

Dr hab. Magdalena Łuczak, prof. ICHB PAN

Poznań, 04.07.2025

Zakład Proteomiki Biomedycznej

E-mail: magdału@ibch.poznan.pl

Recenzja pracy doktorskiej mgr Anety Żebrowskiej pt. „Molecular characteristics of small extracellular vesicles isolated from melanoma patient's plasma”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Anety Żebrowskiej została wykonana w Narodowym Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej - Curie – Państwowym Instytucie Badawczym, pod promotorstwem prof. dr hab. Moniki Pietrowskiej. Praca została napisana w języku angielskim i ma charakter monografii choć jako załącznik dołączono 5 artykułów naukowych opublikowanych przez Doktorantkę w latach 2019-2022, a które związane są z tematyką przedstawionej do recenzji dysertacji.

Badania dotyczą analizy proteomicznej małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (sEV) wydzielanych przez komórki czerniaka pacjentów z rozpoznaniem tego nowotworu. Hipoteza badawcza zakłada, że krew chorych na czerniaka zawiera heterogeniczną mieszaninę sEV, w skład której wchodzi zarówno sEV wydzielane przez komórki nowotworowe (MTEX) jak i te pochodzące od różnych populacji zdrowych komórek organizmu (NMTEX). Zarówno MTEX jak i poszczególne NMTEX można rozfrakcjonować wykorzystując przeciwciała specyficzne dla antygenów, występujących na powierzchni sEV, które są tożsame z antygenami komórek, które je wydzielają. Dzięki takiemu podejściu możliwa jest izolacja MTEX, poznanie ich profilu proteomicznego i być może wytypowanie białek służących w przyszłości jako biomarkery pozwalające na diagnozowanie, prognozowanie lub monitorowanie odpowiedzi na terapię. To nowatorskie podejście, zwane „płynną biopsją”, choć wciąż rozwijające się, wpisuje się w nowoczesne metody detekcji biomarkerów nowotworowych i w przyszłości może wyznaczać nowe standardy w diagnostyce i terapii nowotworów jako metoda nieinwazyjna. Duża część pracy poświęcona jest sEV wydzielanym do krwi przez limfocyty T, które stanowią około połowy wszystkich sEV krążących w krwiobiegu. W przypadku tych badań Doktorantka założyła, że u pacjentów z czerniakiem, sEV produkowane przez limfocyty T różnią się od tych wydzielanych do krwi u ludzi zdrowych.

Praca rozpoczyna się wstępem teoretycznym, który w bardzo interesujący sposób wprowadza nas w tematykę rozprawy i zawiera wszystkie niezbędne informacje istotne dla jej zrozumienia. Następnie opisany jest materiał oraz metodyka zastosowana w pracy. Tabela 2 prezentuje charakterystykę 15 próbek

pochodzących od pacjentów onkologicznych, które wykorzystano do przeprowadzenia analiz sEV produkowanych przez komórki czerniaka, natomiast w tabeli 3 znajdujemy te same informacje dla 10 pacjentów, których próbki krwi posłużyły jako materiał do badania sEV wydzielanych przez limfocyty T. W obu tabelach widoczne jest dość duże zróżnicowanie wieku pacjentów, jak również przewagę próbek pochodzących od mężczyzn. Czy w pracy przeprowadzono analizy statystyczne związane z tymi parametrami? Czy zauważono jakiś wpływ wieku oraz płci na profil proteomiczny sEV? Czy grupa 10 zdrowych dawców została dobrana odpowiednio do grupy pacjentów? I wreszcie, dlaczego wykorzystano 2 różne grupy pacjentów do przeprowadzenia analiz? Czy próbki pobrane od pacjentów z czerniakiem różniły się od zdrowych dawców pod względem liczby wyizolowanych sEV?

Procedura przygotowania białek do analiz MS oraz sama analiza proteomiczna jest bardzo szczegółowo opisana w części poświęconej metodyce. Natomiast sama metoda przygotowania próbek od pacjentów, izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z osocza, immunoseparacja sEV oraz walidacja/weryfikacja uzyskanych frakcji sEV (badanie morfologii TEM, analiza WB czy NTA) jest opisana bardzo skrótowo. Przygotowanie próbek do analiz MS jest kluczowe i może wpłynąć na wartość uzyskanych informacji, stąd też krótki opis tej części metodyki lub choćby odnośnik literaturowy do publikacji opisującej te etapy byłby wartościowy.

Na stronie 43, w tabeli 8 znajdujemy informacje, że do identyfikacji białek analizowanych metodą LC-MS/MS wykorzystano recenzowaną ludzką bazę danych Swiss-Prot (reviewed Swiss-Prot human database) zawierającą (na dzień 30.11.2018) 11 378 269 sekwencji. Na dzień dzisiejszy (4.07.2025) baza ta zawiera około 573 tysięcy sekwencji dla wszystkich gatunków, w tym około 20 tysięcy białek ludzkich, skąd więc wzięła się ta liczba?

Część poświęcona wynikom podzielona jest na dwie części. W pierwszej części pracy, poświęconej sEV wydzielanym przez komórki czerniaka wykonano następujące analizy:

- Porównawcza analiza proteomiczna sEV zawierających antygen CSPG-4, specyficzny dla sEV wydzielanych przez komórki czerniaka (sEV CSPG4⁺; MTEX) oraz sEV niezawierających antygeny CSPG4 (sEV CSPG4⁻; NMTEX). Celem tych badań było znalezienie białek charakterystycznych dla sEV wywodzących się z komórek czerniaka. Zidentyfikowane przez Doktorantkę sygnatyry zawierały białka uczestniczące w regulacji cyklu komórkowego, transdukcji sygnałów, remodelingu macierzy zewnątrzkomórkowej i cytoszkieletu oraz funkcjonowaniu układu immunologicznego. Na podstawie uzyskanych wyników wybrano panel 16 białek produkowanych w znacznie większych ilościach w sEV CSPG4⁺, które w przyszłości mogłyby służyć w celach diagnostycznych. Co ważne, 10 z tych białek opisano uprzednio w literaturze, jako ekspresjonowane w tkance czerniaka.

Uważam tą część pracy za bardzo obiecującą i choć niektóre z zaproponowanych białek panelu są opisane w literaturze jako związane z różnymi typami nowotworów (np. gelsolina), to zaproponowanie panelu 16 białek, mogłoby w bardziej skuteczny sposób wspomóc diagnozę.

- Następnie profil proteomiczny NMTEX pacjentów został porównany z proteomem sEV izolowanych z osocza zdrowych dawców. Zidentyfikowano 75 białek różniących oba profile co stanowi bardzo ciekawy wynik potwierdzający, że choroba nowotworowa moduluje również sEV produkowane przez komórki nienowotworowe, a to uzasadnia analizy przeprowadzone w drugiej części rozprawy doktorskiej. Mam jednak pytanie dotyczące tych wyników. Co brano pod uwagę przy identyfikacji białek różnicujących NMTEX od pacjentów i zdrowych dawców? Tylko istotność statystyczną (p -value) czy krotność zmian również?
- W kolejnej analizie Doktorantka wykonała porównanie profili proteomicznych sEV CSPG4⁺ uzyskanych od pacjentów z różnym statusem czerniaka. Porównano pacjentów bez objawów choroby lub wykazujących stabilny stan z pacjentami z progresją choroby nowotworowej (PD). Znaleziono 83 białka różnicujące, z czego 75 białek wykazywało podwyższoną akumulację w grupie PD. Uważam ten wynik za najbardziej istotny w całej dysertacji, w kontekście identyfikacji biomarkerów związanych z progresją choroby, a które w przyszłości mogłyby służyć w celach prognostycznych.

W drugiej części pracy wykonano następujące analizy:

- Porównano profile proteomiczne sEV wydzielanych przez limfocyty T (sEV CD3⁺) izolowane od pacjentów oraz zdrowych dawców. Następnie porównano uzyskane wyniki z: proteomem limfocytów T izolowanych od pacjentów z czerniakiem oraz bazą białek limfocytów T opublikowanych w literaturze. W przypadku komórek T pobranych od pacjentów, brak jest informacji lub odnośnika literaturowego na temat zastosowanej metodyki do separacji komórek. Na podstawie przeprowadzonych analiz zidentyfikowano białka występujące zarówno w sEV CD3⁺ jak i w komórkach T uwalniających sEV CD3⁺. Co ciekawe, Doktorantka wytypowała również białka specyficzne tylko dla sEV CD3⁺ pochodzących od pacjentów z czerniakiem. Wykonana bioinformatyczna analiza funkcjonalna wykazała, że białka te związane są głównie z sygnalizacją MAPK oraz aktywnością BRAF.
- Przeanalizowano proteom sEV wydzielanych przez komórki CD3⁻ porównując próbki od pacjentów do tych uzyskanych od zdrowych dawców. Zidentyfikowane białka różnicujące głównie związane były z procesami krzepnięcia, aktywnością trombocytów oraz adhezją

komórek. Na podstawie tych obserwacji Doktorantka zasugerowała, że pęcherzyki wydzielane przez płytki krwi stanowią znaczną część sEV CD3⁺.

Jeśli chodzi o kwestie techniczne przedstawionych wyników, mam tylko jedną uwagę: w mojej opinii rysunki zamieszczone w pracy są zbyt małe, a podpisy bardzo trudne do rozszyfrowania.

Dyskusja jest bardzo klarownie napisana. Pierwszy jej rozdział traktuje o zaletach i wadach różnych podejść analitycznych oraz wyzwaniach technicznych związanych z analizą sEV. Po przeczytaniu tej części jasne wydaje się, że Doktorantka ma dużą wiedzę w tym temacie i zdaje sobie sprawę z różnych ograniczeń. Pozostałe rozdziały skupiają się na analizie sEV i wynikach dostępnych w literaturze. W mojej opinii jednak mało uwagi Doktorantka poświęciła na dyskusję wyników otrzymanych podczas realizacji samej rozprawy, szczególnie w kontekście tych dostępnych w literaturze. Podczas obrony, poprosiłabym o odniesienie się do poniższych uwag/zapytań:

1. Czy Doktorantka porównywała listę zidentyfikowanych w swoich badaniach białek do tych, które publikowane są w literaturze jako specyficzne dla sEV uwalnianych przez komórki czerniaka? Dla przykładu do tych wymienionych w Dyskusji na stronie 106? Ciekawi mnie na ile ta lista jest wspólna.
2. Jak wyglądała akumulacja białek określanych w rozprawie jako markerowe dla sEV np. tetraspanin: CD9, CD63, CD81 czy CD83, czy TSG101? Na rysunku 7A widoczny jest jakościowy wynik analiz western blot dla niektórych z tych białek, potwierdzający ich obecność zarówno u pacjentów jak i zdrowych dawców. Jednak, jeśli są to konstytutywnie ekspresjonowane w TEX białka, ich poziom powinien być stosunkowo podobny zarówno w MTEX jak i NMTEX, a wynik pochodzący z analizy ilościowej mógłby być traktowany jako swego rodzaju potwierdzenie prawidłowo wykonanych eksperymentów.
3. Porównawcze analizy sEV CD3⁺ izolowanych od pacjentów i zdrowych dawców pokazały, zaburzenia akumulacji białek zaangażowanych w sygnalizację MAPK/BRAF co w kontekście przeprogramowania limfocytów T w trakcie rozwoju choroby nowotworowej wydaje się zasadne. Zaciekał mnie jednak wynik porównania sEV CD3⁺. Poprosiłabym Doktorantkę o próbę wytłumaczenia na podstawie dostępnych danych, dlaczego pacjenci z czerniakiem różnią się od zdrowych dawców pod względem procesów związanych z koagulacją?

Podsumowując, przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Anety Żebrowskiej dotyczy ważnej dziedziny badań jakim są poszukiwania molekularnych sygnatur rozwoju chorób nowotworowych w kontekście diagnostyki, predykcji wyników leczenia oraz progresji raka. Uzyskane wyniki prezentują wysoką wartość merytoryczną, tym bardziej, że uzyskane zostały w oparciu o bardzo trudny materiał

biologiczny, który choć bardzo obiecujący jeśli chodzi o wykorzystanie tzw. „płynnej biopsji”, nadal nastrocza wielu problemów technicznych. Doktorantka wykazała się wiedzą teoretyczną oraz praktyczną z zakresu prowadzonych przez siebie prac badawczych, postawiła przed sobą ambitne i jasne cele naukowe, a następnie je zrealizowała. Wytypowane w pracy białka, w przyszłości mogą stanowić cenny cel badawczy jako markery diagnostyczne oraz prognostyczne w czerniaku. Tak jak wspomniałam na początku recenzji, na końcu rozprawy doktorskiej widzimy informacje, że Doktorantka jest współautorką 5 publikacji naukowych, w tym 3 pierwszoautorskich. Publikacje te ukazały się w latach 2019-2022, czyli prawdopodobnie w trakcie realizowania badań w ramach przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej, a dotyczą małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych i ich analizy w kontekście chorób nowotworowych. Jeden z artykułów opublikowany został w wysokopunktowanym czasopiśmie *Journal of Extracellular Vesicles* (IF 5 letni 16.7). To stanowi bardzo dobry wynik jak na ten etap kariery naukowej oraz potwierdza, że mgr Aneta Żebrowska jest specjalistką w tematyce sEV.

W świetle powyższych danych, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że recenzowana przeze mnie dysertacja mgr Anety Żebrowskiej pt. „Molecular characteristics of small extracellular vesicles isolated from melanoma patient's plasma” zawiera istotne elementy nowości naukowej oraz oryginalności i spełnia ustawowe oraz zwyczajowe kryteria stawiane kandydatom do stopnia doktora sformułowane w art. 187 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, Dz. U z 2020 r. poz. 85 z późn. zm. W związku z tym wnoszę do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie mgr Anety Żebrowskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne.



dr hab. Magdalena Łuczak, prof. ICHB PAN