



Gdańsk, 5 stycznia 2022

Prof. dr hab. med. Zbigniew Nowecki
Koordynator ds. przewodów doktorskich
Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii
im. Marii Skłodowskiej-Curie -
Państwowego Instytutu Badawczego.

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

Praca doktorska mgr. Mateusza Smolarza ma charakter monografii zawierającej typowo streszczenia w języku polskimi angielskim, wykaz skrótów, wstęp, cel pracy materiały i metody, wyniki, dyskusję i bibliografię. Na końcu umieszczono listę publikacji mających związek z pracą dokorską wśród których są publikacje w bardzo dobrych czasopismach takich jak *Proteomes* czy *Cancers* w których Doktorant jest pierwszym autorem. Dwie to prace oryginalne i jeden przegląd. Praca doktorska liczy łącznie 110 stron. Jest przygotowana bardzo starannie i klarowny sposób przedstawia bardzo złożone problemy.

Głównym zagadnieniem którego dotyczy praca doktorska jest charakterystyka składu molekularnego egzosomów obecnych w surowicy krwi pacjentów z wczesnym rakiem płuca. Badania te związane są z poszukiwaniem biomarkerów które pozwoliły by na wczesną identyfikację pacjentów umożliwiając tym podjęcie skutecznego leczenia. Znaczenie tego tematu nie podlega dyskusji. Rak płuca jest najczęstszą przyczyną zgonów z powodu nowotworów złośliwych ze względu na zbyt późne wykrywanie. Potencjalnym materiałem do analizy mogą być płyny ustrojowe, a obecne w tych płynach pęcherzyki pozakomórkowe są unikalną strukturą która w kontekście potencjalnych biomarkerów raka płuca nie została dotychczas dostatecznie scharakteryzowana. Istnieje szereg przesłanek, że substancje zawarte w egzosomach, w szczególności powiązane z nowotworzeniem białka i RNA a także lipidy mogą mieć szczególną wartość jako wskaźniki patologii nowotworowych.

Głównym celem ocenianej pracy doktorskiej było scharakteryzowanie profilu molekularnego egzosomów obecnych w surowicy krwi uczestników badania przesiewowego w kierunku raka płuca oraz identyfikacja składników egzosomów (lipidów i miRNA), których stężenie różnicowało osoby zdrowe i pacjentów z rakiem płuca. Trzy cele szczegółowe obejmowały: 1. Optymalizację procedury izolacji egzosomów z niewielkiej objętości surowicy na potrzeby analizy profilu miRNA oraz profilu metabolitów, 2. Analizę poziomu wybranych miRNA w



egzosomach izolowanych z surowicy. 3. Analizę profilu metabolitów w egzosomach izolowanych z surowicy.

Badane próbki pochodziły od osób u których : 1. nie wykryto zmian obrazowych, 2 wykryto łagodne (nie nowotworowe) guzki płuc, 3 wykryto zmiany zdiagnozowane jako złośliwe (nowotworowe).

Metodyka badań obejmowała procedurę izolacji egzosomów. Ta procedura nie tylko została wdrożona przez doktoranta lecz również zoptymalizowana i udoskonalona, co stanowiło istotną część pracy doktorskiej. Kontrola jakości uzyskanych egzosomów obejmowała oznaczenia panelu białek markerowych z zastosowaniem techniki Western Blot. Analiza wielkości uzyskanych egzosomów przeprowadzona była z zastosowaniem dedykowanej aparatury (Zetasizer) oraz mikroskopii elektronowej. Z uzyskanych egzosomów wyizolowano RNA i wybrane cząsteczki miRNA poddano analizie ilościowej PCR. Procedury te również zostały zoptymalizowane i udoskonalone w ramach pracy doktorskiej. Do analiz metabolitów zastosowano technikę chromatografii cieczowej z detekcją masową. Wykorzystano do tych analiz zestaw Absolute IDQ p400 HR firmy Biocrates pozwalający na ocenę stężeń >400 metabolitów.

Główne wyniki przeprowadzonych badań to:

- 1) Optymalizacja procedury chromatografii żelowej do izolacji egzosomów z niewielkiej objętości surowicy oraz określenie ograniczeń takich jak zanieczyszczenia lipoproteinami.
- 2) Wykazanie braku różnic w wielkości egzosomów wyizolowanych z surowicy osób bez zmian w płucach, z guzkami łagodnymi i pacjentami z rakiem płuca.
- 3) Wykazanie, że poziom ekspresji 12 wybranych do analizy rodzajów miRNA był podobny w egzosomach surowicy u osób bez zmian w płucach, z guzkami łagodnymi i u pacjentów z rakiem płuca.
- 4) Wykazanie, że poziom ekspresji onkomirów miR-21-5p i miR-30c-5p wzrastał w egzosomach surowicy wraz ze stopniem zaawansowania raka płuca.
- 5) Wykazanie, że względny poziom niektórych lipidów obecnych w egzosomach surowicy był różny u osób bez zmian w płucach, z guzkami łagodnymi i u pacjentów z rakiem płuca. Należały do nich takie związki jak Cer(42:1), TG(54:2), PC(24:0), CE(19:2) i LPC(20:1), których poziom wzrastał w egzosomach pochodzących od pacjentów z rakiem płuca.
- 6) Wykazanie, że względny poziom niektórych lipidów obecnych w egzosomach surowicy, np. ester cholesterolu CE(19:2), wzrastał wraz ze stopniem zaawansowania nowotworu.

Przeprowadzone analizy wykazały jedynie niewielkie różnice w poziomie ekspresji wybranych rodzajów miRNA oraz profilu lipidów kompletnej populacji egzosomów surowicy między zdrowymi uczestnikami badania przesiewowego a pacjentami z wczesnym rakiem płuca. Sugeruje to na niewielki potencjał diagnostyczny takiego badania jako testu molekularnego



wspomagającego wczesne wykrywanie raka płuca w badaniu przesiewowym. Przyczyną może być heterogenność populacji egzosomów obecnych w surowicy i niewielki udział egzosomów produkowanych przez komórki nowotworowe na wczesnych etapach choroby. W pracy podkreślono konieczność dalszych badań w szczególności opracowania technik izolacji egzosomów produkowanych przez komórki nowotworowe.

Nie ujmując wysokiej wartości przeprowadzonych badań chciałbym podzielić się kilkoma uwagami: przy opisowych badaniach jest to trudne, ale szczególnie w pracy doktorskiej powinny być zdefiniowane hipotezy badawcze, czego brakuje. Pracę cechują pewna niespójność. Na przykład opisując analizy profilu RNA, w streszczeniu i wynikach podano, że zbadano 12 wybranych cząstek, a w Metodach jest mowa o 96 cząstkach. Podobnie w przypadku analiz metabolomicznych, w różnych częściach jest mowa o analizach wybranych lipidów lub o kompleksowej analizie metabolomicznej obejmującej inne związki drobnocząsteczkowe. Pomimo bardzo zaawansowanych i skomplikowanych metod i procedur statystycznej obróbki wyników sprowadza się ona do poszukiwania pojedynczych substancji różnicujących chorych i zdrowych. Jedynie w przypadku zawartości wybranych cząstek RNA zbadano znamienność wybranych proporcji. Być może kolejne bardziej złożone pochodne uzyskanych wartości pozwoliły by na lepsze zróżnicowanie badanych grup. Szczególnie brakuje tego w analizach metabolomicznych. Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej podkreśliły konieczność poprawy techniki selekcjonowania egzosomów. Jakie są obecne możliwości w tym zakresie?

Wymienione uwagi do ocenianej przeze mnie pracy w żadnej mierze nie umniejszają jej wysokiej wartości. Praca doktorska mgr Mateusza Smolarza stanowi znaczący wkład w poszukiwanie biomarkerów chorób nowotworowych, wyznaczając dalsze kierunki takich badań. Oceniana praca spełnia wszystkie kryteria stawiane rozprawie doktorskiej określone w aktualnie obowiązujących regulacjach prawnych. Wnoszę do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie mgr Mateusza Smolarza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem
KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Biochemii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
prof. dr hab. Ryszard Tomasz Smoleński