycznie, to dobrze byłoby o tym wspomnieć. Prosiłabym o ustosunkowanie się do tej kwestii.
- c) Na stronie 60, Graph 3, przedstawione są pojawiające się w krwi pacjentek CTC z trzech kolejnych pobrań. Ciekawa jestem czy różnice pomiędzy procentami tych komórek były istotne statystycznie?
- d) Nie do końca jest dla mnie jasne, dlaczego zdecydowano się wybrać do badań wyłącznie pacjentki ze zdiagnozowanym przerzutem/przerzutami. Było to jedno z kryteriów przy ich rekrutacji. Wydaje mi się, że włączenie pacjentek bez przerzutów mogłoby pokazać czy w ich krwi pojawiają się krążące komórki nowotworowe, co z kolei mogłoby prognozować pojawienie się metastazy i kierować je lub nie do dalszego intensywnego leczenia.
- e) Na stronie 59, Doktorantka napisała, że krew do analiz pobrano tylko od 90 pacjentek z grupy 135. Skąd taka rozbieżność. Czy pacjentki zmarły po pierwszej obserwacji?
- f) Jaka jest różnica pomiędzy OS a PFS? Myślę, że różnica ta nie do końca jest jasna dla osób niebędących klinicystami bądź naukowcami związanymi z badaniami klinicznymi. Poprosiłabym o dokładniejsze scharakteryzowanie obu terminów wraz z podkreśleniem różnic.
- g) Strona 75, Graph 11 powinien być opisany po 10 lub przedstawiony wcześniej.
- h) Strona 78, Na wykresie opisanym jako Graph 12, nie ma oznaczenia „A”, które pojawia się w opisie pod nim.

- i) Strona 80, Graph 14 E i F, opisy pod obrazkami są trudne do odczytania. Powinny zostać powiększone.
- j) Strona 88, Ciekawa jestem, jakiego typu są nowe mutacje znalezione przez Autorkę w genach *ESR1* i *AKT2*.

E) Ocena końcowa

Oceniana przeze mnie praca odznacza się wysoką jakością, zarówno pod względem merytorycznym, jak i metodologicznym. Biorąc pod uwagę zainteresowanie nowymi metodami diagnozowania i monitorowania krążących we krwi obwodowej komórek nowotworowych oraz mutacji w nich zachodzących, uważam wybór problemu badawczego za w pełni uzasadniony, a wyniki uzyskane przez Panią Małgorzatę Szostakowską-Rodzoś za nowatorskie i mogące przybliżyć onkologów do zastosowania systemu CytoTrack w standardowej praktyce klinicznej. Ponadto, rezultaty badań przynoszą nowe ustalenia w zakresie mechanizmów molekularnych uczestniczących w powstawaniu przerzutów u pacjentek z zaawansowanym rakiem piersi. Chciałabym podkreślić, że interpretacja wyników jest rzeczowa, pozbawiona nadinterpretacji, co wskazuje na krytyczne podejście do otrzymanych danych oraz dojrzałość naukową Doktorantki. Na tej podstawie **stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1688).** Przedkładam zatem wniosek do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie o jej przyjęcie i dopuszczenie Pani mgr Małgorzaty Szostakowskiej-Rodzoś do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową pracy, na co składają się istotność tematyki oraz nowatorskie wyniki, a także opublikowany w doskonałych czasopismach dorobek naukowy, **wnioskuję do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie o wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej.**

Elżbieta Spejke