

Recenzja rozprawy doktorskiej
Pani mgr Anny Marty Muchlińskiej
pod tytułem
„Znaczenie biologiczne i kliniczne fibroblastów związanych z nowotworem oraz
krążących fibroblastów w progresji raka piersi”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr **Anny Marty Muchlińskiej** została wykonana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Anny Żaczek w Zakładzie Onkologii Translacyjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego i Uniwersytetu Gdańskiego. Badania prezentowane w rozprawie były finansowane w ramach projektów badawczych Sonata Bis 6 numer 2016/22/E/NZ4/00664 Narodowego Centrum Nauki oraz polsko-chińskiego projektu HESCAP numer WCP/33/HESCAP/2018 Narodowego Centrum Badań i Rozwoju, których kierownikiem była Pani prof. dr hab. Anna Żaczek.

Problematyka pracy doktorskiej dotyczy poznania procesów biologicznych mających wpływ na mikrośrodowisko nowotworu piersi. W szczególności Doktorantka skupiła się na określeniu znaczenia fibroblastów związanych z nowotworem piersi (ang. *Cancer-Associated Fibroblasts* - CAFs) oraz krążących fibroblastów związanych z nowotworem piersi (ang. *circulating Cancer-Associated Fibroblasts* - cCAFs) w progresji choroby oraz odpowiedzi na leczenie pacjentów z nowotworem piersi.

Znanym jest fakt, że fibroblasty związane z nowotworami pełnią istotne role w mikrośrodowisku guza i mają wpływ na sposób i skuteczność migracji komórek nowotworowych. Dlatego charakterystyka podłoża molekularnego tego procesu jest ważnym i aktualnym tematem, mającym duże znaczenie nie tylko dla nauk podstawowych, ale przede wszystkim dla praktyki klinicznej.

Zgodnie z danymi dostępnymi na stronach WHO nowotwór piersi jest jednym z najczęściej występujących nowotworów na świecie. Nowotwór ten stanowi blisko 25-29% ogółu wszystkich wykrytych przypadków wśród nowotworów złośliwych u kobiet. Na podstawie danych WHO szacuje się, że z powodu nowotworu piersi w 2020 umarło 685 000 kobiet na 2,3 miliona zdiagnozowanych przypadków na całym świecie.

Należy także stwierdzić, że pomimo niewątpliwego postępu medycyny w zakresie leczenia nowotworu piersi wskaźnik zachorowalności oraz śmiertelności pozostaje nadal

wysoki, dlatego konieczne jest prowadzenie dalszych badań zmierzających do określenia markerów predykcyjnych i prognostycznych, a także potencjalnych molekularnych celów terapii precyzyjnej oraz spersonalizowanej.

Co ciekawe, pomimo faktu istnienia w bazie PubMed > 190 prac naukowych poświęconych fibroblastom związanych z nowotworem piersi, wciąż istnieje potrzeba udoskonalenia technik służących izolacji takich komórek, detekcji ich markerów powierzchniowych, a także charakterystyki ich aktywności biologicznej względem nowotworu piersi.

Zgodnie z powyższym należy stwierdzić, że tematyka pracy doktorskiej jest aktualna, i mająca uzasadnienie w odniesieniu do wcześniejszych publikacji naukowych oraz dla praktyki klinicznej.

Rozprawa doktorska Pani mgr **Anny Muchlińskiej** ma charakter monografii i liczy 94 numerowanych stron. Układ pracy doktorskiej jest typowy dla prac eksperymentalnych. Praca doktorska została podzielona na następujące rozdziały: streszczenie pracy przygotowane w języku polskim oraz angielskim, wykaz skrótów, wstęp, cel pracy, materiały, metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie, literatura. Tekst pracy poprzedzony został spisem treści.

Bibliografia obejmuje 94 odpowiednio dobrane zgodnie z tematem pracy pozycje piśmiennictwa. Praca doktorska została także wzbogacona w 20 rycin oraz 15 tabel.

W pracy zauważono kilka błędów związanych z brakiem interpunkcji oraz omyłek edytorskich czy niefortunnych sformułowań, co jednak zdaniem recenzenta może zdarzyć się w każdej pracy. Recenzent nie chce w tym miejscu ich wymieniać, ponieważ nie mają one większego znaczenia dla zrozumienia tekstu oraz wyników.

Na wyróżnienie zasługuje fakt, że wyniki zaprezentowane w pracy doktorskiej częściowo zostały także opublikowane w 2022 roku z pierwszym autorstwem Doktorantki w czasopiśmie z listy JCR Cellular & Molecular Biology Letters (***Muchlińska A, Nagel A, Popęda M, Szade J, Niemira M, Zieliński J, Skokowski J, Bednarz-Knoll N, Żaczek AJ. Alpha-smooth muscle actin-positive cancer-associated fibroblasts secreting osteopontin promote growth of luminal breast cancer. Cell Mol Biol Lett. 2022 Jun 11;27(1):45. doi: 10.1186/s11658-022-00351-7.***). Część wyników została także zdeponowana w 2023 roku w postaci manuskryptu tzw. *preprintu* również z pierwszym autorstwem Doktorantki w bazie medrxiv (***Muchlińska A, Wentka R, Ścińska W, Markiewicz A, Suchodolska G, Senkus E, Żaczek AJ, Bednarz-Knoll N, Improved characterization of circulating tumor cells and cancer-***

associated fibroblasts in breast cancer patients using imaging flow cytometry. medRxiv 2023.04.27.23289190; doi: <https://doi.org/10.1101/2023.04.27.23289190>

W kwestiach formalnych Recenzent nie ma uwag krytycznych i stwierdza, że dysertacja spełnia standardy jakimi powinna odznaczać się praca doktorska przygotowywana w dyscyplinie nauki medyczne.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Wstęp dysertacji został przygotowany w formie niezwykle syntetycznej, ale zawiera wszystkie potrzebne informacje dla zrozumienia treści omawianych w dalszej części pracy. We wstępie, Doktorantka opisała: zagadnienia związane z epidemiologią nowotworu piersi kobiet; typy histologiczne nowotworu piersi kobiet wraz z charakterystyką markerów molekularnych stosowanych w diagnostyce nowotworu piersi; zagadnienia związane z mikrośrodowiskiem nowotworu, stan wiedzy w zakresie aktywności biologicznej i roli fibroblastów związanych z nowotworem piersi oraz krążących fibroblastów związanych z nowotworem piersi; scharakteryzowała także procedury detekcji krążących fibroblastów związanych z nowotworem piersi oraz krążących komórek nowotworowych. Wstęp został opatrzony dwoma dobrze opracowanymi autorskimi schematami. Oceniając ten rozdział pracy należy zaznaczyć, że Doktorantka dobrze też opisała luki dotychczasowego stanu wiedzy w zakresie omawianej tematyki, jednocześnie uzasadniając potrzebę wykonania swojej pracy doktorskiej. Do tego rozdziału mam tylko jedną drobną uwagę. Zdaniem Recenzenta pożądanym dla czytelnika byłoby także zamieszczenia we wstępie rozdziału o modelach komórkowych stosowanych w badaniach nad nowotworem piersi wraz z podaniem ich klasyfikacji, a także tabeli z charakterystyką markerów przydatnych w diagnostyce fibroblastów związanych z nowotworem piersi, jak również tabeli lub schematu przedstawiającego główne etapy procedury izolacji i detekcji krążących fibroblastów związanych z nowotworem piersi.

Cel pracy został określony w sposób jednoznaczny zgodnie z tematem rozprawy. Dodatkowo Doktorantka sprecyzowała cztery cele szczegółowe. Do tej części również nie mam uwag.

Podsumowując powyższe stwierdzam, że postawiony cel naukowy spełnia wymóg niezbędny dla uznania ocenianej pracy doktorskiej za odpowiadający poziomowi jakim powinna odznaczać się praca doktorska, ponieważ realizacja tego celu istotnie prowadzi do

poszerzenia dotychczasowej wiedzy oraz stanowi przyczynek do oryginalnego rozwiązania problemu naukowego.

Rozdział materiały zawiera opisy wykorzystanych linii komórkowych reprezentujące różne podtypy histologiczne i molekularne nowotworu piersi oraz dodatkowo opis linii fibroblastów BJ. W tym rozdziale zawarto także wykaz pożywek hodowlanych, przeciwciał oraz innych odczynników wykorzystanych podczas pracy badawczej. Dodatkowo zawarto informację o aparaturze laboratoryjnej oraz oprogramowaniu użytym w trakcie badań i analiz. Pomimo dosyć szczegółowego wykazu, Doktorantka nie podała numerów katalogowych niektórych odczynników stosowanych w badaniach, np. zestawów do oznaczeń i przeciwciał. Ma to istotne znaczenie, ponieważ na stronach firm może być dostępnych np. kilka przeciwciał dedykowanych do określonego jednego typu białka. Ma to znaczenie dla możliwości odtworzenia eksperymentów przez innych naukowców. Zdaniem recenzenta w wykazie oprogramowania zabrakło informacji o programie do analiz wyników uzyskanych za pomocą skanera nCounter i technologii NanoString Tech., tj. nSolver 4.0 analysis software. W rozdziale tym zabrakło także informacji o użytym materiale klinicznym oraz uzyskaniu zgód komisji bioetycznej. Informacja ta znajduje się dopiero w rozdziale metody.

Rozdział metody został opracowany poprawnie. W rozdziale tym opisano wszystkie procedury eksperymentalne wykorzystane do osiągnięcia zdefiniowanych w pracy celów badawczych. W rozdziale metody zawarto opis procedur, który w większości bezproblemowo umożliwia odtworzenie wykonanych eksperymentów.

W tym miejscu chciałbym podkreślić, że jakość merytoryczna oraz ilość zastosowanych technik oraz narzędzi eksperymentalnych świadczy o bardzo dobrych kwalifikacjach Doktorantki w zakresie pracy laboratoryjnej. W pracy wykorzystano szereg kompleksowych i zaawansowanych technik biologii molekularnej takich jak: przepływowa cytometria obrazowa, sekwencjonowanie nowej generacji, czy profilowanie immunologiczne komórek nowotworowych za pomocą technologii NanoString. Hipoteza badawcza była weryfikowana za pomocą dobrze dobranych modeli *in vitro* oraz analiz materiału klinicznego. Do tego rozdziału nie mam uwag krytycznych.

Prezentacja wyników została usystematyzowana w sposób tworzący logiczny ciąg zmierzający do udzielenia odpowiedzi na zdefiniowane w pracy doktorskiej cele. Wyniki przedstawiono na 14 bardzo dobrze opracowanych rycinach oraz w 9 tabelach odpowiednio opisanych oraz zacytowanych w tekście. Rozdział ten został opracowany prawidłowo zgodnie



z ogólnie przyjętymi zasadami dla prac eksperymentalnych. Wyniki ilościowe zostały przeanalizowane z użyciem adekwatnych testów statystycznych. Przedstawione w tym rozdziale pracy wyniki wskazują na duży nakład pracy włożony w przygotowanie ocenianej pracy doktorskiej, a jednocześnie również na dojrzałość Doktorantki jako naukowca. Za szczególnie interesujące uważam wyniki przedstawiające porównanie profilu ekspresji genów w wyizolowanych fibroblastach związanych z nowotworem piersi wykazujące duży poziom białka α -SMA oraz fibroblastów związanych z nowotworem raka wykazujące niski poziom białka α -SMA. Dzięki wykonanemu immuno-profilowaniu udało się Doktorantce wytypować czynniki odpowiedzialne za promowanie wzrostu kolonii komórek nowotworu piersi zasocjowane z wysokim poziomem białka α -SMA. Inne interesujące wyniki mające duże znaczenie dla onkologii to dane przedstawiające rozkład fenotypów krążących fibroblastów związanych z nowotworem piersi oraz krążących komórek nowotworowych w krwiobiegu chorych z nowotworem piersi. Niezwykle ciekawymi wynikami są także te dotyczące wykonanego przez Doktorantkę porównania statusu krążących fibroblastów związanych z nowotworem piersi oraz krążących komórek nowotworowych w krwiobiegu z cechami kliniczno-patologicznymi, w tym z odpowiedzią na leczenie chorych z nowotworem piersi.

Wszystkie otrzymane wyniki zostały poddane krytyce w oparciu o adekwatną do problematyki literaturę w kolejnym rozdziale dysertacji. Należy jednocześnie zaznaczyć, że polemika Doktorantki z wcześniejszymi danymi została przeprowadzona w sposób wyważony i zgodnie z aktualnym stanem wiedzy. Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością problematyki z zakresu nowotworów piersi oraz fenotypowaniem komórek. Wnioski końcowe zostały również opracowane adekwatnie do otrzymanych wyników. Za pozytywny aspekt tego rozdziału uważam przygotowanie przez Doktorantkę graficznego podsumowania zaprezentowanych w dysertacji wyników.

Po przeczytaniu rozdziału wyniki oraz dyskusji mam jednak kilka pytań dotyczących doprecyzowania niektórych aspektów pracy.

- 1) W jaki sposób walidowano wyniki otrzymane za pomocą technologii NanoString?
- 2) Jaką wartość zastosowano dla poziomu korekcji tła podczas normalizacji i analiz z użyciem oprogramowania nSolver 4.0?
- 3) Ponieważ Doktorantka wykorzystywała technikę przepływową cytometrii obrazowej - czy w analizowanych komórkach obserwowano autofluorescencję? Jeżeli tak, jakie

- może być jej źródło oraz czy jej pomiar może mieć jakiś dodatkowy walor diagnostyczny wzbogacający otrzymane wyniki zaprezentowane na rycinach 15-17?
- 4) Proszę o doprecyzowanie wyników zaprezentowanych na rycinie 14E, na których Doktorantka zaobserwowała istotne statystycznie zmiany w odsetku komórek Ki67 dodatnich u chorych z różnym poziomem osteopontyny - za pomocą jakich przeciwciał lub metod zaklasyfikowano komórki jako Ki67-dodatnie? W rozdziale materiały recenzent nie znalazł informacji o użytych do tego celu odczynnikach.
 - 5) Czy marker Ki67 jest według Doktorantki dobrym markerem diagnostycznym dla komórek nowotworu piersi? W jaki inny sposób można określić, zwalidować potencjał proliferacyjny komórek nowotworu piersi?
 - 6) Dlaczego w obrębie analizowanej populacji fibroblastów związanych z nowotworem piersi Doktorantka nie uwzględniła możliwości występowania zjawiska *cancer-associated fibroblast senescence* czyli starzenia fibroblastów związanych z nowotworem i nie zdecydowała się na wykonanie dodatkowych analiz markerów takich komórek?

Wniosek końcowy

W podsumowaniu recenzji stwierdzam, że rozprawa doktorska przygotowana przez **Pani mgr Annę Martę Muchlińską** spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. 2021 poz. 478 ze zm.).

Doktorantka udowodniła, że samodzielnie potrafi rozwiązywać sformułowany problem naukowy poprzez odpowiednio zaplanowane eksperymenty, ich interpretację, krytyczną dyskusję oraz wyważone wnioski. Stwierdzam także, że oceniana przeze mnie praca doktorska wnosi nowe informacje do dyscypliny nauki medycznej. W związku z powyższym wnoszę do Rady Nauk Medycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie **Pani mgr Annę Martę Muchlińską** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką wartość naukową wyników dotyczących opracowania nowej metody do jednoczesnej detekcji krążących fibroblastów związanych z nowotworem piersi oraz krążących komórek nowotworowych z zastosowaniem przepływowego cytometru obrazowego, a także otrzymaniem szeregu nowych informacji poszerzających dotychczasowy stan wiedzy w zakresie biologii komórek nowotworowych oraz fakt, że wyniki częściowo zostały już opublikowane z pierwszym autorstwem Doktorantki w czasopiśmie z listy JCR Cellular &



Molecular Biology Letters wnioskuję do Rady Nauk Medycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie ocenianej przeze mnie rozprawy doktorskiej.

Rzeszów, 26/07/2023

Dr hab. Maciej Wnuk, prof. UR