



WARSZAWSKI
UNIwersYTET
MEDYCZNY

KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII

dr hab. n. med. Małgorzata Czystowska-Kuźmicz

Warszawa, 25.06.2025

Katedra i zakład Biochemii

Warszawski Uniwersytet Medyczny

ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

mzczystowska@wum.edu.pl

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Anety Żebrowskiej pt.: „Characteristics of proteome of small Extracellular Vesicles isolated from melanoma patients plasma.” zrealizowanej w Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów im. Profesora Mieczysława Chorażego w Gliwicach pod kierunkiem dr hab. n. med. Moniki Pietrowskiej

Pilnym, wciąż nierozwiązanym problemem klinicznym w terapii czerniaka jest rozwój oporności komórek nowotworu na leczenie adjuwantowe inhibitorami immunologicznych punktów kontrolnych lub inhibitorami BRAF lub MEK i brak markerów predykcyjnych dla tych kosztownych terapii molekularnych. W ostatnich latach liczne badania wskazują na to, że małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (sEV) znajdujące się w osoczu pacjentów z czerniakiem, mogą jako tzw. „płynna biopsja guza” być źródłem takich biomarkerów diagnostycznych czy też umożliwiających monitorowanie progresji czerniaka lub odpowiedzi na terapię. Znaczna część sEV znajdujących się w osoczu pacjentów pochodzi z komórek

czerniaka (MTEX), które za ich pomocą kształtują mikrośrodowisko guza na swoją korzyść a także prowadzą do zmian systemowych wspierających dalszy wzrost guza, np. wpływając na fenotyp i funkcje komórek odpornościowych. Stąd też poznanie składu molekularnego MTEX, co stanowi cel pracy przedłożonej pracy doktorskiej, pozwoli na lepsze zrozumienie mechanizmów promujących rozwój czerniaka jak i determinujących odpowiedź na terapię. Dzięki zastosowaniu w pracy specyficznej metody izolacji sEV polegającej na wychwycie immunologicznym MTEX za pomocą przeciwciała rozpoznającego antygen komórek czerniaka CSPG4, doktorantce udało się przezwyciężyć jedną z podstawowych trudności analizy sEV z próbek biologicznych, polegającej na wysokiej heterogeniczności sEV z osoczu, które obok MTEX zawierają także pęcherzyki ze zdrowych tkanek oraz krążących we krwi komórek odpornościowych. Tym sposobem doktorantka uzyskała dwie oddzielne populacje sEVs – sEVs pochodzących z komórek czerniaka oraz sEVs pochodzące z komórek niezłośliwych (NMTEX) i oceniła ich skład białkowy za pomocą techniki wysokorozdzielczej spektrometrii mas sprzężonej z nano-chromatografią cieczową (nano-LC-MS/MS). Dużym atutem przedstawionej pracy jest w mojej ocenie to, że Doktorantka nie ograniczyła się tylko do analizy proteomicznej sEVs pochodzących z komórek czerniaka, lecz rozszerzyła ją także na sEVs pochodzących od limfocytów, stosując taką samą metodę ich wychwyty immunologicznego za pomocą przeciwciała anti-CD3. Doktorantka wykazała, że metoda wychwytywania sEVs z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał jest skuteczna w badaniu składu molekularnego wybranych subpopulacji małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych obecnych w płynach ustrojowych. W starannie zdefiniowanej i przeprowadzonej analizie statystycznej uzyskanych wyników analizy proteomicznej Doktorantka zidentyfikowała szereg białek które odróżniały MTEX od NMTEX oraz pacjentów z progresją choroby od pacjentów bez objawów choroby po zastosowanej terapii. Ponadto Doktorantka wykazała, że profil białkowy limfocytarnych sEVs CD3(+) pacjentów z czerniakiem różni się od profilu osób zdrowych, co potwierdza obserwowany systemowy wpływ nowotworu na profil komórek immunologicznych.

Praca wpisuje się w aktualny i bardzo dynamicznie rozwijający się nurt badań z pogranicza biologii komórki, proteomiki oraz onkologii molekularnej. W kontekście rosnącego zainteresowania tzw. „płynną biopsją” (ang. liquid biopsy) oraz wykorzystania sEV jako nieinwazyjnego źródła informacji biologicznej, temat podjęty przez Doktorantkę uznać

należy za bardzo aktualny, oryginalny i posiadający istotne znaczenie zarówno poznawcze, jak i potencjalnie aplikacyjne.

I. Struktura pracy i sposób prezentacji wyników

Rozprawa mgr Anety Zebrowskiej jest klasyczną dysertacją i jest dosyć obszerna, licząc 137 stron. Została napisana w sposób logiczny, przejrzysty i z zachowaniem wysokiej kultury językowej. Pod względem edytorskim praca jest przygotowana bardzo starannie i estetycznie, zawiera bardzo nieliczne i drobne błędy edytorskie które nie umniejszają w żaden sposób wysokiej jakości rozprawy. Grafiki są dobrze zaplanowane i z niewielkimi wyjątkami jasno i przejrzysto prezentują uzyskane wyniki. Wszystko to sprawia, że pracę czyta się z dużą przyjemnością, jasno podążając za tokiem prezentacji danych przez Doktorantkę. Praca składa się z klasycznych części: wprowadzenia, przeglądu literatury, celów badawczych, części metodycznej, wyników, dyskusji i wniosków końcowych. Praca doktorska kończy się rozdziałem obejmującym spis piśmiennictwa liczącego 208 pozycji, listą osiągnięć naukowych Doktorantki obejmujący publikacje, doniesienia konferencyjne oraz udział w projektach oraz suplementem zawierającym wspomniane wyżej publikacje Doktorantki obejmujące 3 prace oryginalne i 2 prace przeglądowe.

II. Ocena merytoryczna

Część teoretyczna w rozdziale **Wstęp** (przegląd literatury) jest obszerna i dobrze udokumentowana, a autorka wykazuje się bardzo dobrą orientacją w aktualnym stanie wiedzy. W pierwszych 4 podrozdziałach Doktorantka przedstawia zagadnienia związane z samym czerniakiem, omawiając jego patogenezę, dostępne opcje terapeutyczne, podstawy molekularne jak i onkogenne szlaki sygnałowe związane z jego rozwojem oraz omawia odkryte dotychczas potencjalne biomarkery diagnostyczne. W kolejnym podrozdziale Doktorantka skupia się na małych mikropęcherzykach zewnątrzkomórkowych, przedstawiając ich klasyfikację i terminologię, sposoby izolacji, ich ładunek molekularny i heterogeniczność w płynach biologicznych a także omawiając ich znaczenie w procesach patologicznych, szczególnie skupiając się na czerniaku. Następny podrozdział poświęca spektrometrii mas jako technice identyfikacji białek, przedstawiając jej różne podtypy w postaci globalnej analizy proteomu metodą 'shotgun proteomics' czy też proteomiki celowanej. W Założeniach pracy Doktorantka przekonująco przedstawia powody podjęcia tematyki pracy oraz definiuje 2 główne cele pracy: identyfikację profilu białkowego związanego z progresją nowotworu. Podkreśla przy tym, że jest to pierwsza próba analizy

proteomicznej MTEX z osocza oddzielonych selektywnie wspomnianą metodą od całej reszty sEVs. Drugim celem jest porównanie molekularnego ładunku sEVs wydzielanych przez limfocyty T od osób zdrowych i od pacjentów z rakiem czerniak jako tzw. „płynna biopsja” mogąca wskazywać na upośledzone immunologiczne pacjentów z czerniakiem, które może pogarszać odpowiedź na immunoterapię.. W części metodycznej szczegółowo przedstawia zastosowane techniki oraz ich uzasadnienie. Brak jest jednak informacji o zastosowanych metodach leczenia u pacjentów, co mogłoby mieć istotny wpływ na badany profil sEVs. Nie do końca jasne jest też w jaki sposób były przygotowywane lizaty sEVs do analizy proteomicznej po zastosowanej immunoselekcji. Czy sEVs były wpierw odłączane od beadsów magnetycznych przed lizą? Czy przeciwciała używane do immunoselekcji trafiały również do lizatów i jaki to mogłoby mieć wpływ na dalsze analizy? W jaki sposób próbki do analizy proteomicznej były normalizowane? O ile tutaj brakuje paru istotnych informacji, o tyle dalsza obróbka próbek do analizy proteomicznej a także analiza statystyczna jest opisana bardzo dokładnie, chociaż też nie jest do końca jasne, które jej części zostały przeprowadzone przez sama Doktorantkę, gdyż wspomina ona sama na str. 46 dysertacji, że analizę statystyczną przeprowadziła Pani Justyna Mika – należałoby to bardziej uściślić.

W pierwszej części scharakteryzowano według wytycznych MISEV sEVs wyizolowane z osocza pacjentów z czerniakiem i zdrowych kontroli klasycznymi metodami takimi jak Western Blot, transmisyjnej mikroskopii elektronowej oraz nową metodą analizy śledzenia nanocząstek (ang. nanoparticle tracking analysis, NTA). Tutaj mam pewne wątpliwości, czy Doktorantka powinna zamieszczać pokazywane wyniki (chodzi o ryciny 7-11) w monografii, gdyż choć są one w większości pokazane w publikacjach których Doktorantka jest współautorką, to nie jest do końca jasne że sama przeprowadzała te eksperymenty. Tym bardziej, że w części materiały i Metody Doktorantka nie opisała metod na których bazują pokazane wyniki (Western Blot, mikroskopia elektronowa, cytometria z użyciem kulek, NTA). Moim zdaniem wystarczyłoby tutaj powołanie się na wyżej wspomniane prace ujęte w dorobku naukowym Doktorantki i uściślenie, które eksperymenty Doktorantka przeprowadziła osobiście. W kolejnej części autorka przedstawia wyniki analizy proteomicznej MTEX i NMTEX uzyskanych z osocza pacjentów z czerniakiem. Przeprowadzona nienadzorowana analiza głównych komponentów danych proteomicznych wykazała wyraźne różnice w profilu MTEX i NMTEX, szczególnie w przypadku 4 pacjentów z postępującym czerniakiem. Doktorantka zaproponowała na tej podstawie panel 16 białek o

podwyższonym stężeniu w MTEX do odróżniania MTEX od NMTEX. Co ważne, Doktorantka zweryfikowała, czy wykryte białka są obecne w komórkach czerniaka poprzez porównanie wykrytego panelu białek z danymi immunohistochemicznymi z Human Protein Atlas oraz z danymi transkryptomycznymi w bazie danych TCGA czerniaka. Istotnie, Doktorantka potwierdziła, że białka ze zidentyfikowanego panelu występują w komórkach czerniakach, dowodząc tym samym, że rzeczywiście MTEX są sEVs pochodzącymi z komórek czerniaka i mogą być uznane za tzw. „płynną biopsję nowotworową”. Następnie, aby zbadać znaczenie funkcjonalne białek wykrytych w MTEX, Doktorantka przeprowadziła analizę wzbogacenia ontologii genów (*gene ontology enrichment analysis*), analizę wzbogacenia ścieżek sygnałowych baz Reactom i String. Analizy wykazały między innymi znaczące wzbogacenie ścieżek sygnałowych związanych z PI3K-Akt, patologiczną infekcją E.coli, interakcją z receptorem ECM. Ponadto białka były związane z dosyć ogólnymi ścieżkami i funkcjami, takimi jak transdukcja sygnału, cykl komórkowy, transport zależny od pęcherzyków, adhezja komórkowa i glikozylacja, macierz zewnątrzkomórkowa i cytoszkielet. Najciekawsze wyniki pod względem klinicznym uzyskała autorka z analizy proteomu MTEX z uwzględnieniem zaawansowania choroby. Wyodrębniła 75 białek o wyższej ekspresji i 8 białek o niższej ekspresji w MTEX pacjentów z progresją choroby w stosunku do MTEX pacjentów bez objawów choroby.

Kolejna część wyników była poświęcona molekularnej analizie sEVs pochodzących od limfocytów T. Co ciekawe, Doktorantka wykazała bardzo dużą zmienność procentowego udziału sEVs pochodzących z limfocytów w puli wszystkich sEVs w osoczu pacjentów. Porównanie wykrytego proteomu CD3(+) sEVs z lizatem z limfocytów T odpowiednio w grupie pacjentów z czerniakiem i w grupie kontrolnej wykazało odpowiednio 65% i 62% wspólnych białek. Białka te wiązały się w analizie GO ze szlakami regulacji procesów komórkowych, odpowiedzią na bodźce, systemem immunologicznym, degranulacją neutrofilii. Podobnie jak w przypadku MTEX, profil białkowy sEVs pochodzenia limfocytarnego pacjentów z czerniakiem różnił się znacząco od profilu sEVs zdrowych kontroli. Doktorantka ponadto ustaliła, że białka o podwyższonej ekspresji w wyniku analizy wzbogacania szlaków zostały zaszeregowane przede wszystkim do typowych szlaków onkogennych, takich jak indukcja szlaku MAPK, Ras i Rho GTPazy, związanych z aktywnością zmutowanych form BRAF; zaś białka o obniżonej ekspresji wiązały się z odpowiedzią immunologiczną i apoptozą. Na zakończenie Doktorantka oceniła różnice w profilu

białkowym CD3(-) sEVs, czyli wszystkich mikropęcherzyków w osoczu nie pochodzących od limfocytów, czyli obejmujących też te nowotworowe, pacjentów i zdrowych kontroli. Tutaj także zauważalne były różnice w ekspresji 64 białek, których zdecydowana większość charakteryzowała się wyższym poziomem u pacjentów. Analiza wzbogacania GO i Reactome wskazywała na powiązanie tych białek z aktywacją i agregacją płytek, gojeniem się ran, adhezją komórkową transportem związanym z pęcherzykami oraz układem immunologicznym. Jak zauważyła Doktorantka, wskazywałoby to na to, że większość frakcji CD3(-) sEVs niezwiązanych z limfocytami jest wydzielana przez płytki i inne komórki układu immunologicznego.

O ile większość bardzo obszernych wyników w tej części pracy są przedstawione bardzo przejrzysto za pomocą rycin, mam drobną uwagę do przedstawionych diagramów Venna zawartych w rycinach 15, 25 i 28, mające w zamyśle Doktorantki przedstawiać białka o podwyższonej i obniżonej ekspresji w różnych badanych subpopulacjach sEVs. W tej sytuacji jednak nie wiadomo co oznaczają białka wspólne – nie mogą być przecież jednocześnie podwyższone i obniżone. Tutaj należałoby te wyniki przedstawić w innej formie.

W stosunku do obszernego wstępu i części z wynikami rozdział dotyczący **dyskusji** jest w mojej ocenie nieco krótki i mógłby być znacznie bardziej rozbudowany. Doktorantka bardzo zgrabnie i przekonująco opisała trudności jakie wiążą się z analizą proteomiczną sEVs z próbek biologicznych i w jaki sposób zastosowana przez Doktorantkę w pracy metoda wychwytu immunologicznego specyficznych populacji sEVs rozwiązuje te trudności, przyczyniając się do innowacyjności i nowatorskości przeprowadzonych badań. Doktorantka pokrótce omawia dotychczas przeprowadzone próby oceny profilu białkowego EVs związanych z czerniakiem, jednakże brakuje mi tu bardziej bezpośrednich porównań z własnymi wynikami. Czy któreś z białek zidentyfikowanych przez Doktorantkę pojawiało się już w innych pracach dotyczących profilowania proteomicznego czerniaka? Doktorantka wspomina też o innych pracach gdzie podjęto próby odseparowania sEVs pochodzenia nowotworowego metodą immunochwytania w przypadku innych nowotworów i ich analizy. Czy w tych pracach opisano jakieś białka związane z sEVs które są zbieżne z białkami wykrytymi przez Doktorantkę? Szczególnie brakuje w dyskusji dokładniejszego omówienia najważniejszych zidentyfikowanych białek, szczególnie tych wybranych przez Doktorantkę do panelu o znaczeniu prognostycznym. Co wiadomo na temat roli tych białek w czerniaku, lub szerzej, w nowotworach ogółem? Jaki mogłyby mieć związek z rozwojem czerniaka?

Doktorantka wspomina o wykryciu podobnego panelu związanego z progresją związanego z EVs z wysiękowego surowiczaka po limfadenektomii – czy są tu jakieś zbieżności?

Podobnie w części dyskusji dotyczącej profilu białkowego sEVs związanych z limfocytami brakuje głębszego omówienia znaczenia najważniejszych białek. Czy wykryte zmiany profilu białkowego sEVs wydzielanych przez limfocyty T u pacjentów wskazują jakiś konkretny kierunek ich modulacji funkcjonalnej przez komórki czerniaka, np. upośledzając ich funkcje przeciwnowotworowe? Jaką rolę mogłyby odgrywać tu białka związane ze wspomnianą aktywacją onkogennych szlaków MAPK/BRAF. Jakie znaczenie mogłyby mieć wykryte przez Doktorantkę zmiany poziomu białek związanych z aktywacją płytek u pacjentów z czerniakiem?

Myślę, że odpowiedzi na powyższe pytania będą dobrym punktem do dyskusji o wynikach i znaczeniu badań Doktorantki w czasie obrony jej pracy.

III. Dorobek publikacyjny

Z przedstawionej dokumentacji wynika, że część wyników pracy została opublikowana w recenzowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, notowanych na liście JCR. Świadczy to o wysokim poziomie naukowym badań oraz potwierdza ich oryginalność i znaczenie w środowisku naukowym. Ponadto Doktorantka jest pierwszym autorem dwóch prac przeglądowych powiązanych tematycznie z przedmiotem rozprawy.

Autorka posiada również liczne wystąpienia konferencyjne i aktywność naukową w postaci udziału w projektach badawczych. Całościowy dorobek spełnia kryteria formalne przewidziane w obowiązujących przepisach prawa oraz wewnętrznych regulaminach jednostki prowadzącej przewód.

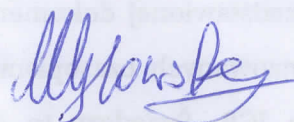
IV. Wniosek końcowy

Podsumowując, rozprawę doktorską mgr Anety Żebrowskiej oceniam bardzo wysoko zarówno pod względem merytorycznym, jak i formalnym i edytorskim. Staranne zaplanowanie i przeprowadzenie doświadczeń a także dogłębna i wyważona analiza uzyskanych wyników świadczy o znakomitym opanowaniu warsztatu badawczego i dojrzałości naukowej Doktorantki. Przedstawione w recenzji uwagi oraz pytania w żadnym stopniu nie wpływają na moją jak najbardziej pozytywną ocenę rozprawy. Podjęty przez Doktorantkę temat wpisuje się w ważny aspekt badań EVs obecnych w materiale klinicznym jako markerów diagnostycznych i prognostycznych w diagnostyce i terapii nowotworów.

Uzyskane w ramach pracy wyniki mogą stanowić cenny punkt wyjścia do opracowania testów w diagnostyce klinicznej i onkologii.

Przedstawiona mi do oceny praca spełnia wszystkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630). W związku z powyższym z przyjemnością wnioskuję o dopuszczenie mgr Anetę Żebrowską do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Z poważaniem



Małgorzata Czystowska Kuźmicz