



Dr hab. Bartosz Wojtaś,  
Pracownia Sekwencjonowania,  
Instytut Biologii Doświadczalnej  
im. M. Nenckiego PAN

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Marty Popędy**  
**“Profile transkrypcyjne związane z układem immunologicznym w kontekście rozsiewu raka piersi”**

Nieinwazyjne metody diagnostyki, takie jak płynne biopsje, są w mojej i wielu innych osób opinii, przyszłością medycyny. Precyzyjne diagnozowanie i monitorowanie choroby nowotworowej z zastosowaniem płynnych biopsji staje się coraz bardziej realnym rozwiązaniem medycznym. Metody diagnostyki i prognostyki oparte o wolnokrążące DNA oraz wolnokrążące komórki nowotworowe mogą zrewolucjonizować medycynę, obniżając znacznie koszty oraz zwiększając szanse na lepiej dobraną oraz wcześniej zastosowaną terapię. Cykl prac przedstawiony przez doktorantkę dotyczy aspektu predykcyjnego związanego z wolnokrążącymi komórkami nowotworowymi u pacjentek z nowotworem piersi. Dokładniej, autorka próbuje określić rolę komponenty immunologicznej komórek guza, które dają przerzuty lokalne lub odległe oraz określić czy i jak profile guza i wolnokrążących komórek nowotworowych są ze sobą powiązane.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma formę spójnego tematycznie zbioru czterech artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych, zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 26 września 2016 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora. Wszystkie cztery artykuły to prace oryginalne, opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych. Do każdej z prac wchodzących w skład rozprawy dołączone są oświadczenia głównych współautorów, które potwierdzają indywidualny wkład kandydatki przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników.

W postaci przedstawionej do oceny, artykuły wchodzące w skład rozprawy zostały poprzedzone liczącym 32 strony opisem prac wraz z wprowadzeniem, streszczeniem oraz piśmiennictwem. Pomocny jest także zamieszczony wykaz skrótów.

W pierwszej z przedstawionych prac opublikowanej w *Cancers* (Basel):

„NF-kappa B Signaling-Related Signatures Are Connected with the Mesenchymal Phenotype of Circulating Tumor Cells in Non-Metastatic Breast Cancer,” w której doktorantka jest pierwszą autorką postulowano, że geny związane ze ścieżką NF-kappa B związane są z mezenchymalnym fenotypem wolno-krażących komórek nowotworowych, który niesie ze sobą gorsze rokowanie dla pacjentek.

W drugiej z przedstawionych prac opublikowanej w *British Journal of Cancer*:

„Higher platelet counts correlate to tumour progression and can be induced by intratumoural stroma in non-metastatic breast carcinomas”, w której doktorantka jest drugą autorką postulowano, że przedoperacyjny poziom płytek krwi w połączeniu z/lub bez badania wolno-krażących komórek nowotworowych może mieć wartość prognostyczną dla pacjentek z rakiem piersi.

W trzeciej z przedstawionych prac opublikowanej w *Acta Biochimica Polonica*:

„Activation of epithelial-mesenchymal transition process during breast cancer progression - the impact of molecular subtype and stromal composition”, w której doktorantka jest trzecią autorką pokazano, że wolno-krażące komórki nowotworowe o typie mezenchymalnym i epithelialnym różnią się ekspresją genów związanych z układem odpornościowym oraz że różne molekularne subtypy raka piersi w odmienny sposób korzystają z tranzykcji epithelialno-mezenchymalnej.

W czwartej z przedstawionych prac opublikowanej w *Scientific Reports*:

„Reduced expression of innate immunity-related genes in lymph node metastases of luminal breast cancer patients”, w której doktorantka jest pierwszą autorką pokazano, że przerzuty do węzłów chłonnych raka piersi typu luminalnego mają obniżoną ekspresję genów związanych z wrodzoną odpornością, w tym genów związanych z układem dopełniacza.

Na uwagę zasługuje fakt, że część przedstawionych wyników może mieć potencjalne zastosowanie kliniczne, jeśli zostanie potwierdzone kolejnymi badaniami, z badaniami klinicznymi włącznie. Wysoko oceniam wartość merytoryczną i potencjalną praktyczną wykonanych badań. Część omawiającą wyniki z publikacji oceniam wysoko, autorka sprawnie wyjaśniła w języku polskim główne tezy i otrzymane wyniki badań. Nie ustrzegła się przed pewnymi anglicyzmami czy kolokwializmami, jak np. „zaraportowaliśmy”, ale są to drobnostki, które nie umniejszają wartości pracy. Bardzo pomocne w zrozumieniu całego projektu było graficzne podsumowanie wyników. Mam do pracy kilka uwag oraz

pytań, które, jako że prace były już recenzowane, mogły pojawić się w toku recenzji w czasopiśmie. Jeśli tak będzie, to tylko z korzyścią dla doktorantki, bo łatwiej jej będzie się do nich ustosunkować.

1. Z jakiego powodu zdecydowano się na technologię Nanostring z ograniczeniem ilości badanych genów? Czy testowano inne metody badania całego transkryptomu na materiale FFPE?
2. Dopasowanie wolno-krążących komórek nowotworowych do fenotypu epitelialnego lub mezenchymalnego jest, jak rozumiem pewną formą dyskretyzacji pomiarów specyficznych markerów (RT-qPCR o ile dobrze rozumiem). Zastanawiam się więc, czy w związku z tym, że analiza różnicowa pomiędzy komórkami mes i epi nie dała zbyt wiele istotnych genów, czy próbowano przeprowadzić analizę korelacji poziomu markerów epi/mes z poziomem badanych genów immunologicznych?
3. Chciałem się zapytać doktorantki o opinie, dlaczego nie widać różnicy ekspresji pomiędzy guzami wydzielającymi i nie-wydzielającymi CTC? W jakim stopniu jest to realny wynik a na ile potencjalnie związany z niedoskonałością metod i/lub materiału?
4. Dlaczego w pracy z Cancers zdecydowano się na analizę zawężoną do genów z wysoką ekspresją? Z biologicznego punktu widzenia nie do końca widzę uzasadnienie, czy w takim razie zdecydowały czynniki techniczne, jeśli tak to jakie?
5. Czy w analizach z zastosowaniem narzędzia DAVID, które o ile dobrze rozumiem, korzysta z testu Fisher'a uwzględniono fakt, że pula genów badanych to nie wszystkie geny, jak często zakładają tego typu narzędzia, ale ok. 700 genów z macierzy Nanostring?
6. W pracy z Cancers mogłem się dowiedzieć, że 5 z 38 genów podwyższonych w komórkach CTC o fenotypie mezenchymalnym ma wartość prognostyczną w zbiorze danych TCGA. Nie do końca jestem w stanie zinterpretować czy to dużo czy mało. Wydaje mi się, że przy tego typu wynikach dobrze byłoby przetestować, ile losowo wybranych genów niosłoby wartość prognostyczną. Innymi słowy, jeśli 100 razy wezmę 38 losowych genów i nigdy nie wyjdzie mi aż 5 genów z negatywną wartością predykcyjną, wtedy wydaje mi się, że z pełną dozą pewności moglibyśmy powiedzieć, że te geny niosą negatywną wartość prognostyczną. Na marginesie chciałem powiedzieć, że to nie jest krytyka pracy doktorantki, gdyż wiele publikowanych prac przedstawia podobny schemat analiz. Warto byłoby się jednak zastanowić, czy robiąc analizę w ten sposób nasze dane pokazują, to co chcemy, żeby pokazywały.



7. Moja ogólna obserwacja jest taka, że CTC są realnym potencjalnym markerem, który może zrewolucjonizować medycynę, podobnie jak wolnokrążące nowotworowe DNA. Wydaje mi się jednak, że ciągle jesteśmy dosyć daleko od metody diagnostycznej/prognostycznej, którą moglibyśmy wprowadzać do szpitali. Mam pytanie do doktorantki, czy zgadza się z moją oceną i jeśli tak lub nie, to dlaczego?

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i wykazuje ogólną wiedzę kandydatki w dyscyplinie naukowej doktoratu oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia przez nią pracy naukowej, a zatem odpowiada warunkom określonym w Art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, z późniejszymi poprawkami, wraz z Rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 26 września. Wnioskuje zatem do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Marty Popędy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dodatkowo ze względu na dużą wartość naukową i potencjalną wartość aplikacyjną, wnioskuje o wyróżnienie tej pracy przez Radę Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego.

Bartosz Wojtaś

Montreal, 30.08.2022