

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Prof. dr hab. n. med. Ewa Zuba-Surma,
Zakład Biologii Komórki
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński

Kraków, 17.01.2025r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Długoleckiej

**pt. „Wyzwania związane z charakteryzacją metodami fluorescencyjnymi
pęcherzyków zewnątrzkomórkowych do zastosowań klinicznych
na przykładzie płynu z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego i osocza pacjentów
z podejrzeniem niedrobnokomórkowego raka płuc”**

wykonanej pod kierunkiem

Promotorki: dr hab. Małgorzaty Czystowskiej-Kuźmich

w Katedrze i Zakładzie Biochemii

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (z ang. *extracellular vesicles; EVs*) wydzielane przez komórki w tym komórki ludzkie różnego pochodzenia tkankowego, stanowią w ostatnim czasie istotny przedmiot badań licznych zespołów na świecie, jako ważne mediatory komunikacji międzykomórkowej oraz markery procesów zachodzących w tkankach. Jednym z istotnych obszarów badań nad EVs oraz nad ich znaczeniem m.in. jako markerów diagnostycznych, stanowią badania pęcherzyków pochodzących z komórek nowotworowych, wydzielanych do i krążących w płynach ustrojowych. Rosnąca liczba najnowszych badań światowych wskazuje, że EVs wydzielane przez komórki nowotworowe i identyfikowane w różnych płynach ustrojowych, w tym m.in. w osoczu i surowicy krwi obwodowej, mogą być istotnymi markerami świadczącymi m.in. o stadium rozwoju

i progresji danego typu nowotworu, w tym nowotworów litych oraz nowotworów układu krwiotwórczego.

W związku z rosnącą potrzebą oznaczania tego typu markerów diagnostycznych w materiale klinicznym, istotne staje się obecnie właściwe dobranie i zoptymalizowanie metod detekcji oraz oceny ilościowej i jakościowej EVs w materiale klinicznym relewantnym dla danego typu nowotworu, w oparciu o nowoczesne platformy dedykowane do badań nanocząstek, co wciąż stanowi wyzwanie dla badaczy. W tego typu badaniach wyzwanie stanowi nie tylko dobór samych metod detekcji EVs, ale także sposób wstępnego przygotowania materiału klinicznego, celem zminimalizowania zanieczyszczeń biologicznych mogących stanowić swego rodzaju „tło molekularne”, wpływając tym samym na poziom właściwego sygnału, pochodzącego od frakcji EVs. Jednakże dzięki wysiłkom podejmowany w tym obszarze przez grupy badawcze na całym świecie, opracowywane są nowe ważne protokoły o istotnym walorze diagnostycznym w onkologii.

Praca doktorska Pani mgr inż. Magdaleny Długoleckiej w pełni wpisuje się w ten niezwykle ważny obszar badawczy, koncentrując się na optymalizacji protokołów detekcji i ilościowej identyfikacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych obecnych w osoczu krwi obwodowej oraz płynie oskrzelowo-pęcherzykowym (ang. *Bronchoalveolar Lavage Fluid*, BALF) u pacjentów z podejrzeniem niedrobnokomórkowego raka płuc (NDRP), celem wykorzystania tego materiału klinicznego dla przyszłych celów diagnostycznych. Doktorantka w swoich badaniach podjęła się ważnego wyzwania, aby ocenić ilościowo i jakościowo obecność EVs w obu w/w płynach ustrojowych w szczególności z zastosowaniem analizy śledzenia nanocząstek z pomiarem fluorescencji (ang. *Fluorescence Nanoparticle Tracking Analysis*, f-NTA), jak również dokonała przeglądu szeregu technik i podejść istotnych dla wstępnego oczyszczania materiału klinicznego celem właściwej identyfikacji nanocząstek jakimi są EVs, w szczególności metodami opartymi o detekcję fluorescencji. Tym samym jej badania mogą się przyczynić w przyszłości do optymalizacji podejść diagnostycznych opartych o detekcję EVs z materiału od pacjentów z chorobami nowotworowymi, co ma istotne znaczenie praktyczne.

W skład przedstawionej mi do recenzji rozprawy wchodzi dwie spójne tematycznie publikacje o istotnym aspekcie poznawczym i praktycznym, w tym jedna (1) praca oryginalna oraz jeden (1) artykuł przeglądowy, opublikowane w międzynarodowych recenzowanych czasopismach naukowych o wysokich współczynnikach oddziaływania (IF), w tym odpowiednio jeden w czasopiśmie *Cells* (IF=7.666) oraz *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (IF=4.300), które przeszły już ocenę ekspercką przez niezależnych recenzentów.

We obu wspomnianych pracach Pani mgr inż. Magdalena Długolecka jest pierwszą autorką - ze znaczącym, odpowiednio 51% i 90%, udziałem Doktorantki w ich wykonaniu, co pozwala

potwierdzić, że Doktorantka miała kluczowy wkład w przedstawione prace eksperymentalne oraz ich przygotowanie do publikacji, a także opracowanie przeglądu aspektów istotnych dla standaryzacji oceny EVs w materiale klinicznym, z wykorzystaniem technik opartych o fluorescencję.

Wkład Doktorantki w przedstawione do oceny prace jest wiodący i nie budzi wątpliwości. Został przy każdej z publikacji wykazany stosownym udziałem procentowym, potwierdzonym także przez pozostałych współautorów wspomnianych artykułów naukowych.

Ocena formalna pracy:

Rozprawę doktorską rozpoczyna strona tytułowa wraz ze słowami kluczowymi oraz spis projektów badawczych, w których ją oceniam Doktorantka brała udział i w ramach których realizowała swoje badania. Po nich następuje *Wykaz publikacji* włączonych do rozprawy oraz *Spis treści* i *Wykaz skrótów*, po których następują *Streszczenia* pracy w języku polskim oraz angielskim, gdzie Doktorantka w sposób informatywny przedstawia główne osiągnięcia swojej pracy doktorskiej. Po nich następuje zwięzły 4-stronicowy *Wstęp*, w którym Doktorantka przedstawiła najważniejsze aspekty merytoryczne stanowiące tło dla przeprowadzonych przez nią badań, a następnie w rozdziale *Założenia i cel pracy* nakreśliła zwięzłe najważniejsze cele, które przyświecały przeprowadzonym przez nią badaniom oraz wymieniła metody i materiał kliniczny, jakie zastosowała w swoich badaniach. Następnie Doktorantka umieściła kopie obu publikacji (wraz z Suplementem do Publikacji nr 1), które wchodziły w skład jej rozprawy, a po nich umieściła 5-stronicowy rozdział *Podsumowanie i wnioski* obejmujący podsumowanie jej najważniejszych osiągnięć oraz wnioski z przeprowadzonych badań. Po nich następuje rozdział *Bibliografia* obejmujący 35 pozycji literaturowych, do których Doktorantka odnosi się w swojej rozprawie. Na końcu umieszczono *Oświadczenia współautorów publikacji*, ze wskazaniem przez nich stosownego wkładu procentowego każdego ze współautorów w publikacji przedstawione do oceny w niniejszej rozprawie.

Od strony formalnej rozprawa w przedstawionej formie spełnia w mojej ocenie wymogi stawiane tego typu pracom, stanowiącym cykl artykułów poświęconych danej tematyce.

Uwagi do części formalnej:

Do aspektów formalnych pracy mam jedną uwagę odnoszącą się do rekomendacji Rad Dyscyplin WUM, co do strony formalnej prac doktorskich, które w przypadku rozprawy doktorskiej składanej w formie cyklu publikacji sugerują wprowadzenie zwięzłego rozdziału dotyczącego *materiału i metod*. W pracy brakuje takiego rozdziału. Doktorantka wprowadziła wymienienia zwięzłe zastosowane przez nią metody oraz materiał badawczy w ramach rozdziału *Założenia i cel pracy*, ale w mojej ocenie - biorąc pod uwagę fakt, że jej praca doktorska dotyczy w szczególności optymalizacji kwestii metodycznych badań nad EVs, taki wyodrębniony rozdział metodyczny - z bardziej szczegółowym omówieniem

i uzasadnieniem wyboru zastosowanych metod i platform do oceny EVs, testowanych warunków przygotowania materiału biologicznego, które były optymalizowane, itp. – powinien się znaleźć w rozprawie. Myślę, że w trakcie obrony rozprawy takie przedstawienie aspektów metodycznych prowadzonych przez Doktorantkę badań będzie wskazane.

Ocena merytoryczna:

Ze względu na fakt, że zasadniczą część rozprawy doktorskiej stanowią artykuły naukowe, opublikowane już w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, które były poddane ocenie międzynarodowych ekspertów przed ich opublikowaniem - w tym w zakresie m.in. jakości, interpretacji i znaczenia prezentowanych wyników badań, poniższa ocena jako recenzenta rozprawy ma charakter dodatkowy. Ze swojej strony, po szczegółowym zapoznaniu się z przedstawionymi publikacjami Doktorantki, zaprezentowane wyniki badań oceniam wysoko.

W pierwszej z zaprezentowanych prac (Długolecka i wsp. *Cells*, 2021, 10, 3473; DOI: 10.3390/cells10123473; Publikacja 1), stanowiącej pracę oryginalną, Doktorantka skupiła się na ocenie detekcji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w osoczu oraz płynie BALF izolowanych od 34 pacjentów (18 kobiet i 16 mężczyzn) z podejrzeniem niedrobnokomórkowego raka płuc (NDRP), z zastosowaniem m.in. techniki NTA obejmującej pomiar fluorescencji (czyli f-NTA). Materiał pochodził od pacjentów z podejrzeniem nowotworu, u których nie wdrożono jeszcze leczenia (u 25-u potwierdzono następnie obecność NDRP, a u pozostałych postawiono inną diagnozę), ale których zakwalifikowano do zabiegu bronchoskopii, podczas której pobierano materiał (BALF) - w Instytucie Gruźlicy i Badań Płuc w Warszawie. Od tych samych pacjentów pobierano także krew, z której następnie izolowano osocze do dalszej preparatyki w celu izolacji EVs.

W pierwszej kolejności Doktorantka wyizolowała frakcje wzbogacone w EVs z obu materiałów klinicznych stosując różne metody izolacji (w tym wirowanie sekwencyjne z ultrawiwaniem oraz izolację kolumnową SEC), a następnie przeprowadziła ich wieloparametrową charakterystykę z zastosowaniem m.in. metod Western Blot, Cryo-TEM oraz cytometrii przepływowej, zgodnie z rekomendacjami Międzynarodowego Towarzystwa Pęcherzyków Zewnątrzkomórkowych (ISEV). Następnie zbadała obecność różnych subpopulacji EVs w wyizolowanych frakcjach w oparciu o ekspresję wybranych markerów egzosomalnych (CD63, CD9, CD81) z zastosowaniem wspomnianej metody f-NTA. Celem optymalizacji protokołów przygotowania materiału klinicznego do badań oraz pomiarów obecności EVs w izolatach, Doktorantka testowała różne warunki w tym kontrolne, gdzie m.in. próbki kontrolnych EVs były poddawane lizie, usuwano frakcję lipoprotein lub wybrane subpopulacje EVs wykazujące ekspresję wskazanych tetraspanin. Dzięki tym badaniom, Doktorantka scharakteryzowała skład izolatów nanocząstek pozyskanych z obu materiałów klinicznych pod względem wielkości nanocząstek, rozkładu subpopulacji, możliwych zanieczyszczeń, w tym

lipoproteinowych, oraz wykazała szereg ciekawych i potencjalnie istotnych klinicznie/ diagnostycznie różnic pomiędzy tymi izolatami, co będzie z pewnością istotnym krokiem do dalszych badań i optymalizacji protokołów diagnostycznych opartych o EVs.

Doktorantka podjęła także w ostatnim etapie próbę korelacji wyników uzyskanych badań z parametrami klinicznymi pacjentów. Nie udało się jej niestety wykazać żadnych istotnych korelacji pomiędzy zbadanymi parametrami izolatów EVs (pozwalających np. na rozróżnienie pacjentów w zależności od diagnozy), co Doktorantka słusznie interpretuje wpływem wciąż nie do końca zoptymalizowanych warunków oczyszczania preparatów EVs z materiału klinicznego, które zastosowała - w szczególności z osocza krwi pacjentów, które obok EVs zawiera szereg innych nanocząstek, w tym agregatów białkowych, lipoprotein i innych cząstek, które należy traktować jako zanieczyszczenia przy pomiarach EVs. Mimo to Doktorantce udało się zidentyfikować ważne aspekty i parametry, które należy wziąć w przyszłości pod uwagę przy dalszej optymalizacji pomiarów detekcji oraz analizy ilościowej i jakościowej EVs, wyizolowanych z materiału klinicznego jakim jest osocze lub BALF (zostały one później omówione w Publikacji nr 2), co stanowi istotny walor poznawczy i aplikacyjny pracy Doktorantki.

W drugiej publikacji: Długolecka & Czystowska-Kuzmicz, *Front Bioeng Biotechnol*, 2024, 12-24 (DOI: 0.3389/fbioe.2024.1479516; Publikacja nr 2), tematycznie ściśle powiązanej z Publikacją nr 1 - Doktorantka wraz ze swoją Promotorką, dokonała przeglądu i krytycznej analizy metod i szczegółowych podejść metodologicznych, które powinny być wzięte pod uwagę przy przygotowywaniu próbek materiału klinicznego (w tym osocza, czy surowicy pacjentów) w celu optymalnej detekcji i identyfikacji EVs w takim materiale klinicznym, aby taka analiza miała walor diagnostyczny i prognostyczny w klinice.

Na podstawie badań prowadzonych na świecie, Doktorantka dokonała szczegółowego i stanowiącego istotny walor dla badaczy zainteresowanych diagnostyką w oparciu o EVs – przeglądu szeregu metod używanych do detekcji EVs w oparciu o fluorescencję (Tabela 1), uwzględniając m.in. ich zalety i wady oraz koszty i zakres czułości jeśli chodzi o wielkość analizowanych nanocząstek. Omówiła także wybrane z tych metod, które mogą mieć w przyszłości szczególne znaczenie dla zastosowań w diagnostyce opartej o EVs. Wskazała także na wyzwania jakie są wciąż związane z właściwym przygotowaniem materiału klinicznego, w tym z wstępnym oczyszczaniem próbek, znakowaniem markerów EVs, odróżnienia właściwego sygnału pochodzącego od EVs od zanieczyszczeń reprezentowanych przez inne nanocząstki obecne w materiale klinicznym (tzw. “non-EVs”). Dokonała także przeglądu barwników fluorescencyjnych stosowanych obecnie do znakowania EVs, w tym w celu oceny ich integralności, znów przytaczając ich wady i zalety oraz możliwe zastosowania (Tabela 2). W ostatniej części wskazała także na wyzwania w zakresie optymalizacji metod detekcji EVs w

różnym materiale klinicznym, w szczególności dla celów diagnostycznych, na czym z pewnością Doktorantka będzie się także koncertować w swoich przyszłych badaniach.

W mojej ocenie Publikacja nr 2 stanowi ważne i obszerne kompendium wiedzy oparte o dotychczas prowadzone na świecie badania, które może być pomocne dla wielu badaczy do dalszych optymalizacji metod detekcji EVs m.in. w materiale klinicznym, w szczególności z uwzględnieniem metod opartych o pomiary fluorescencji. Jakość i wartość naukową publikacji oceniam bardzo wysoko.

Uwagi merytoryczne:

W czasie lektury rozprawy i publikacji, nasunęło mi się kilka pytań merytorycznych oraz metodycznych – w szczególności do publikacji eksperymentalnej, do których chciałabym, aby Doktorantka była uprzejma odnieść się w trakcie swojej obrony pracy:

1. Doktorantka w trakcie izolacji EVs zastosowała preparatykę wstępną obu materiałów klinicznych stosując m.in. krok wirowania z prędkością (g): 10K (dla osocza) i 25K dla BALF, co w mojej ocenie mogło doprowadzić do utraty części frakcji EVs z próbki, w szczególności większych ektosomów oraz onkosomów wydzielanych przez komórki nowotworowe, których rozmiary mogą dochodzić nawet do 1000nm. Mogło to być ew. przyczyną utraty EVs w izolatach pochodzących z BALF, a także braku zasadniczych różnic pomiędzy zawartością EVs w materiale pochodzącym z miejsc objętych nowotworem (cBALF) i miejsc zdrowych (oBALF). Czy Doktorantka brała/ bierze pod uwagę taką możliwość? Czy na jakimś etapie badań Doktorantka stosowała może w przypadku obu materiałów klinicznych inne warunki oczyszczania wstępnego, tj. bez kroku 10K i 25K?
2. Dlaczego Doktorantka zastosowała inne prędkości (g) wstępnego oczyszczania dla osocza (m.in. 10K) oraz BALF (m.in. 25K), a nie tę samą prędkość (np. 10K g)? Prosiłabym uprzejmie Doktorantkę o uzasadnienie.
3. Proste schematy, ale z porównaniem kroków proceduralnych, obejmujących w szczególności wszystkie warunki wirowania wstępnego, ultrawirowania i ew. oczyszczania na kolumnach (SEC) byłyby wskazane do przedstawienia dla obu materiałów (osocza i BALF) w trakcie obrony, aby dobrze przedstawić różnice w zastosowanych protokołach, które mogą też ew. wpływać na odzysk różnych frakcji EVs.
4. Czy biorąc pod uwagę, że zastosowany w badaniach znacznik CMDR może nie tylko wiązać się z błoną EVs, ale także z lipoproteinami stanowiącymi zanieczyszczenia (o czym Doktorantka wspomina także w publikacji dyskutując swoje wyniki), Doktorantka wykonywała może także barwienia, gdzie EVs znakowano jednocześnie barwnikiem błonowym (CMDR) oraz znacznikiem florescencyjnym wiążącym się z cytoplazmatyczną zawartością pęcherzyka (np. z zastosowaniem barwnika RNA-Select, wiążącego się do RNA), aby rzeczywiście potwierdzić i zbadać zawartość integralnych EVs (tj. podwójnie dodatnich) w badanych izolatach?

5. Ryc. 2c: Prosiłabym Doktorantkę o przedstawienie na obronie metody pomiaru obecności EVs z zastosowaniem kuleczek *Danabeads* w połączeniu z cytometrią przepływową oraz wyjaśnienie do czego odnoszą się wartości procentowe w takich analizowanych próbkach?
Do omówienia tej techniki i wyników na Ryc. 2c, proszę uprzejmie o zaprezentowanie histogramów z tego panelu, ale w formie kolorowej, ponieważ w wersji B&W (jak w publikacji) są one mało czytelne (np. legenda wskazuje 3 próbki nałożone na siebie, a na wykresach np. widać 4 piki, które trudno rozróżnić).
6. Ryc. 4a: O czym wg Doktorantki świadczy to, że w analizie FL-NTA identyfikowane nanocząstki CMDR+ są istotnie statystycznie większe od cząstek, kiedy one były analizowane bez pomiaru FL (w *scatter mode*)?
7. Czy w związku z tym, że po wybarwieniu próbek znacznikiem CMDR widzimy znacząco niższy odsetek obiektów CMDR+ w próbce pozyskanej z osocza względem próbek BALF, czy można mówić o tym, że rzeczywiście „liczba EVs” jest wyższa w próbkach z osocza niż w BALF? Co to mogą być za nanoobiekty o fenotypie CMDR-, które przeważają w próbkach pozyskanych z osocza (jak widać z pomiarów np. stężeń nanocząstek w badanych izolatach bez FL)?
8. Ryc. 9: Jak wyjaśnić, że po usunięciu lipoprotein nie zmienia się całkowita liczba nanocząstek wykrytych w izolatach z osocza w porównaniu z próbkami bez usuwania LP, a jednocześnie wzrasta liczba nanocząstek CMDR+ w próbkach LP-? Czy jest to możliwe? Co może za tym ew. stać?
9. Na Ryc. 10 podsumowującej badania w Publikacji 1, Doktorantka wskazuje, że lipoproteiny mogą wiązać (niespecyficznie?) przeciwciała anti-CD9. Czy są inne doniesienia w literaturze, wskazujące na taką możliwość? Co Doktorantce wiadomo na ten temat?
10. Czy biorąc pod uwagę brak korelacji pomiędzy zbadanymi parametrami izolatów EVs pozyskanych przez Doktorantkę, a parametrami klinicznymi pacjentów, Doktorantka brała pod uwagę lub prowadziła także badania, w których np. barwiono preparaty EVs przeciwko markerom samego nowotworu (np. EGFR, którego ekspresja jest zwiększona na powierzchni gruczolakoraków), aby zidentyfikować bardziej specyficznie EVs pochodzące ew. bezpośrednio z takich komórek nowotworowych?
11. I pytanie bardziej ogólne: Jaką dalszą strategię optymalizacji metod detekcji EVs jako markerów diagnostycznych w osoczu lub BALF od pacjentów z NDRP, proponowałaby Doktorantka, aby zwiększyć specyficzność analizy i zwiększyć prawdopodobieństwo korelacji wyników takich analiz z parametrami klinicznymi u tych pacjentów, co byłoby kontynuacją ew. dalszych badań Doktorantki?

Myślę, że odpowiedzi na powyższe pytania i wątpliwości będą dobrym punktem wyjścia do dyskusji o wynikach i znaczeniu badań Doktorantki w czasie obrony jej pracy.

Podsumowując, praca doktorska Pani mgr inż. Magdaleny Długoleckiej wpisuje się w ważny aspekt badań nanocząstek komórkowych (EVs) obecnych w materiale klinicznym, jako markerów diagnostycznych i prognostycznych, w tym diagnostyce nowotworów.

W swoich badaniach Doktorantka podjęła się zadania detekcji oraz analizy ilościowej i jakościowej EVs obecnych w osoczu i płynie oskrzelowo- pęcherzykowym (BALF) pacjentów z podejrzeniem niedrobnokomórkowego raka płuc (NDRP), w tym w szczególności z zastosowaniem metody f-NTA (opartej o fluorescencję), co mogłoby doprowadzić do opracowania protokołów dla celów diagnostycznych. W swoich badaniach uzyskała szereg istotnych wyników, które definiują dalsze obszary badań, w tym w zakresie krytycznych kroków, które muszą zostać zoptymalizowane, aby takie testy (oparte o EVs) mogły być opracowane i mieć znaczenie diagnostyczne. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki stanowią jej oryginalne osiągnięcie naukowe i niosą ważny wkład w rozwój nauk biomedycznych, w tym diagnostyki klinicznej i onkologii. W mojej ocenie, wyniki Doktorantki mogą mieć także w przyszłości istotne znaczenie praktyczne.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668) oraz wnoszę o dopuszczenie Pani mgr inż. Magdaleny Długoleckiej do dalszych etapów postępowania o nadanie jej stopnia naukowego doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.