



Prof. dr hab. Arkadiusz Miązek
Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej
Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

Wrocław, 2025-10-07

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Natalii Ćwilichowskiej-Puśleckiej pt. „Dissecting the proteolytic fingerprint in breast cancer using mass cytometry” zrealizowanej na Wydziale Chemicznym, w Katedrze Chemii Biologicznej i Bioobrazowania Politechniki Wrocławskiej pod kierunkiem prof. Marcina Poręby

1. Ocena formalna:

Podstawą wykonania niniejszej recenzji jest uchwała nr 199/11/RDND10/2024-2028 Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej z dnia 09 lipca 2025 roku. Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska składa się z 270 numerowanych stron maszynopisu poprzedzonych stroną tytułową, mottem przewodnim wziętym z autobiografii Marii Skłodowskiej-Curie, podziękowaniami w języku angielskim, streszczeniem w językach angielskim i polskim, listą skrótów i spisem treści. W układzie rozprawy sporządzonej w języku angielskim wyodrębniono 7 rozdziałów po których zamieszczono rozdział „Publications” podsumowujący dorobek publikacyjny Autorki rozprawy oraz bibliografię obejmującą 195 pozycji literaturowych prawidłowo cytowanych w rozprawie. Układ rozprawy jest typowy dla monografii doktorskich, skład tekstu, użycie akapitów, tabulatorów, łamanie stron, nie budzą zastrzeżeń. Mimo, że Autorka swobodnie posługuje się specjalistycznym słownictwem naukowym w języku angielskim, tekst pracy zawiera bardzo liczne literówki oraz błędy gramatyczne (np. na stronie nr. 1 w samym akapicie 1.1. złożonym z pięciu zdań doliczyłem się 5 literówek: „quatifing”, „technoque”, „diffrenet”, „liithe”, „pottentially”, 2 błędów gramatycznych: „lies zamiast lie”, „cause zamiast causes” i 1 błędu interpunkcyjnego: brak przecinka po słowie „However”), które mimo, że nie stanowią poważnej przeszkody w zrozumieniu tekstu, to jednak utrudniają śledzenie wywodu. Układ graficzny rycin jest czytelny i pomocny w zrozumieniu tekstu, jedynie rozdzielczość Ryciny 4.2 jest zbyt niska. Legendy rycin i tabel na ogół klarownie przedstawiają zawartą w nich treść, chociaż niektóre z nich są zbyt lapidarne i nieoczywiste bez znalezienia odpowiedniego opisu w tekście rozdziału (np. 4.120 i 4.121 oraz 4.122 i 4.123), a legenda Ryciny 4.21 odnosi się to bramek elektronicznych D, D’, których nie ma na rycinie. Autorka każdorazowo prawidłowo zamieszcza odnośniki do prac oryginalnych na podstawie których stworzyła treści graficzne. Podsumowując stronę formalną ocenianej pracy, chciałbym podkreślić

że mimo wykazanych powyżej uchybień/braku korekty edytorskiej manuskryptu, całokształt zaprezentowanego tekstu, jego układ, proporcje pomiędzy rozdziałami oraz styl świadczy o przyswojeniu przez Autorkę reguł opisu badań naukowych w formie monografii oraz spełnia kryteria zwyczajowo przyjęte dla rozprawy doktorskiej.

2. Ocena merytoryczna:

Przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej jest próba wykorzystania technik cytometrii masowej i cytometrii masowej z obrazowaniem w powiązaniu z oznaczeniem cytokin, oznaczeniem ekspresji i aktywności proteaz do kompleksowej oceny zmienności prób biologicznych takich jak komórki krwi, izolowane komórki guzów nowotworowych i adipocyty towarzyszące nowotworowi i utrwalone skrawki tkanek pozyskanych od pacjentek chorujących na raki piersi. Praca ma charakter eksploracyjny, określa możliwości zastosowania powyższej technologii do wieloparametrycznej charakterystyki fenotypowej obejmującej oznaczenie ekspresji antygenów różnicowania komórkowego i białek cytoszkieletu w powiązaniu z określaniem ekspresji i aktywności enzymatycznej proteaz obecnych wewnątrz komórek jak i związanych z macierzą zewnątrzkomórkową. Uzyskane w toku pracy dane eksperymentalne o profilu ekspresji proteaz posłużyły Autorce do poszukiwania wzorców molekularnych, potencjalnie użytecznych w przewidywaniu przebiegu choroby, wrażliwości bądź oporności na leczenie lub w ewentualnym wyborze strategii leczenia spersonalizowanego.

Obecnie, diagnostyka kliniczna nowotworów piersi poza badaniami obrazowymi obejmuje oznaczenie ekspresji receptora estrogenowego (ER), receptora progesteronowego (PR), ludzkiego naskórkowego receptora wzrostu 2 (HER2) i markera proliferacji Ki-67, a w stadiach zaawansowanej choroby także markerów towarzyszących komórkom nowotworowym CA 15-3, CA 27-29 i CEA. Pomimo często zbliżonej charakterystyki molekularnej komórek nowotworowych, występuje wysoka zmienność osobnicza przebiegu choroby i odpowiedzi na leczenie co sugeruje przemożny wpływ mikrośrodowiska nowotworowego. Mikrośrodowisko guza nowotworowego tworzą zarówno same komórki (np. komórki nowotworowe, naciekające leukocyty, fibroblasty związane z nowotworem, komórki śródbłonkowe, adipocyty), ale także wytwarzane przez nie cytokiny i enzymy oraz elementy macierzy zewnątrzkomórkowej. Oznaczenie składu mikrośrodowiska guza w powiązaniu z technikami wysokoprzepustowej analizy danych stanowi niezbędny krok na drodze do lepszego poznania parametrów wpływających na przebieg choroby i w perspektywie skuteczniejszej planowanie terapii. W związku z powyższym uważam, że tematyka ocenianej rozprawy doktorskiej jest zasadna z punktu widzenia rozwoju



nauk biomedycznych i wpisuje się w aktualne trendy badań nad udoskonaleniem metod diagnostyki raka piersi.

We wstępie rozprawy doktorskiej zatytułowanym „The need of multiparametrical analysis” dokonano wyczerpującego przeglądu aktualnej literatury dotyczącej podstaw teoretycznych zastosowań cytometrii masowej i cytometrii masowej z obrazowaniem w naukach biomedycznych wraz z krytyczną analizą ich możliwości oraz ograniczeń. Dla biologa przyzwyczajonego do organoleptycznej oceny morfologii komórkowej, technika redukująca finezyjnie utkaną strukturę komórki do chmury zjonizowanej plazmy budzi niepokój. Dopiero jednak możliwości jakie otwiera analiza wieloparametryczna pozwala docenić przewagę tej techniki nad cytofluorymetrią przepływową oraz nad technikami immunofluorescencji na skrawkach mrożeniowych. Autorka w bardzo przystępny sposób wprowadza czytelnika w technikę cytometrii masowej opisując podstawy fizyczne i historię jej rozwoju, objaśnia także metody akwizycji danych, eliminacji błędów systematycznych wynikających z użycia różnych partii przeciwciał (ang. batch effects), dyskutuje tworzenie koniugatów przeciwciał z izotopami metali za pomocą różnych łączników, oraz zasady doboru paneli przeciwciał do konkretnych zastosowań, zwraca uwagę na ograniczenia metody (np. dotyczące liczby analizowanych komórek, czułości pomiarów). Osobne rozdziały poświęca także wykorzystaniu cytometrii masowej do analizy cyklu komórkowego, żywotności komórek i aktywności enzymatycznej proteaz za pomocą sond wiążących się z centrami aktywnymi enzymów (m.in. znakowanych lantanowcami sond TOF). W kolejnych podrozdziałach zawarła przegląd proteaz, ich roli w biologii nowotworów, oraz perspektyw wykorzystania proteaz w onkologii. Na koniec omawia epidemiologię raka piersi na świecie i w Polsce, wymienia czynniki ryzyka, a także przedstawia aktualną immunohistochemiczną klasyfikację raków piersi. Wstęp zamyka bardzo ciekawy rozdział poświęcony przykładom klinicznego wykorzystania technik cytometrii masowej i cytometrii masowej z obrazowaniem. Całość wstępu stanowi bardzo dobre wprowadzenie do dalszych rozdziałów pracy. Autorka korzysta z odnośników do najnowszej literatury przedmiotu. Rzetelnie i krytycznie przedstawia informacje dotyczące wykorzystania cytometrii masowej w diagnostyce raka piersi.

Głównym pytaniem badawczym wyrażonym w rozdziale „Research Aims and Objectives” na stronie 57 jest czy cytometria masowa połączona z profilowaniem enzymów proteolitycznych może wspomóc bardziej skuteczną stratyfikację pacjentek [chorych na raka piersi przypis recenzenta]. Moim zdaniem, uzyskanie definitywnej odpowiedzi na tak postawione główne pytanie badawcze jest bardzo trudne w ramach trwającej około 4 lat pracy doktorskiej. Wynika to z faktu, że potwierdzeniem „lepszego stratyfikacji pacjentek”, co Autorka zauważa na stronie 228, w rozdziale „Conclusions and future works” ,



mogłaby być analiza retrospektywna pięcioletniego przeżycia lub indywidualnego przebiegu choroby w poszczególnych grupach pacjentek, która z racji zbierania prób do badań w latach 2021-2023 byłaby możliwa dopiero w latach 2026-2028. Z kolei przy nieco mniej konserwatywnym sformułowaniu hipotezy badawczej, realizacja niektórych tylko z 10 celów szczegółowych, opisanych na stronie 58 z nawiązką spełniałaby kryteria rozprawy doktorskiej.

W rozdziale „Methodology” scharakteryzowano kryteria włączenia pacjentek do badania i sposób pozyskania materiału biologicznego które nie budzą zastrzeżeń, podobnie jak szczegółowy opis metod koniugacji przeciwciał, opisy sposobu barwienia leukocytów krwi obwodowej, strategii bramkowania głównych populacji leukocytów krwi obwodowej i leukocytów naciekających guzy nowotworowe, izolacji i barwienia komórek z guzów nowotworowych oraz skrawków utrwalonych tkanek. Wyjaśnienia wymaga metoda miareczkowania przeciwciał swoistych dla markerów immunologicznych na leukocytach z krwi zdrowych dawców opisana na stronie 61. Dlaczego nie pokazano tych danych i czy dane te były zgodne z oczekiwanymi proporcjami głównych populacji leukocytów (np. stosunkiem limfocytów CD4 do CD8?). Pytanie to wydaje mi się zasadne w kontekście opisywanej przez Autorkę utraty swoistości niektórych przeciwciał po ich sprzęganiu z izotopami metali. Poza tym analiza leukocytów krwi zdrowych dawców równoległe do leukocytów krwi pacjentek byłaby również kontrolą pozwalającą na dodatkową weryfikację niektórych, bardzo cennych obserwacji dotyczących, np. zwiększonej liczby limfocytów B w 2 grupie pacjentek (str.101). Opisane szczegółowo w podrozdziale 3.3 strategię normalizacji danych, analizy statystycznej, szczególnie algorytmu t-SNE nie jestem w stanie ocenić, gdyż metodyka ta wychodzi poza moją ekspertyzę.

Rozdział „Results” został podzielony na cztery części dotyczące odpowiednio analizy krwi, komórek nowotworowych, ekspresji i lokalizacji proteaz w tkance nowotworowej i adipocytach związanych z tą tkanką a także analizy aktywności enzymów proteolitycznych w skrawkach mrożeniowych z tkanki nowotworowej. Porównywano materiał pobrany od pacjentek po chemioterapii neoadjuwantowej, przed chirurgiczną resekcją guzów (pierwsza grupa pacjentek) oraz materiał od pacjentek nie poddanych terapii neoadjuwantowej, u których leczenie rozpoczęto od resekcji guzów (druga grupa pacjentek). W mojej ocenie wybór powyższego protokołu badawczego jest obarczony efektami chemioterapii neoadjuwantowej, które mogą dotyczyć struktury guzów nowotworowych, obniżenia żywotności komórek nowotworowych oraz mogą mieć wpływ na zmniejszenie różnorodności populacji limfocytów, a także zmiany profilów cytokin wynikające po części z aktywacji układu odporności przez obumierające komórki nowotworowe oraz przez zastosowane terapeutyczne przeciwciała monoklonalne anty HER2. Moim

zdaniem bardziej miarodajne byłoby porównanie pierwszej grupy pacjentek przed rozpoczęciem leczenia neoadjuwantowego lub też ograniczenie analiz do drugiej grupy pacjentek i odniesienie wyników do zdrowych kontroli, szczególnie w świetle nadreprezentacji różnych populacji limfocytów B wykazanej na rycinie 4.5 i mogącej świadczyć o aktywacji układu odporności humoralnej przez neoantygeny nowotworowe. Powyższe obserwacje byłyby spójne z doniesieniami prezentowanymi na przykład przez Tsuda, B. i wsp. [Breast Cancer. 2017 Dec 4;25(3):284–291. doi: 10.1007/s12282-017-0824-6]. Niemniej jednak przedstawione analizy stanowią bardzo cenny materiał źródłowy do dalszych badań, szczególnie retrospektywnych, kiedy dostępne będą dane o skuteczności leczenia i czasie przeżycia pacjentek. Chciałbym podkreślić, że przedstawione w tej części pracy dane oraz ich analiza statystyczna nie budzą zastrzeżeń technicznych, pokazują biegłość Autorki w przeprowadzaniu wieloparametrycznych analiz z zastosowaniem cytometrii masowej oraz zaawansowanej analizy statystycznej. Dodatkowo świadczą o ogromie pracy związanym ze zbieraniem danych od 67 pacjentek. Wykazane przez Autorkę indywidualne różnice w profilu proteaz nadreprezentowanych w niektórych guzach mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie w leczeniu spersonalizowanym lub stanowić użyteczną klinicznie informację o przebiegu choroby.

W dyskusji Autorka konfrontuje uzyskane własne wyniki badań z wynikami dostępnymi w literaturze. W sekcji 5.2.1 przedstawia szczegółową analizę korelacji wyników własnych z danymi klinicznymi. Ten rozdział moim zdaniem powinien zostać przeniesiony do rozdziału „Results”. Ciekawie przeprowadzono dyskusję nielicznych rozbieżności pomiędzy wynikami oznaczeń receptorów HER, PR, ER za pomocą cytometrii masowej, a tradycyjnie oznaczanymi klinicznie metodami immunohistochemii i FISH. Autorka zwraca uwagę na heterogeny charakter guzów oraz na czułość detekcji poszczególnych antygenów oraz potrzebę zastosowania komplementarnych metod (IHC, FISH) minimalizujących kwestie dostępności antygeny HER dla przeciwciał. Na uwagę zwraca też przeprowadzenie dyskusji dotyczącej wstępnych oznaczeń aktywowemu (tj. aktywnych enzymatycznie proteaz) za pomocą pionierskiej metody prof. Poręby z zastosowaniem znakowanych izotopami metali sond TOF i systemu Hyperion. Wykazana kolokalizacja aktywności enzymatycznej oraz nadekspresji endogennych inhibitorów tychże enzymów stanowi ważną przesłankę do dalszego rozwoju tej technologii w kontekście klinicznym.

3. Podsumowanie:

Podsumowując, przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska, stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę Doktorantki oraz umiejętność samodzielnego



prowadzenia przez Nią badań naukowych. Prezentowane badania stanowią zarówno cenny zasób biologiczny do dalszych analiz retrospektywnych, ale także są oryginalnym wkładem do diagnostyki molekularnej raka piersi. Pokazują możliwości technologiczne spektroskopii masowej oraz uzupełniają istniejącą wiedzę na temat różnorodności wzorów ekspresji proteaz w rakach piersi, co w mojej opinii przyczynia się do postępu w dyscyplinie naukowej reprezentowanej przez Doktorantkę.

4. Wniosek końcowy:

W mojej ocenie przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. z 2024 r. poz. 1571). Dlatego przedkładam wysokiej Radzie Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej wniosek o dopuszczenie mgr inż. Natalii Ćwilichowskiej-Puśleckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Arkadiusz Miązek