



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Instytut Biostrukturalnych Podstaw Nauk Medycznych
Zakład Histologii i Embriologii

Collegium Anatomicum, ul. H. Święcickiego 6, 60-781 Poznań
tel.: +48 61 854 64 55, fax: +48 61 854 64 40, e-mail: histologia@ump.edu.pl

Poznań, dnia 22 września 2023 r.

dr hab. n. med. Joanna Budna-Tukan
Instytut Biostrukturalnych Podstaw Nauk Medycznych
Zakład Histologii i Embriologii
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Rada Nauk Medycznych
Gdański Uniwersytet Medyczny

Recenzja

**rozprawy doktorskiej mgr Anny Muchlińskiej
„Znaczenie biologiczne i kliniczne fibroblastów związanych z
nowotworem oraz krążących fibroblastów w progresji raka piersi”**

Promotor
prof. dr hab. Anna Źaczek
Zakład Onkologii Translacyjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
i Uniwersytetu Gdańskiego

Ogólna charakterystyka pracy doktorskiej

Rozprawa doktorska mgr Anny Muchlińskiej przygotowana została pod kierownictwem prof. dr hab. Anny Żaczek w Zakładzie Onkologii Translacyjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego i Uniwersytetu Gdańskiego. Opracowanie w języku polskim liczy 94 strony i składa się z 11 rozdziałów, tj. „Streszczenia” w języku polskim i angielskim, „Wykazu skrótów”, „Wstępu”, „Celów pracy”, „Materiałów”, „Metod”, „Wyników”, „Dyskusji”, „Podsumowania” oraz „Literatury”. Jest to układ zgodny z wymogami stawianymi tego rodzaju pracom i nie budzi zastrzeżeń. Ponadto, Doktorantka wzbogaciła rozprawę 20 rycinami oraz 15 tabelami. Są one czytelne i dobrze obrazują uzyskane wyniki. W pracy nie pojawia się jednak spis rycin i tabel. „Literatura” zawiera 134 pozycje, w tym 48 publikacji z ostatnich 5 lat, oraz autorstwa naukowców o dużej rozpoznawalności w obszarze tematyki poruszanej w niniejszej pracy doktorskiej. Pozycje cytowane są w kolejności pojawiania się w tekście i adekwatnie do zawartych w nim informacji. Moją uwagę zwróciły drobne choć nagminne błędy edytorskie, polegające na wielokrotnych spacjach lub braku spacji między wyrazami.

Ocena merytoryczna pracy

Rak piersi u kobiet stanowi około 20% wszystkich zachorowań na nowotwory złośliwe w Polsce. Pomimo nieustannego rozwoju narzędzi diagnostycznych oraz postępu medycyny, w tym wprowadzania innowacyjnych terapii oraz rosnącej jakości opieki nad pacjentami onkologicznymi, rak piersi nadal przoduje pod względem zachorowalności wśród nowotworów, skracając życie i niosąc cierpienie kobietom w każdej grupie wiekowej. Wczesna diagnostyka i trafne leczenie są kluczem do poprawy rokowania u pacjentów.

Nowotwór pozostaje w nieustannej interakcji z prawidłowymi komórkami organizmu. Rozwój nowotworu wiąże się zazwyczaj ze złamaniem nadzoru immunologicznego przez liczne mechanizmy miejscowe, sprzyjając jego progresji. Odbywa się to głównie na drodze przyciągania do mikrośrodowiska guza komórek o działaniu immunosupresyjnym, obniżenia ekspresji cząsteczek prezentujących antygeny i upośledzenia funkcji komórek prezentujących antygeny, czy wydzielania czynników immunosupresyjnych takich jak cytokiny, chemokiny lub enzymy. Istotnym czynnikiem jest też interakcja z elementami macierzy pozakomórkowej, w tym fibroblastami związanymi z nowotworem (ang. *Cancer Associated Fibroblasts*; CAFs)

o dualnym wpływie na nowotwór. Dokładne poznanie mechanizmów związanych z ucieczką nowotworu spod nadzoru immunologicznego byłoby kluczem do stworzenia skutecznej terapii przeciwnowotworowej.

Rozpoznanie choroby i monitorowanie leczenia oparte na tradycyjnej inwazyjnej biopsji tkankowej jest obarczone szeregiem błędów. Obiecującym rozwiązaniem wydaje się być wykrywanie i charakterystyka elementów „płynnej biopsji”, do których należą m.in. krążące komórki nowotworowe (ang. *Circulating Tumor Cells*; CTCs) i krążące fibroblasty związane z nowotworem (ang. *Circulating Cancer Associated Fibroblasts*; cCAFs). Na przestrzeni ostatnich dekad szczególna uwaga badaczy poświęcona była CTCs, które uważane są za główną przyczynę rozsiewu nowotworowego. cCAFs powiązano z kolei z promowaniem niszy do utworzenia przerzutu. Wnikliwa ocena liczebności i charakterystyka tak heterogennych populacji komórek jest ogromnym wyzwaniem ale niesie ze sobą dużą wartość diagnostyczną i predykcyjną.

Doktorantka w swojej pracy podjęła się określenia znaczenia biologicznego i klinicznego fibroblastów związanych z nowotworem oraz krążących fibroblastów w progresji raka piersi. W odniesieniu do powyższych informacji uważam tematykę badań podjętą przez Panią Magister za niezwykle aktualną i istotną, o realnym potencjale do wykorzystania w praktyce klinicznej.

We „Wstępie” Doktorantka charakteryzuje raka piersi wraz z jego typami molekularnymi, zaznajamia czytelnika z terminem mikrośrodowisko guza oraz jego składowymi, tj. fibroblastami związanymi z nowotworem, krążącymi komórkami nowotworowymi i krążącymi fibroblastami związanymi z nowotworem oraz metodami detekcji obu heterogennych populacji komórek. Opis, choć zwięzły, podparty jest solidnymi pozycjami literaturowymi i uważam go za wyczerpujący.

W „Celach pracy” Doktorantka w sposób jasny formułuje główne i ambitne założenie pracy, czyli zbadanie i zrozumienie wpływu fibroblastów w guzie pierwotnym oraz we krwi chorych na raka piersi na biologiczne procesy zachodzące w guzie, takie jak wzrost, zdolność rozsiewu czy fenotyp komórek nowotworowych oraz ich klinicznego znaczenia, czyli wpływu na przeżycie czy odpowiedź na leczenie. Cel główny ze względu na swoją złożoność doprecyzowany jest 4 celami szczegółowymi.

W rozdziale „Materiały” zostały szczegółowo wymienione i scharakteryzowane zastosowane linie komórkowe, użyte odczynniki, sprzęt laboratoryjny oraz kompatybilne

oprogramowanie niezbędne do prowadzenia oznaczeń i analiz. To co budzi moje wątpliwości to brak wzmianki o materiale biologicznym pozyskanym od pacjentek.

Szczegółowa charakterystyka badanej grupy chorych oraz pobranego od nich materiału znajduje się w kolejnym rozdziale zatytułowanym „Metody”. W moim odczuciu jednak powinna się ona znaleźć w rozdziale poprzednim. Kolejno, w niniejszym rozdziale Doktorantka z detalami opisuje wszystkie zastosowane metody badawcze, tj. oznaczenie poziomu białek w tkankach metodą immunohistochemiczną, izolację fibroblastów związanych z nowotworem, hodowle komórkowe, charakterystykę CAFs, wzrost kolonii komórkowych w hodowli 3D, analizę danych NanoString, zbieranie krwi chorych i izolację PBMC, barwienie immunofluorescencyjne w celu wykrycia cCAFów i CTCs, analizy za pomocą cytometru przepływowego z funkcją obrazowania oraz użyte analizy statystyczne. Już sama liczba zastosowanych metod badawczych robi wrażenie i czyni badanie kompleksowym. Uważam, że Doktorantka wykazała się dużą wiedzą i dojrzałością naukową wybierając trafnie odpowiednie narzędzia badawcze. Część oznaczeń realizowana była we współpracy naukowej ze specjalistami w danej dziedzinie ale nie umniejsza to wartości przedstawionych badań, wręcz przeciwnie pokazuje, że Doktorantka posiada cenne umiejętności pracy w zespole. Ponadto, wszystkie współpracujące osoby zostały ujęte jako współautorzy publikacji naukowych Doktorantki.

W przebiegu pracy badawczej uzyskano znaczną ilość wyników. Co najważniejsze, te istotne statystycznie układają się w logiczną całość. Scharakteryzowano 2 populacje CAFs, α -SMA^{high} oraz α -SMA^{low}, oraz zidentyfikowano podwyższoną ekspresję genów związanych z indukcją proliferacji, EMT czy angiogenezy w tych pierwszych. Zarówno w liniach pierwotnych CAFs α -SMA^{high} oraz próbkach klinicznych zaobserwowano zwiększoną ekspresję genu osteopontyny oraz zwiększoną sekrecję tego białka w hodowlach CAFs α -SMA^{high}. Na poziomie badań *in vitro* wykazano, że media kondycjonowane z hodowli CAFs α -SMA^{high} stymulowały wzrost komórek linii nowotworowych a proces ten był hamowany przez dodatek przeciwciał neutralizujących osteopontynę. Ponadto, analiza przeżycia wykazała, że w grupie chorych z luminalnym rakiem piersi A i B pacjentki CAFs α -SMA^{high} charakteryzowały się gorszym rokowaniem w stosunku do pacjentek α -SMA^{low}, co sugeruje, że CAFs α -SMA^{high} mogą być związane z bardziej agresywnym fenotypem komórek raka piersi, a wydzielanie osteopontyny przez te komórki może być jednym z mechanizmów wyjaśniających to zjawisko.

Ponadto, opracowano metodę służącą do jednoczesnej detekcji cCAFs i różnych fenotypów CTCs z zastosowaniem cytometru przepływowego z funkcją obrazowania. Z zastosowaniem tej techniki wykazano, że cCAFs występują częściej z CTCs, szczególnie z ich epitelialnymi lub negatywnymi subpopulacjami, a ich obecność koreluje z zaawansowaną formą choroby.

Wszystkie uzyskane wyniki zostały poruszone w „Dyskusji” pracy. Jest ona napisana w sposób typowy dla dysertacji, analizując kolejno uzyskane wyniki w świetle prac innych autorów. Wywód prowadzony jest w sposób logiczny, z wyważoną oceną badań własnych. Odnoszę jednak wrażenie, że przy tak dużej licznie uzyskanych, ciekawych wyników można było pokusić się o nawet dogłębniejszą dyskusję. Zdaję sobie jednak sprawę, że nie jest to łatwe w przypadku prac o charakterze nowatorskim, kiedy trudno bezpośrednio odnieść wyniki badań własnych do badań innych autorów ze względu na różnice metodologiczne czy grup badanych.

Uważam że mgr Anna Muchlińska jest dojrzałym naukowcem o dużej wiedzy teoretycznej z zakresu prowadzonych badań, ze zdolnością planowania badań i trafnego doboru narzędzi badawczych oraz praktycznych umiejętnościach laboratoryjnych. Praca opublikowana w *Cellular & Molecular Oncology Letters* z IF 8,712 pozostawia niedosyt, że nie udało złożyć się pracy w formie cyklu publikacji ale mam nadzieję, że Autorka będzie kontynuowała swoje badania na większej grupie badanej, co pozwoli na uzyskanie kolejnych wartościowych danych i ich publikację w równie renomowanych czasopismach. Pod rozwagę poddaję izolację komórek cCAFs oraz CTCs przy pomocy sortera rzadkich komórek, umożliwiającą analizy genetyczne na poziomie pojedynczej komórki jako metodę komplementarną do sekwencjonowania wykonanego na pierwotnych liniach komórkowych i cytometrii przepływowej z funkcją obrazowania.

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Anny Muchlińskiej pt. „Znaczenie biologiczne i kliniczne fibroblastów związanych z nowotworem oraz krążących fibroblastów w progresji raka piersi” stanowi dobrze opracowaną dysertację i spełnia w mojej ocenie kryteria stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych. Na tej podstawie przedstawiam Radzie Nauk Medycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie mgr Anny Muchlińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, kierując się szerokim spektrum przeprowadzonych prac i ich nowatorskim charakterem wnoszę o wyróżnienie pracy.

Z wyrazami szacunku,


dr hab. n. med. Joanna Budna-Tukan