



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Mateusza Smolarza pt. „Scharakteryzowanie składu molekularnego egzosomów obecnych w surowicy krwi pacjentów z wczesnym rakiem płuca”

Praca doktorska została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra Wiślickiego w Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów, Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Państwowy Instytut Badawczy, Oddział w Gliwicach

Rak płuca jest drugim, po raku prostaty, najczęściej diagnozowanym nowotworem u mężczyzn oraz drugim, po raku piersi, nowotworem u kobiet. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia, rak płuca od lat stanowi pierwszą co do częstości przyczynę zgonów z powodu choroby nowotworowej na świecie. Mimo znacznego postępu jaki dokonał się w ciągu ostatnich lat w zakresie precyzyjnej diagnostyki nowotworów oraz nowych, często celowanych strategii terapeutycznych, efekty leczenia raka płuca są wciąż dalekie od oczekiwań. Nic więc dziwnego, że nowotwór ten jest przedmiotem intensywnych badań, zarówno w aspekcie jego diagnostyki, jak i terapii. Na tym tle, w przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej mgr Mateusz Smolarz podjął się trudnego zadania oceny profilu molekularnego egzosomów surowicy krwi pacjentów z wczesnym rakiem płuca w aspekcie identyfikacji lipidów i miRNA, potencjalnie różnicujących pacjentów od osób zdrowych. Wybór takiej tematyki badawczej jest ze wszelkich miar uzasadniony, albowiem egzosomy lub szerzej pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, są obecnie przedmiotem intensywnych badań pod kątem ich wykorzystania jako biomarkerów różnych chorób, zwłaszcza nowotworowych. Ich dostępność w formie „płynnej biopsji” z różnych płynów ustrojowych, stanowić może bardzo dogodne źródło materiału diagnostycznego do wykrywania i charakterystyki rozwijającego się nowotworu, a także monitorowania efektów leczenia. Istotnym aspektem, dodatkowo podnoszącym rangę przedmiotowych badań, było uzyskanie funduszy na ich realizację w ramach grantu OPUS z Narodowego Centrum Nauki.

Rozprawa posiada układ typowy dla prac doświadczalnych, poprzedza ją streszczenie w języku polskim i angielskim, a zamyka wykaz publikacji, w tym prac oryginalnych, związanych z tematem rozprawy.

W obszernym „Wstępie” Autor wprowadza czytelnika w problematykę podjętych badań, poczynając od epidemiologii raka płuca. Kolejno omawia jego klasyfikację kliniczną i czynniki etiologiczne, diagnostykę służącą jego wczesnej wykrywalności, kończąc na przedstawieniu potencjalnych biomarkerów tego nowotworu, w tym również opartych na miRNA czy zmianie profilu lipidowego w tkankach i płynach ustrojowych chorych. W tym kontekście Autor odnosi się też do aktualnych badań

klinicznych, których celem jest weryfikacja, głównie różnych rodzajów miRNA, pod kątem ich przydatności w klinice. W dalszej części Autor płynnie przechodzi do aspektów dotyczących samych egzosomów, a właściwie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, obejmujących również egzosomy. Doktorant słusznie zwraca tu uwagę na różnice między tymi dwoma pojęciami, powołując się na ostatnie rekomendacje MISEV2018. Świadczy to o Jego głębokiej znajomości tej problematyki badawczej. W tej części „Wstępu” Doktorant szczegółowo opisuje mechanizmy komórkowe powstawania egzosomów, wskazuje na osocze i surowicę krwi, jako główne źródła ich pozyskiwania do badań, przedstawia metody ich izolacji. Na koniec, podnosi rolę egzosomów w rozwoju raka płuca oraz podkreśla ich potencjalne znaczenie w diagnostyce tego nowotworu. Napisanie całej tej części rozprawy wymagało od Autora dużo wysiłku, gdyż dotyczyło różnorodnych zagadnień, których złożenie w logiczną całość nie było łatwe. Doktorant wywiązał się z tego zadania znakomicie, a cały ten rozdział posiada wysoce edukacyjny charakter.

Założenia i cel pracy zostały jasno i logicznie sformułowane w kontekście światowego piśmiennictwa z tego tematu.

Kolejna część pracy to „Materiały i metody”. W rozprawie wykorzystano próbki surowicy zgromadzone w trakcie badania przesiewowego, wykorzystującego nisko dawkowaną tomografię komputerową do wczesnej diagnostyki raka płuca, realizowanego w latach 2016-2018 przez zespół badaczy z Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Doktorant szczegółowo przedstawił tu grupy badane, obejmujące chorych z rakiem płuca, zdrowych ze zdiagnozowanymi łagodnymi guzkami płuc oraz grupę kontrolną osób zdrowych, bez zmian radiologicznych w płucach, wszystkie dobrane pod względem liczebności, płci i wieku. Przedstawione dalej procedury laboratoryjne zostały właściwie dobrane i szczegółowo opisane. Obejmują one m.in. zaawansowane techniki biologii molekularnej i spektrometrii mas. Uwagę zwraca szeroki zakres metod stosowanych do charakterystyki uzyskanych egzosomów, obejmujący techniki fizyczne (DLS), biochemiczne (Western blot) i mikroskopowe (TEM). Na uznanie zasługują również precyzyjnie opisane metody obliczeniowe i statystyczne, dostosowane do odpowiednich technik badawczych.

Rozdział „Wyniki” Doktorant rozpoczyna od charakterystyki jakościowej egzosomów izolowanych metodą chromatografii wykluczenia na kolumnach z sefarozą, ze szczególnym uwzględnieniem oceny ich rozkładu wielkości oraz obecności białek markerowych. Następnie Autor dokonał oceny ekspresji profilu miRNA i metabolitów w dwóch frakcjach egzosomów uzyskanych z surowicy osób zdrowych różnej płci, połączonych w obrębie frakcji. Takie podejście metodyczne pozwoliło na zoptymalizowanie ilości RNA do syntezy cDNA i wyeliminowanie z dalszego etapu badań parametrów metabolicznych, występujących w egzosomach poniżej progu detekcji. W odniesieniu do tego fragmentu rozprawy mam kosmetyczną uwagę. W opinii recenzenta ilość RNA powinna być wyrażona jako stężenie w ng/ml, a nie w jednostkach objętości, co w dużym stopniu ogranicza powtarzalność uzyskanych wyników. Wyjaśnienia wymaga również użycie do profilowania miRNA zestawu dedykowanego dla materiału izolowanego z płynu mózgowo-rdzeniowego lub moczu, podczas gdy w przedmiotowych badaniach egzosomy pochodziły z surowicy.

W kolejnym podrozdziale Doktorant przedstawił panel wybranych, w oparciu o dane literaturowe dla raka płuca, 12 rodzajów miRNA, których poziom był następnie oceniany w egzosomach izolowanych z surowicy uczestników badania przesiewowego. Szczegółową analizę ekspresji wybranych rodzajów miRNA, Doktorant słusznie poprzedził oceną jakościową wyizolowanego z egzosomów materiału, biorąc pod uwagę ilość uzyskanego całkowitego RNA, stopień hemolizy próbki oraz wydajność etapów izolacji RNA i syntezy cDNA. Wszystkie te parametry są bowiem kluczowe dla miarodajnej oceny stopnia ekspresji miRNA. Szkoda, iż do tego etapu badań Doktorant wybrał istotne dla raka płuca miRNA wyłącznie w oparciu o dane literaturowe, a nie dokonał ich szerszego przeglądu, stosując do próbek pacjentów zestawu umożliwiające pomiar ekspresji 96 różnych miRNA, tak jak to uczynił wcześniej dla próbek testowych, pochodzących od osób zdrowych. Takie podejście metodyczne mogłoby pozwolić na identyfikację innych onkomirów,

potencjalnie istotnych dla wczesnego raka płuca w naszej populacji. Przypuszczam, iż na przeszkodzie stanęły tu względy ekonomiczne, ograniczające skalę podjętych badań.

Wyniki badań ekspresji 12 wybranych miRNA, Doktorant przedstawił kompleksowo, na czytelnych wykresach pudełkowych oraz zestawił w szczegółowych tabelach. Uwzględnił tu różne sposoby analizy, w tym normalizację, przyjmując różne punkty odniesienia: albo ekspresję genów referencyjnych, albo średnią ekspresję wszystkich miRNA w próbce, albo całkowitą ilość RNA w próbce; lub wziął pod uwagę stosunek poziomu ekspresji dwóch różnych miRNA. Analiza przy zastosowaniu normalizacji wyników względem średniej ekspresji miRNA w obrębie próbki pozwoliła na stwierdzenie korelacji pomiędzy poziomem ekspresji miR-21-5p oraz miR-30c-5p a stopniem zaawansowania nowotworu - w zaawansowanych stadiach choroby ekspresja obu rodzajów miRNA rosła. Różnice między analizowanymi grupami zaobserwowano natomiast przy ocenie stosunku poziomów obu tych onkomirów. Nie osiągnęły one jednak istotności statystycznej. Analiza stosunku poziomu ekspresji dwóch różnych miRNA wykazała dla 10 proporcji występowanie trendu, głównie rosnącego (9/10), zależnego od stopnia zaawansowania choroby, w których występował miR-21-5p lub miR-30c-5p. Wyniki te, choć bez wyraźnej istotności statystycznej, mogą wskazywać na rolę tych dwóch onkomirów również w rozwoju raka płuca.

W drugiej części tego rozdziału Doktorant przedstawił wyniki badań nad składem lipidowym egzosomów w poszczególnych grupach. Wykazały one istotne statystycznie różnice w zawartości 5 związków, z wyraźnie podwyższonym ich poziomem w grupie pacjentów nowotworowych oraz 8 lipidów, których poziom zmieniał się ze stopniem zaawansowania nowotworu (5/8 wykazywało trend rosnący). Uzyskane w poszczególnych etapach wyniki badań Doktorant zwięźle rekapitułuje w podrozdziale „Podsumowanie wyników”.

Kolejny rozdział „Dyskusja” zasługuje na uznanie. W tej części rozprawy, Doktorant ponownie wykazał się bardzo dobrą znajomością przedmiotu i wnikliwie ustosunkował się do uzyskanych wyników na tle piśmiennictwa. W „Dyskusji” Autor podkreśla, iż związek pomiędzy składem ilościowym i jakościowym egzosomów, lub ogólnie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, a chorobą nowotworową i jej progresją, został w literaturze już dobrze udokumentowany, m.in. na podstawie wzrastającej liczby pęcherzyków. W tym kontekście Doktorant wskazuje również na istotną rolę metody użytej do ich izolacji, podkreślając braki w standaryzacji takich metod i ich swoistości względem konkretnego rodzaju pęcherzyków. Bardzo trafnie podkreśla rolę „zanieczyszczenia” preparatów zwłaszcza małych pęcherzyków, wśród nich egzosomów, innymi składnikami, np. białkami surowicy czy frakcjami LDL i VLDL lipidów oraz dyskutuje wykorzystanie metod potencjalnie pozwalających na ich eliminację. W tym miejscu pragnę podkreślić, iż w przeciwieństwie do badań składu białkowego i miRNA, ocena metabolitów komórek rodzicielskich, w tym profilu lipidowego, zawartego w pęcherzykach jest unikalna na tym polu badań. Nie dziwi więc, iż wyniki dotyczące tego aspektu rozprawy zostały już przez Doktoranta opublikowane w prestiżowym czasopiśmie „Cancers” (IF=6,6).

W odniesieniu do badań poziomu ekspresji poszczególnych rodzajów miRNA, Autor wskazuje na niewielki potencjał diagnostyczny zidentyfikowanych różnic w kontekście wykrywania nisko zaawansowanego raka płuca w badaniu przesiewowym. Wśród przyczyn takiego stanu rzeczy podkreśla, iż na wczesnym etapie choroby, pęcherzyki/egzosomy uwalniane przez komórki nowotworowe stanowią niewielką frakcję w całej populacji pęcherzyków uwalnianych przez komórki prawidłowe. Można tu dywagować, czy wykorzystanie osocza krwi a nie surowicy, nie byłoby lepszym rozwiązaniem pod względem składu uzyskanych egzosomów. Pęcherzyki w surowicy zostają bowiem „sztucznie” zdominowane przez mikropęcherzyki i egzosomy pochodzenia płytkowego, masywnie uwalniane podczas procesu krzepnięcia krwi. Kwestię tę pozostawiam jednak do rozważenia przy ewentualnej kontynuacji tej tematyki badawczej.

W podsumowaniu dyskusji Autor wskazuje na realną możliwość wykorzystania w przyszłości analizy składników molekularnych pęcherzyków, w tym lipidów i mRNA jako biomarkerów

wczesnego raka płuca, po opracowaniu metodologii izolacji oczyszczonych pęcherzyków pochodzenia nowotworowego. Podjęcie takich badań byłoby logiczną kontynuacją tego opracowania.

Na zakończenie swojej recenzji pragnę podkreślić, iż przedłożona rozprawa jest interesująca, tak z naukowego, jak i klinicznego punktu widzenia. Jest wartościowym wkładem w rozwój badań nad wykorzystaniem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, w tym egzosomów jako źródła markerów chorób nowotworowych. Pomimo wykazania braku istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji wybranych rodzajów miRNA oraz profilu lipidów w egzosomach pacjentów z wczesnym rakiem płuca i zdrowych dawców w badaniu przesiewowym, nie przekreśla to przydatności zastosowanego podejścia metodycznego do badań z wykorzystaniem oczyszczonych populacji pęcherzyków nowotworowych. Uzyskanie takich populacji pęcherzyków w przebiegu innych chorób nowotworowych jest już możliwe.

Podjęcie badań składu lipidowego egzosomów pacjentów z rakiem płuca i osób zdrowych miało charakter nowatorski i zasługuje na szczególne uznanie, a fakt opublikowania tych wyników w czasopiśmie „Cancers”, dodatkowo weryfikuje ich wysoką wartość naukową. W tym miejscu pragnę zwrócić uwagę, iż Doktorant jest także wiodącym autorem dwóch innych artykułów, oryginalnego i przeglądowego, opublikowanych w prestiżowych czasopismach „Cancers” i „Proteomes”, mających również związek tematyczny z niniejszą rozprawą.

Podsumowując, stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Mateusza Smolarza spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz.595 z późn.zm) w związku z art. 179 ust. 1 z dnia 3 lipca 2019r „Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 z późn.zm.)”. Prezentuje ona wyniki oryginalnych badań i jest wartościowym wkładem w rozwój wiedzy na temat potencjalnego wykorzystania egzosomów do wczesnej diagnostyki raka płuca. W związku z powyższym, zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Państwowego Instytutu Badawczego z wnioskiem o dopuszczenie mgr Mateusza Smolarza do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, ze względu na zaawansowanie technologiczne i bardzo wysoką wartość naukową przeprowadzonych badań, wnioskuję o wyróżnienie przedmiotowej rozprawy.

Kraków, 28.12.2021

Katedra Immunologii Klinicznej
i Transplantologii UIC

dr hab. n. med. Janusz Karan, prof.