



Prof. dr hab. Anna Żaczek
Zakład Onkologii Translacyjnej
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

Gdańsk 19.04.2024

RECENZJA PRACY 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”* (Molekularna analiza oraz znaczenie kliniczne krążących komórek nowotworowych (CTCs) w zaawansowanym raku piersi zidentyfikowanych z zastosowaniem systemu CytoTrack) wykonanej pod kierunkiem dr hab. Ewy Grzybowskiej (promotor) i dr Anny Fabisiewicz (promotor pomocniczy) w Narodowym Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie.

Przedstawiona do recenzji praca dotyczy badania roli krążących komórek nowotworowych (CTCs) w zaawansowanym luminalnym raku piersi. Luminalny rak piersi jest najczęściej diagnozowanym podtypem raka piersi, charakteryzującym się najlepszym rokowaniem. Jednakże u około 40% chorych pojawiają się przerzuty odległe, znacząco pogarszające rokowanie. Stąd wykrycie wczesnych oznak progresji choroby, nim rozwiną się widoczne kliniczne przerzuty, wydaje się być niezwykle istotne. Jednym z narzędzi, które bada się pod tym kątem, są krążące komórki nowotworowe (CTCs), których wiarygodna detekcja i profilowanie wciąż stanowi wyzwanie diagnostyczne. Dlatego podjęcie tematu wykorzystania CTCs jako narzędzia monitorowania odpowiedzi na leczenie uważam za jak najbardziej zasadne i ciekawe. Zaplanowane i przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej analizy są ważne zarówno z poznawczego, jak i klinicznego punktu widzenia. Poszerzają wiedzę na temat charakterystyki molekularnej CTCs, jak również wskazują na ich istotne znaczenie prognostyczne przed, jak i w trakcie leczenia w zaawansowanym, luminalnym raku piersi.

Oceniając stronę formalną pracy, rozprawę stanowi przygotowane w języku angielskim opracowanie liczące 109 stron. Układ pracy jest typowy dla dysertacji doktorskich w zakresie nauk eksperymentalnych. Praca obejmuje: streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz

skrótów, spis treści, wstęp, cel pracy, materiały, metody, wyniki, dyskusję, wnioski, bibliografię oraz materiały dodatkowe. Z technicznego punktu widzenia rozprawa przygotowana jest dość starannie; tekst jest napisany w miarę poprawnie, błędów i literówek jest niewiele. Posiada czytelną oprawę graficzną i dobrze opracowane ryciny, choć niestety niektóre po wydrukowaniu słabej jakości (zwłaszcza zdjęcia CTC). Układ pracy jest logiczny. Natomiast zastrzeżenia, w moim odczuciu, budzi znacząca dysproporcja między nadmiernie rozbudowanym wstępem, liczącym 27 stron a skromną dyskusją, zajmującą 3 strony.

Przechodząc do oceny merytorycznej, rozbudowany **Wstęp** szczegółowo przedstawia epidemiologię, czynniki ryzyka, sposób diagnozowania i leczenia raka piersi, jak również założenia stosowanej terapii endokrynną, wybrane mechanizmy oporności na hormonoterapię, wybrane aspekty progresji luminalnego raka piersi, w tym opis CTC oraz sposoby analizy pojedynczych komórek. Dobrze wprowadza w tematykę badań, uzasadniając celowość ich podjęcia. Niemniej jednak, niedosyt pozostawia dość skromne dwustronicowe omówienie CTCs, stanowiących istotę rozprawy doktorskiej. Zabrakło mi również rzetelnego porównania metod detekcji i analizy CTCs, w szczególności przedstawiającego wady i zalety stosowanego systemu CytoTrack na tle innych dostępnych metod. Natomiast nadmiarowe wydają się niektóre tabele (np. Tabela 1), które nawet nie są omawiane w tekście. Autorka nie wystrzegła się też pewnych błędów czy przeoczeń. Według mnie, np. Tabela 2 przedstawiająca podtypy molekularne raka piersi identyfikowane w oparciu o IHC, powinna zawierać podtyp potrójnie negatywny a nie bazalny. Warto by również w klasyfikacji uwzględnić Ki67. Wydaje mi się, że dane na wykresie pierwszym przedstawiają zachorowalność i śmiertelność z powodu ogółu nowotworów i ogółu raka piersi w Polsce, a nie tylko z powodu przerzutowego raka piersi, jak sugeruje tekst doktoratu? Zaintrygowało mnie stwierdzenie, że progresja równoległa wiąże się z pasywnym złuszczeniem komórek (*passive shedding*), a progresja liniowa z aktywnym wyjściem komórek z guza dzięki procesowi EMT (str 33). Czy rzeczywiście tak musi być zawsze?

Cel pracy określony jest dość jednoznacznie i wystarczająco, choć brzmi nieco inaczej w streszczeniu pracy i rozdziale „Cele pracy”. Głównym zamierzeniem badawczym, według Streszczenia, było ustalenie wartości klinicznej CTCs w zaawansowanym luminalnym raku piersi oraz ich charakterystyka molekularna. Dalej, w rozdziale „Cele pracy” zostało to doprecyzowane i przedstawione w postaci 4 celów szczegółowych: i) optymalizacja i ocena przydatności niezależnej od EpCAM metody detekcji opartej o system CytoTrack; ii) analiza fenotypu i genotypu pojedynczych CTCs i klastrów CTC; iii) estymacja wartości prognostycznej CTC i zmian liczby CTC podczas leczenia; iv) analiza heterogenności CTCs.

Rozdział **Materiały** liczy 3 strony. Został przygotowany starannie i szczegółowo. Szczególnie doceniam graf czytelnie przedstawiający kryteria włączenia próbek chorych do finalnej analizy (Graph 2). Zabrakło mi natomiast w tej sekcji pokazania, dla ilu pacjentów pobrano próbki w kolejnych punktach czasowych oraz wskazania, dla ilu były dostępne guzy pierwotne. Nie jest też jasne, kiedy były pobierane fragmenty guza (przed czy po leczeniu systemowym).

Kolejny 8-stronicowy rozdział opisuje **metody** stosowane w pracy. Były to hodowla komórek jednej linii komórkowej MCF7 *in vitro*, analiza CytoTrack wraz z analizą ekspresji EpCAM, pozyskanie pojedynczych komórek na drodze mikromanipulacji i ich sekwencjonowanie metodą NGS, jak również klasyczne sekwencjonowanie fragmentów genów *ESR1* i *PIK3CA* w materiale pozyskanym z blozków FFPE. Metody były dobrze dobrane w stosunku do zaplanowanych celów, a skuteczne wykonanie tak wyrafinowanych analiz jak analizy genomu pojedynczych komórek potwierdza dobre przygotowanie Doktorantki do samodzielnej pracy naukowej. Do tej części mam następujące pytania:

- Cemu przeprowadzono blokowanie po barwieniu, a nie zwyczajowo przed (*stained cells were washed two times with blocking buffer*)?
- Na jakiej podstawie wybrano wielkość komórek ze średnicą $\geq 6\mu\text{m}$ jako kryterium klasyfikujące dla CTCs ?
- Na jakiej podstawie uznano za kryterium klasyfikujące klastry 3 komórki (a nie zwyczajowe 2)?

Wysoko oceniam część pracy prezentującą **Wyniki**. Rozdział ten liczy 33 strony i stanowi najważniejszą część pracy. Co szczególnie warto podkreślić, udało się pozyskać wyjątkową kolekcję materiału klinicznego wraz z dobrej jakości follow-upem, w tym 66 pojedynczych CTC poddanych sekwencjonowaniu NGS. Zoptymalizowano metodę detekcji CTCs, uzyskując bardzo wysoki poziom odzysku komórek (*recovery ratio*) na poziomie średnio 79%. Pokazano znaczenie prognostyczne obecności (powyżej 5) CTCs w zaawansowanym luminalnym raku piersi, co jest zgodne z wcześniej opublikowanymi danymi. Zademonstrowano również, że utrzymująca się niska liczba CTCs (<5 CTC) podczas leczenia jest pozytywnym czynnikiem. Co więcej, opisano różnicę w ekspresji EpCAM między klastrami CTCs a pojedynczymi CTC. Dodatkowo potwierdzono dużą heterogenność na poziomie genomu (w obrębie genów *AKT1*, *AKT2*, *ESR1*, *ESR2*, *GATA3*, *PIK3CA*, *TP53*) pojedynczych CTCs. W nawiązaniu do tej części pracy nasuwają mi się następujące pytania:

- Cemu w opisie grupy badanej (Tabela 9) pojawia się dość liczna grupa M0 (86 chorych), skoro kryterium włączenia była obecność przerzutów odległych?
- Jakie fenotypy EMT może wychwytywać opracowana oparta o pan-CK metody?
- Proszę o przedyskutowanie stosunkowo niskiego odsetka wykrycia próbek CTC+ (ok 32,5%) w przerzutowym raku piersi, zwłaszcza w kontekście stosowania metody EpCAM-niezależnej.
- Jak wyglądałby OS i PFS w różnych punktach czasowych pobrań dla CTC definiowanych jako CK+ i/lub EpCAM+/CD45-?
- Czy można by pokazać osobno zmiany poziomu EpCAM i panCK dla chorych uwzględnionych na Grafie 13?
- Czy jest korelacja liczby CTCs z liczbą miejsc przerzutowania? Czy rodzaj stosowanej terapii wpływa na liczbę CTCs?
- Cemu w analizach genomu komórek nowotworowych nie uwzględniono analizy germinacyjnego DNA?

Dodatkowe uwagi:

- W Tabeli 9 warto by oprócz liczb pacjentek w poszczególnych podgrupach pokazać również procenty
- Graph 3 w części B nie prezentuje odsetka klastrow u pacjentów CTC- pozytywnych, na co wskazuje opis do figury, a odsetek w całej grupie pacjentów
- Graph 4 – pierwszy panel z lewej strony nie przedstawia pojedynczej CTC, a raczej grupę komórek. Brakuje barwienia DAPI i oznaczenia skali
- Tabele 11 i 12 przedstawiające wyniki modelu regresji Coxa są słabo czytelne. Warto by przed publikacją dopracować stronę graficzną
- Tytuły grafów 11 i 13 nie oddają tego, co na nich zaprezentowane. Przykładowo Graf 13 ma przedstawiać zmiany poziomu EpCAM (EpCAM changes). Tymczasem prezentuje stosunek poziomu EpCAM do CK.

Na koniec w **Dyskusji** Autorka dyskutuje wyniki własne na tle danych literaturowych. Ta część pracy jest za krótka i zostawiła u mnie spory niedosyt. Przy takiej ilości uzyskanych i możliwych do uzyskania danych warto byłoby szerzej odnieść się do stanu wiedzy, niezwykle dynamicznie zmieniającego się w dziedzinie krążących komórek nowotworowych i analiz pojedynczych komórek. Warto by również wskazać, na czym w opinii Autorki polega nowość uzyskanych przez nią wyników.

Przetawione wyżej uchybienia i nieścisłości nie obniżają wartości naukowej pracy. Cele pracy zostały z powodzeniem zrealizowane. Należy podkreślić, że tematyka badań podjęta w pracy doktorskiej jest jak najbardziej istotna i aktualna, a uzyskane wyniki dostarczają nowych danych o znaczeniu klinicznym krążących komórek nowotworowych w przerzutowym raku piersi. Podsumowując, stwierdzam, że uzyskane wyniki stanowią ważne naukowo osiągnięcie, a Autorka rozwiązała postawiony problem badawczy i potrafiła poprawnie przedstawić efekty swojej pracy w rozprawie doktorskiej. Wykazała się wiedzą, umiejętnym wykorzystaniem technik biologii molekularnej i analizy statystycznej oraz bioinformatycznej, a także umiejętnością prezentacji, interpretacji i dyskusji uzyskanych wyników. Stwierdzam, że przedstawiona rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). Dlatego wnoszę do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr Małgorzaty Szostakowskiej-Rodzoś do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Zakład Onkologii Translacyjnej
Gdański Uniwersytet Medyczny
prof. dr hab. Anna Żaczek



Kierownik