

Prof. dr hab. Urszula Wojda
Kierownik Pracowni Badań Przedklinicznych
o Podwyższonym Standardzie, Centrum Neurobiologii,
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
tel: (4822) 5892578; email: u.wojda@nencki.gov.pl

Warszawa, 13 grudnia 2021 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Mateusza Smolarza

pt. „Scharakteryzowanie składu molekularnego egzosomów obecnych w surowicy krwi pacjentów z wczesnym rakiem płuca”

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra Wiślickiego w Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Nowotworów Narodowego Instytutu Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

Celem przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej była weryfikacja hipotezy, że profil mikroRNA i skład lipidów egzosomów obecnych w surowicy krwi pacjentów we wczesnym stadium raka płuca może stać się podstawą nowej metody diagnostycznej wspierającej wczesne wykrywanie tego nowotworu. Podjęta tematyka badań jest ważna poznawczo i niezwykle istotna klinicznie, ponieważ wciąż brak wczesnych, a przy tym małoinwazyjnych biomarkerów raka płuca, mimo wielu poszukiwań takich biomarkerów w różnych płynach ustrojowych. Jedyną stosowaną obecnie metodą przesiewową wykrywania raka płuca jest niskodawkowa tomografia komputerowa. Metoda ta umożliwia wczesne wykrycie zmian u 20-40% badanych osób, jednak ryzyko wyniku fałszywie pozytywnego wynosi aż ponad 90%, co skutkuje koniecznością prowadzenia dalszej diagnostyki kosztownymi metodami inwazyjnymi, takimi jak biopsja czy bronchoskopia. W konsekwencji prowadzi to do późnego wykrywania raka płuca, który obecnie jest jedną z częstszych przyczyn zgonów z powodu nowotworów złośliwych.

Przesłanki do podjęcia badań opisanych w niniejszej dysertacji obejmujących profilowanie wybranych mikroRNA (miRNA) i lipidów w egzosomach, są bardzo przekonujące. Niekodujące, krótkie cząsteczki miRNA regulują poziom transkryptów większości genów u człowieka w procesie interferencji, powodując zahamowanie translacji lub degradację docelowego mRNA. Jako regulatory sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, miRNA są zaangażowane w patomechanizmy wielu chorób, w tym chorób nowotworowych, a także są badane jako obiecujące nowe punkty uchwytu leków i potencjalne biomarkery. Obiecującym kierunkiem badań jest zwłaszcza profilowanie egzosomów obecnych w surowicy lub osoczu krwi. Wiadomo, że miRNA mogą być wydzielane pozakomórkowo w egzosomach i transportowane we krwi do komórek-biorców. Co więcej, w chorobach nowotworowych zaobserwowano zwiększenie wydzielania egzosomów i wzrost ich liczby w surowicy krwi. Jednak podstawową trudnością w identyfikacji patologicznego podpisu molekularnego białek, miRNA lub lipidów w egzosomach jest niedobór odpowiednio wydajnych, wystandaryzowanych metod izolacji egzosomów z surowicy i brak standaryzacji i wiarygodnej normalizacji oznaczeń miRNA. Niewiele badań wykonano także nad składem metabolitów egzosomów surowicy w raku płuca. Te wyzwania zostały podjęte w ocenianej rozprawie. Mimo, że autorowi nie udało się zweryfikować wczesnych biomarkerów raka płuca w postaci wytypowanych 12 miRNA i typów lipidów w uzyskanych frakcjach wzbogaconych w egzosomy, wyniki tych badań dostarczają wielu cennych informacji i stanowią znaczący wkład na drodze do wczesnej diagnostyki wielu chorób w oparciu o profilowanie miRNA i metabolomu egzosomów.

Ocena formalna rozprawy

Rozprawa przygotowana jest zgodnie z obowiązującymi zasadami dotyczącymi prac doktorskich, które nie są zbiorem opublikowanych artykułów. Dysertacja liczy 110 stron i ma klasyczny układ. Po spisie treści zamieszczono streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów oraz wstęp (26 stron), w którym zawarto dobrze wyselekcjonowane informacje naukowe, podane w odpowiedniej kolejności, a także zilustrowane trzema przejrzystymi rycinami i czterema tabelami. Opis materiałów i metod (17 stron) jest zwięzły, a zarazem kompletny i szczegółowy na tyle, aby umożliwić powtórzenie wszystkich eksperymentów. Główną część rozprawy stanowi opis wyników przedstawiony na 32 stronach i, co cenne, zakończony podsumowaniem w punktach. Dyskusja zajmuje 7 stron, zawiera jedną rycinę i podsumowanie w formie wniosków końcowych. Spis piśmiennictwa zawiera 177 pozycji. Publikacje zostały właściwie wyselekcjonowane, w tym uwzględniono prace z ostatnich pięciu lat. Na końcu zamieszczono listę 3 artykułów opublikowanych w czasopismach z listy JCR i jednej polskojęzycznej monografii, w których doktorant jest pierwszym autorem, a które mają związek z dysertacją.

Proporcja poszczególnych części pracy jest odpowiednia. Rozprawa ma przejrzystą konstrukcję i w syntetyczny sposób dostarcza wszystkich informacji pozwalających na ocenę oryginalności i istotności rozwiązanego problemu naukowego, ogólnej wiedzy doktoranta w uprawianej dziedzinie naukowej i umiejętności prowadzenia badań naukowych. Praca napisana jest w sposób bardzo zwięzły, zarazem w sposób przejrzysty i ciekawy.

Ocena merytoryczna rozprawy i uwagi

We *Wstępie* Autor omówił dane epidemiologiczne i czynniki etiologiczne raka płuca, obecnie stosowaną metodykę wczesnego wykrywania raka płuca oraz dotychczasowe wyniki poszukiwania biomarkerów tego nowotworu we krwi wśród molekuł z różnych klas. Następnie dokonał przeglądu wiedzy na temat biogenezy i funkcji miRNA oraz potencjału cząsteczek miRNA obecnych w osoczu lub surowicy krwi jako biomarkerów procesu nowotworzenia. Zestawienie danych literaturowych obejmujących panele miRNA zidentyfikowanych dotychczas jako podpis molekularny raka płuc przez różne grupy badaczy wykazało niską powtarzalność tych badań.

Druga część *Wstępu* poświęcona jest budowie, biogenezie i potencjalnej roli diagnostycznej lipidów w raku płuca. W trzeciej części autor skupia się na zawierających zarówno białka, jak lipidy i miRNA egzosomach w surowicy krwi. Omawiana jest klasyfikacja, biogeneza, funkcje i różne metody izolacji egzosomów, a także potencjał diagnostyczny w raku płuca różnych klas proponowanych biomarkerów obecnych w egzosomach. Cennym wynikiem tego przeglądu jest wyłonienie powtarzalnie zidentyfikowanych egzosomalnych miRNA, a także egzosomalnych lipidów o potencjale biomarkerowym. Wstęp bardzo dobrze uzasadnia podjęte badania. Założenia i cele badań przedstawiono przejrzysto, w tym optymalizację metody izolacji egzosomów z surowicy i poszukiwanie biomarkerów raka płuc poprzez profilowanie wybranych miRNA i lipidów w egzosomach.

Do Wstępu mam jednak kilka uwag krytycznych:

1. Na str. 14 znajdujemy stwierdzenie, że miRNA są „odpowiedzialne za regulację ekspresji genów docelowych”. Jest to stwierdzenie nieprecyzyjne, gdyż jak wiadomo cząsteczki miRNA nie regulują bezpośrednio ekspresji genów, lecz poziom transkryptów; jest to epigenetyczna regulacja na poziomie potranslacyjnym. Konsekwentnie też powinniśmy mówić o „docelowych transkryptach”, czy miRNA

celujących w transkrypty genów, nie zaś o docelowych genach czy miRNA celujących w geny (np. tekst str. 16).

2. Opis biogenezy miRNA i zjawiska interferencji jest bardzo ogólny i m.in. nie zawiera informacji o represji translacji przez miRNA czy niekanonicznych szlakach biogenezy. Byłoby wskazane, aby w rozdziale tym uwzględnić jedną z najbardziej fundamentalnych w tej dziedzinie prac przeglądowych, takich jak np. publikacja D. Bartela „Metazoan microRNAs” opublikowana w renomowanym czasopiśmie Cell w 2018 r. (doi: 10.1016/j.cell.2018.03.006).

3. Każda nić duplexu miRNA (guide and passenger) posiada unikalną sekwencję „seed” definiującą specyficzność nici wobec jej docelowych transkryptów; poszczególne nici duplexu identyfikowane są jako -3p, -5p i regulują odmienne transkrypty. Ta identyfikacja specyficznych nici nie została podana dla wielu miRNA, których docelowe transkrypty i funkcje omówiono.

Warsztat metodologiczny pracy obejmuje szeroką gamę różnorodnych technik biologii molekularnej, biochemii i zaawansowanej analizy statystycznej. Docenić należy przemyślane zastosowanie cennego materiału klinicznego zebranego uprzednio w wyniku realizacji badania przesiewowego MOLTEST-BIS przez Gdański Uniwersytet Medyczny, obejmującego próbki surowicy krwi od 80 osób zdrowych, 80 uczestników ze zdiagnozowanymi łagodnymi guzkami płuc, a także 80 pacjentów w różnych stadiach raka płuc. Charakterystykę grup przedstawiono w usystematyzowany sposób.

Dobór metod i narzędzi badawczych jest odpowiedni dla realizacji celu projektu, pozwalając na izolowanie frakcji egzosomów z niewielkiej objętości surowicy krwi i prowadzenie precyzyjnych badań nad składem miRNA i lipidów. Na uwagę zasługuje staranna weryfikacja obecności egzosomów w wyizolowanych frakcjach z zastosowaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej, pomiaru dynamicznego rozpraszania światła i białkowych biomarkerów subfrakcji komórkowych wykrywanych metodą immunoblottingu, a także droga wyboru frakcji odpowiednio dla profilowania miRNA i metabolomu poprzez profilowanie szerokiego panelu 96 miRNA i ocenę zawartości głównych klas lipidów. W kontekście ogólnych trudności metodycznych uzyskiwania homogennej frakcji pęcherzyków egzosomalnych, a także ograniczeń zastosowanej metody chromatografii żelowej, zgadzam się w pełni z przyjętą przez autora terminologią „frakcja wzbogacona w egzosomy” w odniesieniu do uzyskanych frakcji (w skrócie „frakcja egzosomalna”).

Mam kilka uwagi krytycznych i pytań dotyczących pozostałych metod i przedstawienia wyników, głównie w zakresie profilowania wybranych typów miRNA metodą ilościową RT-qPCR.

1. Chociaż bardzo doceniam zastosowanie 4 podejść metodycznych do normalizacji danych, żadna z tych metod nie jest optymalna, ale obarczona pewnymi ograniczeniami. W dysertacji zabrakło dyskusji wad i zalet każdej z tych metod oraz próby oceny ich wiarygodności i przydatności w kontekście prowadzonych badań.

2. Ciekawym podejściem do normalizacji była analiza proporcji poziomu dwóch różnych miRNA w egzosomach w tej samej próbce według zasady „każdy z każdym”. Dlaczego w tej analizie zastosowano iloraz Cq dwóch miRNA, a nie różnicę tych Cq (deltaCq)? Standardowo w analizach RT-qPCR stosuje się wartości deltaCq, ponieważ w odniesieniu do stężeń cząsteczek iloraz Cq niedostatecznie uwzględnia te różnice.

3. Na wykresach pudełkowych w Wynikach, zarówno dotyczących analizy miRNA jak i lipidów, zaznaczono krzyżykami wartości odstające. Jakie były przyjęte a priori kryteria określenia wartości odstających?

4. Opisy rycin zawierających wykresy pudełkowe w Wynikach są zbyt lakoniczne i nie zawierają podstawowych informacji, jak te wyniki uzyskano. Istnieje zasada, że rycina wraz z podpisem powinna stanowić samodzielną całość, zrozumiałą bez odwoływania się do innych części dysertacji.

5. Niezwykle istotnymi elementami profilowania miRNA, uwzględnionymi w dysertacji, jest zastosowanie odpowiednich kontroli weryfikacji jakości badanych próbek, umożliwiających zakwalifikowanie próbki do analizy na podstawie wewnętrznych kontroli hemolizy, kontroli wydajności izolowania RNA i wydajności reakcji odwrotnej transkrypcji. Poziom hemolizy w próbkach wykrywano poprzez badanie różnicy deltaCq dla 2 miRNA (miR23a-3p i miR-451); jest to znana metoda, jednak szkoda, że nie porównano tych wyników z badaniem metodą pomiaru absorpcji przy długości fali 414 nm.

6. Dyskusję można byłoby rozszerzyć o analizę przyczyn trudności w wiarygodnym i powtarzalnym pomiarze i normalizacji poziomu miRNA w egzosomach z surowicy krwi, co skutkuje niespójnymi wynikami różnych badań.

Uwagi edycyjne i językowe.

Praca przygotowana jest bardzo starannie, autor posługuje się na ogół poprawnym, naukowym językiem, a błędy edycyjne i językowe są bardzo nieliczne. Z obowiązku recenzenta muszę jednak wskazać następujące drobne uchybienia.

1. Materiały i metody: metoda to Western blotting lub immunoblotting, nie „Western blot”
2. Innym częstym błędem w rozprawach doktorskich jest termin „izolacja RNA” – powinno być raczej izolowanie RNA (proces), nie izolacja (np. izolacja społeczna)
3. Określenie „porównanie ekspresji miRNA między grupami” w odniesieniu do miRNA w egzosomach wydaje się niewłaściwe, ponieważ miRNA nie ulega ekspresji w egzosomach; chodzi w istocie o porównanie „poziomu miRNA” bądź „zawartości” czy „liczby cząsteczek miRNA” w egzosomach.

Podsumowanie

Mimo kilku uwag krytycznych, których celem jest głównie zachęta do dalszej dyskusji, wysoko oceniam przedstawioną do oceny dysertację. W pracy podjęto istotne poznawczo i złożone zagadnienia naukowe. Zrealizowano je poprzez szeroko zakrojone, rzetelnie i konsekwentnie poprowadzone badania, które doprowadziły do sformułowania ważnych konkluzji. Uzyskane wyniki mają w większości nowatorski, oryginalny charakter. Co ważne, rezultaty badań inspirowały do formułowania kolejnych pytań, odkrywają zatem nowe horyzonty poznawcze. Mimo braku potwierdzenia wyjściowej hipotezy i identyfikacji wczesnych biomarkerów raka płuca, autor uzyskał jednak cenne nowe dane wskazujące na potencjał biomarkerowy niektórych z badanych lipidów i 2 onkomirów w raku płuca, zwłaszcza w różnicowaniu stopnia zaawansowania nowotworu.

Dysertacja cechuje się bardzo dobrą organizacją obszernego materiału, a także sprawnością przedstawienia i omówienia wyników i ich dyskusji w świetle istniejącej literatury. Autor podjął się zadania wymagającego metodycznie. Pragnę podkreślić precyzyjne zaplanowanie i przeprowadzenie doświadczeń wraz z odpowiednimi kontrolami. Analiza i dyskusja uzyskanych danych dowodzi, że doktorant potrafi nie tylko zastosować odpowiednie techniki do wykonania badań, ale także prawidłowo

zinterpretować wyniki, porównać z danymi eksperymentalnymi uzyskanymi w innych badaniach oraz wskazać prawdopodobne przyczyny niepowodzenia. Lektura dysertacji nie pozostawia wątpliwości, że pan Mateusz Smolarz osiągnął dużą sprawność eksperymentalną oraz zdobył rozległą wiedzę i umiejętność krytycznej analizy danych, co zapewnia mu swobodę w podejmowaniu wymagających wyzwań naukowych i umożliwia prowadzenie samodzielnych badań.

Stwierdzam, że rozprawa spełnia wszystkie warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. oraz w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Z pełnym przekonaniem składam zatem do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie - Państwowego Instytutu Badawczego wniosek o przyjęcie rozprawy i nadanie autorowi stopnia naukowego doktora. Ze względu na wysoki poziom naukowy przedstawionej rozprawy doktorskiej i wagę podjętej tematyki wnioskuję jednocześnie o jej wyróżnienie.

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'U. Wojda'.

Prof. dr hab. Urszula Wojda