

Dr hab. Monika Pietrowska, prof. NIO-PIB
Narodowy Instytut Onkologii
im. Marii Skłodowskiej - Curie - Państwowy Instytut Badawczy
Oddział w Gliwicach
ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15
44-102 Gliwice

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" zrealizowanej w Katedrze i Zakładzie Biochemii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, pod kierunkiem dr hab. n. med. n. o zdr. Małgorzaty Czystowskiej-Kuźmich.

Poznanie molekularnych mechanizmów komunikacji międzykomórkowej staje się w ostatnim czasie ważnym problemem medycznym zwłaszcza w kontekście poszukiwania markerów wczesnego wykrywania choroby nowotworowej lub niepowodzenia jej leczenia. Szczególną rolę zajmują pęcherzyki zewnątrzkomórkowe obecne w łatwo dostępnych diagnostycznie płynach ustrojowych pacjenta (tzw. płynnej biopsji), a ich liczba wydaje się być związana z poziomem zaawansowania choroby. Największymi ograniczeniami badań nad biologią pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EV) są wyzwania metodyczno-technologiczne wynikające z ich rozmiaru. Z uwagi na swoją heterogenność oraz trudności w uzyskaniu homogennej populacji EV ich wykorzystanie jako biomarkerów stawia przed badaczami wiele problemów technicznych. Większość metod charakteryzacji stosowanych w przypadku komórek nie może zostać użyta w przypadku EV. W ostatnich latach w związku z rosnącym zainteresowaniem EV zostało opracowanych kilka nowych metod izolacji, jak również urządzeń dedykowanych analizie wielkości, stężenia oraz ich składu molekularnego. Bezpośredni pomiar sEV za pomocą konwencjonalnej cytometrii przepływowej jest niemożliwy z powodu granicy detekcji urządzeń. Dodatkowo mały rozmiar tych pęcherzyków utrudnia proces usuwania nadmiaru barwnika w procesie znakowania fluorescencyjnego, jak również kontaminacji wynikających ze specyfiki materiału, z którego są izolowane (na przykład lipoprotein). Doktorantka w przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej dołączyła do badaczy próbujących opracować metodykę charakteryzowania EV; jednocześnie wpisuje się w nurt badań wczesnego wykrywania nowotworów oraz ich monitorowania immunologicznego, zawierając równocześnie bardzo ciekawe wyniki badań na poziomie metodologicznym. Autorka w przedstawionym do oceny cyklu dwóch prac opracowuje metodę izolacji EV z płynu z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BALF) oraz analizuje metodę znakowania fluorescencyjnego, jaką

powinno się zastosować do analiz ilościowych EV tak, aby uzyskać rzetelne wyniki do zastosowania w aplikacjach klinicznych.

Temat rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Długoleckiej oceniam jako aktualny oraz wysoce adekwatny w stosunku do problematyki współczesnych badań biomedycznych. Praca doktorska mgr inż. Magdaleny Długoleckiej prezentuje wyniki uzyskane za pomocą technologii o dużym potencjale w badaniach translacyjnych (badania prowadzono zgodnie z najnowszymi wytycznymi Międzynarodowego Towarzystwa Pęcherzyków Zewnątrzkomórkowych, ISEV). Doktorantka zrealizowała postawione sobie cele, dobrała do ich realizacji odpowiednie metody badawcze, dokonała bardzo rzeczowej analizy wyników i ich interpretacji w opublikowanych pracach stanowiących jej pracę doktorską. W pierwszej opublikowanej pracy wykazano, że znakowanie fluorescencyjne EV dla określonych markerów pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w połączeniu z analizą NTA w trybie rozproszenia i fluorescencji umożliwia precyzyjne określenie stężenia, rozmiaru, dystrybucji oraz fenotypu powierzchni „prawdziwych” EV izolowanych z płynów biologicznych, w których obecne są heterogenne populacje EV. Szczególnie przydatne w badaniach nad EV zdaniem Doktorantki wydają się być metody fluorescencyjne, takie jak fluorescencyjna analiza śledzenia nanocząstek (ang. Fluorescence Nanoparticle Tracking Analysis, f-NTA) oraz cytometria przepływowa w nanoskali (ang. Nanoscale Flow Cytometry, nFC). Pozwalają one na odróżnienie EVs od tła i czynników zakłócających typu lipoproteiny i korona białkowa (będąca nieodłącznym elementem towarzyszącym budowy/składu EV), szczególnie częste przy izolacji EV z płynów biologicznych. Kontynuację zagadnienia związanego z optymalizacją i weryfikacją fluorescencyjnych metod analizy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych do przyszłych zastosowań klinicznych wraz z kompleksowym przeglądem dostępnego piśmiennictwa na ten temat Doktorantka przedstawiła w kolejnej, drugiej publikacji cyklu, która stanowi część poglądową i teoretyczną niniejszej pracy doktorskiej.

Sposób prezentacji uzyskanych wyników nie jest typowy dla tego rodzaju prac doktorskich, ale jest dość przejrzysty. Autorka w prezentowanej do oceny pracy doktorskiej zamieściła: (1) spis projektów badawczych, w ramach których realizowała swoją pracę doktorską, (2) streszczenie pracy w języku polskim i angielskim, (3) wstęp, (4) założenia i cel pracy, (5) kopie opublikowanych prac, (6) podsumowanie i wnioski, (7) bibliografię oraz (8) oświadczenia współautorów publikacji. Cele przedstawione w rozdziale „założenia i cel pracy” Autorka realizuje konsekwentnie w dołączonych kopiach prac, których mgr inż. Magdalena Długolecka jest współautorką. Zdaniem Recenzenta jednak nie wszystkie zaproponowane cele są przejrzyste i precyzyjne, a tym samym trudno je zrealizować. Celem prezentowanej do oceny pracy doktorskiej stanowiącej cykl dwóch prac jest między innymi „określenie wpływu metody izolacji oraz zanieczyszczeń na uzyskane wyniki” oraz „porównanie cBALF z oBALF jako metod określenia czy nowotwór wpływa na całe płuca, czy są to odrębne środowiska?”. Chciałabym, aby w czasie publicznej obrony recenzowanej pracy Autorka odniosła się do tej uwagi i wyjaśniła dokładniej co miała na myśli konstruując te dwa cele pracy doktorskiej.

Przedstawione publikacje stanowiące cykl są znakomicie ilustrowane rycinami, a prezentowaną do recenzji pracę doktorską jej Autorka kończy podsumowaniem, w którym przytacza najważniejsze wnioski z publikacji. Osobiście bardzo podoba mi się taka forma pracy doktorskiej i świadczy

o dojrzałości naukowej jej Autorki. Pani mgr inż. Magdalena Długolecka dokonuje podsumowania uzyskanych wyników oraz ich interpretacji popartej literaturą w bardzo przejrzysty i nie pozostawiający wątpliwości sposób. Opis rozprawy stanowi w tym przypadku cykl dwóch opublikowanych prac, więc Recenzent jest w stanie ocenić oraz docenić dobór metod do założonych celów pracy, uzyskanie wyników i wyciągnięte wnioski. Dobór piśmiennictwa (bibliografia składa się z 35 pozycji) jest adekwatny do treści pracy. Rozprawa doktorska napisana jest w języku polskim. Praca jest przejrzysta, konkretna oraz „nie przegadana”, co jako Recenzent doceniam szczególnie. W części teoretycznej swojej rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdalena Długolecka opisuje problemy towarzyszące badaniom EV. Sporo miejsca Doktorantka poświęca opisowi wybranej do realizacji celu technologii oraz jej wad i zalet. Oceniając tę część pracy stwierdzam, że rozdział prezentujący teoretyczny kontekst realizowanych badań jest napisany w sposób przejrzysty i bardzo przystępny.

Doktorantka nie uniknęła błędów edytorskich oraz pomyłek, będących nieodłącznym elementem tego typu opracowań. Większość uwag o charakterze edytorskim dotyczy nieprecyzyjnych określeń np. „dzięki zgłębianiu biologii nowotworów i rozwoju nowoczesnych technik badawczych”. W tekście pojawiają się niezręczności językowe i sformułowania będące kalką tłumaczenia z języka angielskiego np. „komórek parentalnych” zamiast „komórek rodzicielskich” czy „czynniki zakłócające typu lipoproteiny i korona białkowa”.

Pozostając pod wrażeniem pracy przedstawionej mi do oceny chciałabym, aby Pani mgr inż. Magdalena Długolecka Marta odniosła się do następujących zagadnień podczas publicznej obrony:

- (1) Czy opracowana przez nią w trakcie realizacji pracy doktorskiej procedura analityczna jest możliwa do zastosowania do każdego typu materiału, aby uzyskać wiarygodne, rzetelne wyniki analiz? Jeśli nie, to jakie są jej podstawowe ograniczenia?
- (2) Jednym z celów pracy było określenie wpływu metody izolacji oraz zanieczyszczeń, niemniej jednak w prezentowanym podsumowaniu Autorka nie prezentuje jakie parametry były najistotniejsze. W idealnej eksperymentalnej wersji, aby testować wpływ czynnika należałoby prowadzić eksperyment w zmieniających się warunkach ilościowych tego czynnika, co trudno przeprowadzić dla układu eksperymentalnego jakim są EV (największym ograniczeniem jest brak kontroli tj. składnika, który nie zmienia się ilościowo w EV i jest wprost proporcjonalny do liczby EV): w jaki więc sposób testowano wpływ zanieczyszczeń? W jaki sposób kontrolowano usuwanie lipoprotein?
- (3) Czy w czasie badań prowadzonych w przedstawionej do oceny pracy doktorskiej Doktorantka natknęła się na inne niż prezentowane w pracy ograniczenia w izolacji EV; jeśli tak, to czego dotyczyły?
- (4) Jakie agregaty białek ma na myśli Autorka pisząc „... w jej konwencjonalnej wersji z pomiarem w świetle widzialnym nie można odróżnić EV od lipoprotein, a także od agregatów białek czy innych zanieczyszczeń o podobnej wielkości.” Jakie zanieczyszczenia Autorka ma na myśli, oraz czy mogłaby wyjaśnić jakie rozmiary w stosunku do lipoprotein oraz EV mają białka?

Do przesłanej do recenzji pracy dołączono osiągnięcia naukowe Doktorantki, która jest według nich pierwszym autorem następujących pracy stanowiących cykl, a jej udział autorski (potwierdzony

oświadczeniami współautorów) wynosi odpowiednio 51 oraz 90%. Współautorzy opublikowanych prac potwierdzili jej udział w swoich oświadczeniach oraz fakt, że mgr inż. Magdalena Długolecka jest Autorką manuskryptów stanowiących dwie opublikowane prace stanowiące ocenianą pracę doktorską.

1. Długolecka M, Szymanski J, Zareba L, Hornoncik Z, Domagala-Kulawik J, Polubiec-Kownacka M, Czystowska-Kuzmich M. Characterization of Extracellular Vesicles from Bronchoalveolar Lavage Fluid and Plasma of Patients with Lung Lesions Using Fluorescence Nanoparticle Tracking Analysis. Cells. 2021 Dec 9;10(12):3473. doi: 10.3390/cells10123473. PMID: 34943982; PMCID: PMC8699990.
2. Długolecka M, Czystowska-Kuzmich M. Factors to consider before choosing EV labeling method for fluorescence-based techniques. Front Bioeng Biotechnol. 2024 Sep 18;12:1479516. doi: 10.3389/fbioe.2024.1479516. PMID: 39359260; PMCID: PMC11445045.

Współczynnik oddziaływania zaprezentowanego w pracy cyklu wynosi 11,96 (240 punktów MNiSW). Osiągnięcia Doktorantki uważam za dobre na tym etapie jej kariery naukowej.

Wnioski ogólne

Podsumowując, mocną stroną pracy jest wstęp teoretyczny w którym jego Autorka wykazała się wiedzą z zakresu biologii pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz medycyny. Praca doktorska, której podjęła się mgr inż. Magdalena Długolecka jest interdyscyplinarna i wymaga wszechstronnej wiedzy. Została dobrze zaplanowana oraz zrealizowana. Dodatkowo ryciny prezentujące uzyskane dane zawarte w kopiach prac są przygotowane w sposób przejrzysty, dobrze dokumentując uzyskane dane. Cykl prac stanowi rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydatki w danej dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Reasumując, w mojej ocenie treść i jakość przedstawionej rozprawy w pełni odpowiadają wymogom stawianym rozprawom doktorskim oraz wskazują na dużą samodzielność naukową Kandydatki. Stąd rekomenduję dopuszczenie przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Długoleckiej do jej publicznej obrony oraz wyróżnienie tej pracy.

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).

Dr hab. Monika Pietrowska, Prof. NIO-PIB