

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Natalii Ćwilichowskiej-Puśleckiej

pt. „Dissecting the proteolytic fingerprint in breast cancer using mass cytometry”

Rozprawa doktorska została przygotowana pod kierunkiem dr hab. inż. Marcina Poręby, prof. uczelni w Katedrze Chemii Biologicznej i Bioobrazowania Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej

Rak piersi jest jednym z najczęściej występujących nowotworów u kobiet na całym świecie, stanowiąc poważne wyzwanie dla systemu opieki zdrowotnej. Pomimo znacznego postępu w diagnostyce i terapii, wiele pacjentek wciąż zmagą się z trudnościami w odpowiedzi na leczenie, co prowadzi do wysokiego wskaźnika nawrotów oraz ograniczonej jakości życia po zakończeniu terapii. W związku z tym, istnieje pilna potrzeba zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw tych niekorzystnych wyników, co może przyczynić się do opracowania bardziej skutecznych strategii diagnostycznych i terapeutycznych. W kontekście badań nad rakiem piersi, enzymy proteolityczne odgrywają kluczową rolę, zarówno w procesach biologicznych związanych z nowotworem, jak i w potencjalnych zastosowaniach diagnostycznych.

Proteazy, czyli enzymy odpowiedzialne za rozkład białek, są zaangażowane w wiele procesów biologicznych, w tym w regulację cyklu komórkowego, migrację komórek, a także w procesy związane z inwazją i metastazą. W przypadku raka piersi, proteazy mogą wpływać na zdolność komórek nowotworowych do rozprzestrzeniania się w organizmie, co czyni je istotnymi markerami prognostycznymi. Badania wykazały, że aktywność proteaz może być związana z agresywnością nowotworu oraz odpowiedzią na terapię, co podkreśla ich potencjał jako narzędzi diagnostycznych.

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie badaniami nad proteolitycznym odciskiem palca (proteolytic fingerprinting) w kontekście nowotworów. Ta technika, łącząca analizy proteaz z nowoczesnymi metodami obrazowania, takimi jak cytometria masowa, może dostarczyć cennych informacji na temat mikrośrodowiska guza oraz jego interakcji z układem odpornościowym. Cytometria masowa, jako technika umożliwiająca jednoczesne badanie wielu parametrycznych cech

komórek, stwarza możliwości dokładnej analizy kompozycji komórkowej i aktywności enzymatycznej w próbkach krwi i tkankach nowotworowych.

W obliczu rosnącej liczby zachorowań na raka piersi oraz wyzwań związanych z jego leczeniem, coraz bardziej istotne staje się poszukiwanie innowacyjnych rozwiązań, które mogą wspierać lekarzy w podejmowaniu decyzji terapeutycznych. Zrozumienie roli enzymów proteolitycznych w kontekście nowotworów piersi oraz ich potencjalne zastosowanie w diagnostyce stanowi obiecujący kierunek badań, który może prowadzić do lepszego dostosowania terapii do indywidualnych potrzeb pacjentek. W kontekście powyższych zagadnień, praca doktorska Pani Ćwilichowskiej-Puśleckiej wpisuje się w aktualny nurt badań nad zastosowaniem cytometrów masowych i profilowania proteolitycznego w celu skuteczniejszej stratyfikacji pacjentek. Recenzowana praca miała na celu nie tylko wypełnienie luki w wiedzy na temat proteaz w raku piersi, ale również dostarczenie praktycznych narzędzi, które mogą być wykorzystane w codziennej praktyce klinicznej (choć cytometrów masowych niestety nie ma za dużo).

Doktorantka otworzyła swoją pracę dokorską cytatem Marii Skłodowskiej-Curie: *„Jestem wśród tych, którzy uważają, że nauka ma wielkie piękno. Naukowiec w swoim laboratorium nie jest tylko technikiem, jest także dzieckiem stojącym przed zjawiskami natury, które wywierają na nim wrażenie niczym baśń”*. Cytat ten doskonale oddaje ducha badań prowadzonych przez Doktorantkę, które połączyły fascynację nauką i dążenie do zrozumienia zjawisk biologicznych, które mogą mieć realne przełożenie na życie pacjentów. Warto wspomnieć, że Maria Skłodowska-Curie była pionierką w leczeniu nowotworów, inicjując metodę zwaną curioterapią. Dzisiejsze badania Pani mgr inż. Ćwilichowskiej-Puśleckiej kontynuują misję naszej noblistki, sięgając po nowoczesne technologie. Obie Panie połączył ten sam cel: poprawa jakości życia pacjentów poprzez naukę opartą na wnikliwej obserwacji natury i nowatorskich metodach terapeutycznych na miarę swoich czasów.

Recenzowana rozprawa doktorska została napisana w języku angielskim i liczy łącznie 270 stron, z czego około 20 stron stanowi bogata bibliografia. Tak rozbudowany dział literaturowy obejmuje 195 pozycji piśmiennictwa, co zasługuje na szczególne uznanie. Zdecydowana większość cytowań dotyczy współczesnych publikacji naukowych odnoszących się do części teoretycznej pracy, co świadczy o tym, że Doktorantka przeprowadziła wnikliwy i niezwykle aktualny przegląd literatury, uwzględniając najnowsze doniesienia.

Pod względem edytorskim praca nie budzi zastrzeżeń. Ilustracje, schematy, zdjęcia i wykresy zostały przygotowane z dużą dbałością o szczegóły. Szczególnie pozytywnie należy ocenić liczne mapy t-SNE, które są czytelne, dobrze opisane i wnoszą istotną wartość interpretacyjną, pozwalając na intuicyjne zrozumienie złożonych zależności przestrzennych oraz fenotypowych w badanych populacjach komórkowych. Zauważyłam jednak, że w kilku rycinach podpisy oraz niektóre elementy graficzne zostały przedstawione czcionką o bardzo małej wielkości, co niekiedy utrudniało mi ich komfortowe odczytanie. W pracy Doktorantka przedstawiła jedynie skrócony spis treści obejmujący

wyłącznie główne rozdziały, bez wyszczególnienia podrozdziałów i elementów głębszej struktury rozdziałów. Przy tak złożonej i wielowymiarowej tematyce brak pełnego spisu treści znacząco utrudnia orientację w układzie pracy, a nie jest dla mnie jasne, czemu miało służyć takie ograniczenie. Ponadto Doktorantka zastosowała bardzo dużą liczbę skrótów, zwłaszcza odnoszących się do populacji komórek immunologicznych, które nie zostały zebrane i zestawione w formie tabeli lub listy skrótów. W przypadku pracy interdyscyplinarnej, adresowanej do szerokiego grona odbiorców naukowych, takie zestawienie byłoby niezwykle pomocne i znacząco poprawiłoby czytelność tekstu.

Należy również podkreślić, że praca doktorska była realizowana w ramach projektu SONATA finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (grant nr 2018/31/D/NZ5/02406), którego kierownikiem jest promotor dysertacji dr hab. Marcin Poręba, prof. uczelni PWr.

Pierwszy rozdział pracy („The need of multiparametrical analysis”) stanowi rozbudowane i dobrze udokumentowane wprowadzenie w problematykę badań. Doktorantka zaprezentowała szeroką wiedzę z zakresu immunologii nowotworów oraz metod analitycznych. Z dużą swobodą połączyła zagadnienia z różnych dziedzin, pokazując wielowymiarowo, że zrozumienie biologii nowotworów wymaga integracji różnych danych klinicznych. Szczególnie cenne jest wskazanie przez Kandydatkę luki badawczej czyli braku systemowych analiz łączących aktywność proteaz z ich ekspresją i kontekstem tkankowym. Doktorantka wykazała się umiejętnością krytycznego przeglądu literatury. Trafnie wskazała ograniczenia metod konwencjonalnych, takich jak immunohistochemia czy cytometria przepływowa, które nie pozwalają na analizę kilkudziesięciu parametrów jednocześnie. Wprowadzenie kończy się wyraźnie sformułowaną potrzebą zastosowania podejścia wieloparametrycznego i wysokowymiarowego, co w pełni uzasadnia wybór tematu pracy. Na szczególne podkreślenie zasługuje nowatorskie podejście do proteaz. Doktorantka nie traktuje ich jedynie jako biernych biomarkerów, lecz jako aktywnych uczestników procesów biologicznych czyli regulatorów odpowiedzi immunologicznej, inwazji nowotworowej i remodelingu macierzy zewnątrzkomórkowej. Tego typu ujęcie ma wymiar nie tylko naukowy, ale i translacyjny. Jako recenzentka zwracam jedynie uwagę, że warto byłoby jednoznacznie określić, czy klasyfikacja proteaz, przyjęta w tej części pracy, opiera się głównie na ich funkcji biologicznej czy na dostępności specyficznych sond ABP (activity-based probes), gdyż w tekście przedstawiono oba podejścia równolegle.

W drugim rozdziale („Research Aims and Objectives”) został sformułowany cel pracy którym było **opracowanie i ocena nowatorskich metod analizy proteaz oraz zastosowanie cytometrii masowej w charakterystyce biologicznej raka piersi**. Cele szczegółowe jakie postawiła sobie Doktorantka obejmowały m.in. identyfikację „proteolitycznego odcisku palca” w krwi obwodowej i tkankach guza BC, zastosowanie cytometrii masowej do analizy aktywności i koekspresji proteaz oraz ocenę korelacji pomiędzy profilami proteazowymi a markerami klinicznymi w następujących nowotworach: HER2, ER i Ki-67. Mgr inż. Ćwilichowska-Puślecka przyjęła podejście całościowe tj. połączyła dane pochodzące z różnych poziomów organizacji biologicznej, co pozwoliło jej lepiej

zrozumieć rolę proteaz w patogenezie raka piersi. Cele badawcze jakie sobie postawiła Doktorantka były niezwykle ambitne ale realistyczne, a ich realizacja została uzasadniona w kontekście możliwości technicznych laboratorium i dostępie do odpowiedniej aparatury.

W rozdziale trzecim („Methodology”) Doktorantka opisała procedury obejmujące izolację komórek krwi obwodowej i tkanek guza, przygotowanie próbek FFPE i OCT, profilowanie proteaz przy użyciu sond ABP oraz przeciwciał znakowanych metalami, a także analizy cytokin metodą Luminex i analizę danych z wykorzystaniem metod PCA, t-SNE, UMAP. Autorka samodzielnie opracowała i zoptymalizowała panele przeciwciał oraz protokoły przygotowania próbek, co świadczy o jej dużym doświadczeniu eksperymentalnym i umiejętności pracy w zaawansowanym środowisku badawczym. Zastosowane metody są opisane przejrzysto, a ich dobór jest trafny i uzasadniony. W części metodologicznej zabrakło mi jedynie doprecyzowania, dlaczego w niektórych przypadkach próbki OCT nie były łączone z barwieniem przeciwciałami klinicznymi (np. HER2), mimo że w tekście Doktorantka wspomniała o braku kompatybilnych klonów co warto wyjaśnić i czy próbowała obejść ten problem metodologicznie.

Rozdział czwarty („Results”) stanowi zasadniczą część pracy. Wyniki badań zostały przedstawione w sposób logiczny, klarowny i przemyślany. W części dotyczącej krwi obwodowej Autorka przeprowadziła kompleksową analizę ekspresji i aktywności proteaz w komórkach odpornościowych oraz profilowania cytokin w osoczu. Analiza PCA pozwoliła Doktorantce na wyodrębnienie dwóch odmiennych fenotypów immunologiczno-proteolitycznych pacjentek, co miało potencjalne znaczenie diagnostyczne i prognostyczne. W analizie PCA krwi należałoby jedynie wskazać, w jaki sposób uwzględniono wpływ terapii neoadiuwantowej.

Wyniki uzyskane przez Doktorantkę w analizie tkanek nowotworowych dowiodły wysokiej heterogeniczności proteolitycznej guzów. Autorka zidentyfikowała profile specyficzne dla podtypów raka piersi oraz powiązała aktywność katepsyn B, D, S i L z markerami proliferacyjnymi i klinicznymi, takimi jak HER2 czy Ki-67. To nowatorskie podejście pozwoliło na bardziej szczegółowe zrozumienie zależności między aktywnością enzymatyczną a agresywnością nowotworu.

Zastosowanie obrazującej cytometrii masowej (IMC) umożliwiło przestrzenne mapowanie proteaz w obrębie tkanek FFPE. Doktorantka wykazała, że katepsyna B lokalizuje się głównie na granicach guza, natomiast katepsyna D występuje także w adipocytach związanych z nowotworem (CAA). Takie obserwacje mają znaczenie dla rozwoju terapii celowanych, zwłaszcza koniugatów lek-przeciwciała (ADC) z odpowiednio dobraną sekwencją aminokwasową dedykowaną odpowiedniemu enzymowi.

Wreszcie, w badaniach na tkankach OCT z użyciem sond aktywności, Doktorantka zademonstrowała możliwość wykrywania aktywnych form proteaz bezpośrednio w kontekście tkankowym. Jest to rezultat wyjątkowo cenny, ponieważ przesunął analizę z poziomu proteomu na poziom aktywowemu, czyli funkcjonalnej aktywności enzymów. Wyniki te mają wysoką wartość naukową i praktyczną. Świadczą o dojrzałości eksperymentalnej i umiejętności krytycznej

interpretacji danych. Proszę jedynie o wyjaśnienie, czy obserwowane różnice w ekspresji katepsyn pomiędzy komórkami guza a CAA korelują ze stadium klinicznym nowotworu.

Rozdział piąty („Discussion”) jest napisany bardzo dojrzałe. Doktorantka nie ograniczyła się do porównania swoich wyników z literaturą, lecz przeprowadziła głęboką analizę biologiczną i kliniczną uzyskanych danych. Wykazała, że aktywność proteaz w komórkach krwi może stanowić biomarker systemowej odpowiedzi immunologicznej, natomiast analiza tkanek guza ujawnia ich zróżnicowaną rolę w mikrośrodkowisku nowotworowym. Autorka trafnie zauważyła, że brak korelacji pomiędzy klastrami uzyskanymi w krwi i w guzach potwierdza wielopoziomową organizację biologii nowotworu i konieczność integracji danych pochodzących z różnych źródeł.

W dalszej części pracy Doktorantka wskazała na potencjalne kierunki praktycznego zastosowania wyników czyli wykorzystanie proteaz jako biomarkerów predykcyjnych, rozwój sond kompatybilnych z IMC i OCT oraz projektowanie leków aktywowanych proteolitycznie. Dyskusja zawiera również krytyczną refleksję nad ograniczeniami metody jakimi są wpływ mikrośrodkowiska guza na aktywność enzymatyczną oraz brak standaryzacji cytometrii masowej w zastosowaniach klinicznych. Uważam jednak, że są to kwestie, które z czasem zostaną przewyżczone wraz z rozwojem technologii laboratoryjnych i odpowiednim przygotowaniem kadry naukowej.

W szóstym rozdziale („Conclusions and Future Perspectives”) Doktorantka podsumowała osiągnięcia pracy w sposób przejrzysty i zgodny z założonymi celami. Do najważniejszych osiągnięć naukowych należą:

- (1) opracowanie wieloparametrycznego panelu łączącego analizę proteaz, markerów immunologicznych i klinicznych,
- (2) identyfikacja „proteolitycznych odcisków palca” w krwi i tkankach guza,
- (3) wykazanie, że aktywność proteaz ma większe znaczenie informacyjne niż ich sama ekspresja,
- (4) pionierskie zastosowanie sond aktywności w analizach tkanek OCT,
- (5) wskazanie potencjalnego zastosowania proteaz jako biomarkerów predykcyjnych w raku piersi.

Wyniki badań przedstawionych w rozprawie doktorskiej mgr inż. Natalii Ćwilichowskiej-Puśleckiej znalazły odzwierciedlenie w dwóch publikacjach naukowych bezpośrednio związanych z tematyką dysertacji, z których jedna została już opublikowana w renomowanym czasopiśmie *Molecular Aspects of Medicine* (IF: 10,6; 140 pkt MEiN), a druga znajduje się w fazie przygotowania do druku. Wysoki IF czasopisma, w którym ukazała się publikacja, świadczy o międzynarodowym zasięgu prowadzonych badań oraz ich znaczeniu dla środowiska naukowego zajmującego się diagnostyką nowotworów i farmakologią proteaz.

Ponadto Doktorantka jest współautorką co najmniej siedmiu dodatkowych publikacji w czasopiśmie z listy JCR, o łącznym IF przekraczającym 45 (m.in. *Frontiers in Immunology* IF: 5,9; *British Journal of Haematology* IF: 5,1; *Cell Chemical Biology* IF: 7,2; *International Journal of Gynecological Cancer* IF: 5,1). Część z tych prac została już opublikowana, a kolejne znajdują się w recenzji. Mgr inż. Ćwilichowska-Puślecka zaprezentowała wyniki swoich badań na co najmniej 17 konferencjach naukowych, w tym na prestiżowych wydarzeniach międzynarodowych, takich jak Gordon Research Conference czy General Meeting of the International Proteolysis Society. Szczególnie należy podkreślić liczne wystąpienia ustne oraz udział w sesjach typu *flash talk*, co jest wyróżnieniem przyznawanym jedynie najlepszym zgłoszeniom konferencyjnym. Za swoją działalność naukową mgr inż. Ćwilichowska-Puślecka została uhonorowana nagrodami i stypendiami, m.in. stypendium za wybitne osiągnięcia naukowe (Uniwersytet Wrocławski, 2022) oraz dwoma prestiżowymi nagrodami konferencyjnymi za najlepszy poster i wystąpienie ustne. Uzyskanie Travel Award na konferencję Gordon Research Seminar oraz nagrody FEBS Proteolysis 2024 świadczy o wysokim poziomie prezentowanych badań oraz aktywnym uczestnictwie w międzynarodowym środowisku.

Podsumowując, recenzowana rozprawa doktorska mgr inż. Natalii Ćwilikowskiej-Puśleckiej spełnia w pełni wszystkie ustawowe kryteria przewidziane dla rozpraw doktorskich, a jej wysoka wartość merytoryczna, nowatorskie podejście badawcze, interdyscyplinarny charakter oraz znakomity poziom wykonania eksperymentalnego pozwalają na jednoznaczne stwierdzenie, że Autorka zasługuje na nadanie jej stopnia doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie chemia. Dysertacja stanowi przykład dojrzałego, kompleksowego i niezwykle świadomego naukowego ujęcia problematyki proteolitycznych mechanizmów regulujących mikrośrodowisko nowotworów, a w szczególności raka piersi, z wykorzystaniem najnowocześniejszych technik cytometrii masowej i obrazującej. Doktorantka wykazała się umiejętnością samodzielnego projektowania oraz realizacji złożonych badań o charakterze translacyjnym, integrujących wiedzę z zakresu chemii bioorganicznej, biologii komórki, immunologii, onkologii molekularnej i bioinformatyki.

Biorąc pod uwagę powyższe, stwierdzam, że rozprawa mgr inż. Natalii Ćwilikowskiej-Puśleckiej spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2024 r. poz. 1571), i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Chemia Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie jej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie chemia.

Uzasadnienie wniosku o wyróżnienie rozprawy doktorskiej

Rozprawa mgr inż. Natalii Ćwilikowskiej-Puśleckiej wyróżnia się wyjątkowo wysokim poziomem merytorycznym, nowatorskim podejściem badawczym oraz przełomowym znaczeniem uzyskanych wyników dla rozwoju medycyny spersonalizowanej. Autorka jako jedna z pierwszych na świecie przeprowadziła kompleksową analizę proteolitycznego „odcisku palca” raka piersi z wykorzystaniem cytometrii masowej i obrazującej, łącząc badania krwi obwodowej i tkanek guza w spójny, funkcjonalny model biologiczny. Praca ma wyraźny potencjał translacyjny i wdrożeniowy, a jej wyniki mogą realnie przyczynić się do rozwoju nowych narzędzi diagnostycznych i predykcyjnych. Ponadto imponujący dorobek publikacyjny Doktorantki, obejmujący prace w czasopismach o wysokim IF, oraz jej aktywność naukowa na arenie międzynarodowej wyraźnie przekraczają standardowe wymagania stawiane pracom doktorskim. Z tych względów wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Natalii Ćwilikowskiej-Puśleckiej jako pracy o szczególnej wartości naukowej i znaczącym znaczeniu dla rozwoju nowoczesnej chemii, biotechnologii i onkologii.

