



Dr hab. Katarzyna Piwocka, Profesor Instytutu Nenckiego PAN
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
Warszawa
e-mail:

Warszawa, 8.01.2025

**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”**

**Praca wykonana w Katedrze i Zakładzie Biochemii WUM pod kierunkiem
dr hab. n. med. n. o zdr. Małgorzaty Czystowskiej-Kuźmich**

Wydzielane przez komórki pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EVs) są istotnym elementem przekazywania informacji pomiędzy komórkami, także oddalonymi od siebie. Zawierają białka, lipidy, cząsteczki RNA, odzwierciedlając często stan fizjologiczny komórek, z których pochodzą. Specyficzna sygnatura EVs, także ze względu na łatwą dostępność tego materiału biologicznego, może mieć potencjalne znaczenie w diagnostyce. Wiele prowadzonych obecnie badań poświęconych jest temu zagadnieniu, i wiele z nich dotyczy chorób nowotworowych. W nurt tej problematyki wpisują się również badania prowadzone przez mgr. inż. Magdaleny Długolecką. Doktorantka zajęła się pęcherzykami EVs w niedrobnokomórkowym raku płuca (NDRP), który jest najczęstszym rodzajem raka płuca, stanowiącym ponad 80% przypadków. Jednym z najważniejszych aspektów postępowania z chorymi jest odpowiednio szybka diagnostyka nowotworu. Istotnym problemem w podjęciu terapii są ograniczenia diagnostyczne w tym częsta bezobjawowość na wczesnych etapach jego rozwoju, co prowadzi do postawienia diagnozy w późnym stadium choroby. Stąd podjęta przez mgr. inż. Magdaleny Długolecką tematyka pracy uważam za ważną i aktualną, a uzyskane wyniki mogą przyczynić się do stworzenia metod diagnostycznych i prognostycznych w przyszłości.

Rozprawa doktorska została przygotowana w oparciu o spójny tematycznie zestaw dwu publikacji – jedna wieloautorska praca eksperymentalna (opublikowana w czasopiśmie Cells) i jedna praca przeglądowa (opublikowana w czasopiśmie Front. Bioeng. Biotechnol. Sec. Nanobiotechnology). Nie jest to pokaźny dorobek jak na rozprawę doktorską w oparciu o publikacje, zwłaszcza, że w Autoreferacie nie znalazły się już żadne dodatkowe wyniki.

W obu pracach doktorantka jest pierwszą autorką. Praca eksperymentalna jest wieloautorska, a udział doktorantki określony jest jako 51% i merytorycznie jest to udział wiodący (obejmował udział w przygotowaniu koncepcji, przeprowadzenie badań, interpretację wyników, przeprowadzenie analizy statystycznej, napisanie manuskryptu, przygotowanie i opis figur). Nie wszyscy współautorzy dokładnie opisali merytorycznie swój wkład, opisując go jedynie jako: przeprowadzenie badań (8% w przypadku p. Łukasza Zaręby oraz p. Zuzanny Hamoncik). W mojej opinii w przypadku rozprawy z publikacji oświadczenia powinny zawierać dokładny merytoryczny i szczegółowy opis wkładu w powstanie publikacji, wraz z rycinami, w których wyniki zostały przedstawione. Jeżeli rozprawa bazuje tylko na jednej pracy eksperymentalnej, szczególnie ważna jest możliwość dokładnego określenia udziału doktoranta w jej



powstanie. Warto wspomnieć, że praca eksperymentalna opublikowana w 2021 roku ma 10 cytowań. Praca przeglądowa jest dwuautorska i tu udział doktorantki określono jako 90%.

Jako recenzent czuję się w obowiązku zaznaczyć, że jedyna praca eksperymentalna będąca podstawą rozprawy została opublikowana w czasopiśmie z grupy MDPI, należącej do tzw. czasopism drapieżnych („predatory”). Zaznaczam ten fakt, gdyż na temat tych czasopism toczy się poważna dyskusja, zarówno w Polsce jak i na świecie, a publikacje w tych czasopismach są obecnie nierekomendowane i nie są brane pod uwagę w wielu istotnych zestawieniach ze względu na wątpliwą jakość procesu edytorskiego i rewizyjnego. Zwraca na to też uwagę Narodowe Centrum Nauki. Świadomość tego zjawiska powinna rosnąć, a młode pokolenie naukowców powinno propagować wysokie standardy, i to jest moją intencją zawarcia tej uwagi w recenzji. Nie ma ona wpływu na ocenę wartości merytorycznej przedstawionych wyników i osiągnięcia doktorantki.

W skład rozprawy doktorskiej wchodzi, oprócz załączonych publikacji stanowiących podstawę doktoratu i oświadczeń współautorów, Autoreferat. Wstęp w sposób zwięzły, ale wyczerpujący wprowadza czytelnika w tematykę prowadzonych badań. Autorka zwraca też uwagę na aktualne problemy metodyczne w tym obszarze, związane z izolacją oraz charakteryzacją tych małych struktur. Następnie doktorantka prezentuje cel badań, którym była próba optymalizacji i walidacji analizy ilościowej oraz fenotypowej EVs izolowanych z płynów biologicznych - osocza oraz płynu z płukania oskrzelowopęcherzykowego pacjentów z podejrzeniem niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP). Szczegółowe cele dotyczyły: opracowania metod izolacji, porównania profilu EVs z krwi i BALF, określenie potencjału diagnostycznego izolowanych EVs, przedstawienie zalet i wad poszczególnych metod fluorescencyjnych oraz określenie wpływu metody izolacji oraz zanieczyszczeń na uzyskane wyniki. Przedstawione badania nie miały więc na celu weryfikacji hipotezy naukowej. Są to badania natury metodycznej, z istotnym potencjałem wykorzystania wyników w przyszłości w praktyce klinicznej. Cel ten został przedstawiony w sposób jasny.

W następnej części Autoreferatu przedstawiono bardzo skrótowo zawartość obu publikacji. Autoreferat kończy podsumowanie, do którego odniosę się w dalszej części recenzji.

Publikacja eksperymentalna: Długolecka M, Szymanski J, Zareba L, Homoncik Z, Domagala-Kulawik J, Polubiec-Kownacka M, et al. Characterization of Extracellular Vesicles from Bronchoalveolar Lavage Fluid and Plasma of Patients with Lung Lesions Using Fluorescence Nanoparticle Tracking Analysis. *Cells*. 2021;10(12).

Materiałem badawczym wykorzystanym tej pracy było osocze oraz płyn oskrzelowopęcherzykowy pacjentów z podejrzeniem niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP). Niestety brakuje w tych badaniach istotnej kontroli - nie zbadano materiału od pacjentów zdrowych. Trudno więc w mojej ocenie analizować i traktować uzyskane wyniki jako typowe dla zmian nowotworowych, jeżeli do badań nie włączono kontroli od osób zdrowych. Płuco bez zmian nowotworowych nie jest płucem zdrowym i unikałabym takiego stwierdzenia (doktorantka oznacza je jako płuco zdrowe), zastępując je określeniem płuca bez zmian nowotworowych. Nowotwór to choroba systemowa a szczególnie analiza krążących w płynach EVs powinna brać to pod uwagę. Bardzo proszę, aby doktorantka odniosła się do tej uwagi w trakcie dyskusji na obronie. Nie jest dla mnie też do końca jasne, czy wyniki prezentują dane uzyskane od wszystkich analizowanych pacjentów, czy tylko tych ze zdiagnozowanym nowotworem? Doktorantka pisze dalej, że analizowano 34 pacjentów (z czego sześć osób okazało się nie mieć NDRP tylko inne schorzenia, a u trzech nowotwór nie został jednoznacznie potwierdzony). Która kohorta weszła do analiz przedstawionych w manuskrypcie?

Metodyka bazuje na tych informacjach, które przedstawiono w publikacji. Pewnych informacji w niektórych metodach brakuje, aby móc w pełni odtworzyć eksperymenty. Szczególnie zainteresowało mnie wykorzystanie cytometrii przepływowej klasycznej do oceny EVs. Zwykle konieczne jest odpowiednie



przygotowanie urządzenia, aby zminimalizować szumy i zanieczyszczenia cząstkami o podobnej wielkości jak EVs, i dotyczy to także oceny EVs za pomocą opłaszczonych przeciwciałem kulek. Dotyczy to filtrowania płynów, zastosowania odpowiedniej procedury czyszczenia urządzenia oraz zastosowania odpowiednich filtrów. W manuskrypcie nie podano tych informacji. Bardzo proszę, aby doktorantka przedstawiła tę procedurę bardziej szczegółowo w trakcie obrony.

Metodycznie za wartościowe uważam wykorzystanie nowoczesnej metody fluorescencyjnej analizy śledzenia nanocząstek (ang. Fluorescence Nanoparticle Tracking Analysis) – fNTA, i porównanie jej z klasycznym pomiarem NTA a także zweryfikowanie jej przydatności do analizy EVs izolowanych z różnego materiału biologicznego. To nowe obserwacje o dużej wartości poznawczej i potencjale aplikacyjnym.

Doktorantka scharakteryzowała wyizolowane pęcherzyki oraz zbadała podstawowe parametry takie jak: wielkość i stężenie EVs, oraz podstawowy fenotyp CD63, CD9, CD81 – podstawowe markery pęcherzyków. Porównano wyniki uzyskane dla płuca objętego zmianami chorobowymi, płuca bez zmian nowotworowych oraz osocza. Zaobserwowano różnice między płynem BALF a osoczem, które miało inne stężenie i wielkość EVs oraz znacznie silniejszą kontaminację lipoproteinami. Wykazano, że BALF okazał się źródłem materiału o wyższej czystości i tylko on nadawał się do analiz f-NTA. To cenna obserwacja dla dalszych prac w kierunku wykorzystania diagnostycznego.

Pani mgr inż. Długolecka w podsumowaniu pisze, że markery CD63, CD81 oraz CD9 oceniano metodą f-NTA oraz za pomocą cytometrii. O ile wyniki mierzone f-NTA są szczegółowo opisane, trudno mi je było porównać z wynikami uzyskanymi za pomocą cytometrii, gdzie nie zaznaczono która frakcja BALF była oceniana. Czy mogę prosić o informacje dotyczące odsetków poszczególnych populacji (CD63, CD81 oraz CD9) dla pomiarów cytometrycznych i f-NTA dla płynu BALF, który okazał się materiałem o wysokiej czystości nadającym się do analiz obu typów, i przedyskutowanie ewentualnych różnic.

Finalnie, doktorantka podsumowuje wyniki, w których nie zaobserwowano żadnych korelacji pomiędzy badanymi parametrami a stanem chorobowym a także płucem ze zmianami nowotworowymi a płucem nie zmienionym nowotworowo. Doktorantka wnioskuje, że oba płuca mają wspólne mikrośrodowisko i stan nowotworowy nie różnicuje się jako specyficzny fenotyp, gdyż widoczny jest także w drugim płucu (który określa jako zdrowe). Ten wniosek chciałabym przedyskutować z doktorantką w czasie obrony, gdyż w mojej opinii przeprowadzone eksperymenty nie do końca pozwalają na taką konkluzję. Przeprowadzono analizę bardzo podstawowych parametrów, które niekoniecznie muszą być specyficznie zmienione w mikrośrodowisku nowotworu. Według mnie konieczna jest analiza bardziej specyficznego fenotypu zawierającego jakikolwiek marker nowotworowy, immunosupresyjny lub inny, który pozwoliłby na stwierdzenie, że obserwowana sygnatura jest sygnaturą nowotworową. Lub przeprowadzić jeszcze dokładniejsze badania cargo, np. z wykorzystaniem badań proteomicznych. Ponadto, bez próby kontrolnej od osoby zdrowej bez choroby nowotworowej nie można jednoznacznie stwierdzić, że obserwowany fenotyp jest fenotypem chorego płuca, które jest także reprezentowane w płucu bez guza (pisałam o tym już wcześniej). Być może taki podstawowy fenotyp byłby taki sam także u zdrowych osób i dopiero bardziej zaawansowane cechy będą wyróżniać EVs charakterystyczne dla nowotworu.

Uzyskane wyniki zostały zamieszczone w otwartej bazie danych, co oceniam bardzo pozytywnie.

Praca przeglądowa: Długolecka M, Czystowska-Kuźmich M. *Factors to consider before choosing EV labeling method for fluorescence-based techniques. Front. Bioeng. Biotechnol. Sec. Nanobiotechnology. Volume 12 – 2024* to bardzo ciekawe kompendium aktualnej wiedzy dotyczącej metodologii izolacji, analizy i charakterystyki EVs z różnych materiałów biologicznych. Zawiera ona szereg przydatnych informacji i wskazówek dla innych badaczy i diagnostów. Doktorantka wykazuje dużą wiedzę i świadoma jest ograniczeń i możliwości dostępnych metod. Pracę kończy ciekawy rozdział dotyczący klinicznego



zastosowania znakowania i oceny pęcherzyków EVs, oraz wyzwań stojących jeszcze przed badaczami w tym obszarze.

Wnioski przedstawione w Autoreferacie odpowiadają celom, które postawiła sobie Doktorantka rozpoczynając badania. Część konkluzji, które chciałabym przedyskutować o czym napisałam powyżej szczegółowo, traktuję jako naukową dyskusję nie umniejszającą wartości wyników.

W podsumowaniu Autoreferatu, oprócz podsumowania uzyskanych wyników, doktorantka pisze, że badania przedstawione w publikacji eksperymentalnej (która ukazała się w 2021 roku) były kontynuowane i badania rozszerzono o analizę f-NTA dla w sumie 82 pacjentów oraz analizę z wykorzystaniem obrazowej cytometrii przepływowej poziomu dodatkowych specyficznych markerów obecnych na powierzchni EVs, związanych z ich funkcjami prozapalnymi i promującymi wzrost nowotworu. Przeprowadzono także ocenę stanu immunologicznego pod kątem m.in. immunosupresji. Wielka szkoda, że wyniki prowadzone po 2021 roku, mimo, że jeszcze nie opublikowane, nie zostały przedstawione w rozprawie jako część Autoreferatu. Na pewno wzbogaciło by to wpłynęłoby to znacznie na podniesienie wartości naukowej rozprawy. Czy doktorantka w trakcie obrony może uchylić rąbka tajemnicy i opowiedzieć o tych wynikach?

Podsumowując, przeprowadzone w ramach projektu doktorskiego badania są dobrze uzasadnione i wpisują się w obszar istotny dla rozwoju medycyny. Doktorantka podjęła się niewątpliwie trudnego i niełatwego zadania prowadząc prace w obszarze nowym i intensywnie rozwijającym się. Uzyskane wyniki niewątpliwie stanowią oryginalny wkład w badania podstawowe i aplikacyjne dotyczące poszukiwania nowych metod diagnostycznych i zastosowania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych EVs w diagnostyce raka płuca.

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). Zwracam się zatem z prośbą do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych WUM o dopuszczenie mgr inż. Magdaleny Długoleckiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznym i nauk o zdrowiu.

Z poważaniem,