



UNIwersYTET MEDYCZNY

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Klinika Urologii Małoinwazyjnej i Robotycznej
Uniwersyteckie Centrum Urologii

Dr hab. n.med. Bartosz Małkiewicz

Wrocław dn. 27.04.2023

Opinia na temat pracy doktorskiej mgr Kamila Szeliskiego pt: „Diagnostic Potential of Extracellular Vesicles in Prostate Cancer.”

Promotor: Prof. dr hab. Marta Pokrywczyńska

Promotor pomocniczy: Dr n.med. Filip Kowalski

Rak gruczołu krokowego jest najczęstszym nowotworem złośliwym u mężczyzn na świecie i każdego roku diagnozowanych jest około 1,5mln nowych przypadków. Wg raportu Krajowego Rejestru Nowotworów z 2019 roku rak prostaty również zajął pierwsze miejsce pod względem zachorowalności w Polsce. W 2019 roku odnotowano 17638 tysięcy nowych zachorowań, a szacunki zakładają, że w 2024 roku będzie ich ponad 27 tysięcy (przyrost o 55%). Wspomniane dane świadczą o skali problemu, który wymaga wdrażania nowoczesnych programów wczesnej diagnostyki i udoskonalania metod leczenia.

Postępowanie terapeutyczne zależy głównie od stopnia zaawansowania miejscowego i złośliwości histologicznej nowotworu. Wybór terapii zależy także od wieku, przewidywanego czasu przeżycia oraz schorzeń współistniejących. Nowotwór o niskim stopniu złośliwości we wczesnym stadium charakteryzuje się słabą dynamiką progresji miejscowej i niskim potencjałem tworzenia przerzutów i określany jest mianem raka nieistotnego klinicznie. Powyższe cechy umożliwiły wdrożenie zachowawczej formy leczenia zwanej aktywnym nadzorem (AS – *active surveillance*) polegającej na monitorowaniu postępu choroby i ewentualnej kwalifikacji do leczenia radykalnego w przypadku progresji. AS umożliwia wielu chorym uniknięcie lub odroczenie leczenia definitywnego, obciążonego działaniami niepożądanymi niezależnie od formy (leczenie chirurgiczne

lub radioterapia). Niestety mamy świadomość, że obecnie dostępne metody diagnostyczne stosowane w AS są niedoskonałe i inwazyjne (powtórne biopsje). Tym samym stale poszukujemy narzędzi mniej inwazyjnych i cechującymi lepszymi parametrami diagnostycznymi.

W ciągu ostatniej dekady nastąpił niezwykle postęp w odkrywaniu biomarkerów raka prostaty za pomocą testów na bazie płynów ustrojowych (moczu i krwi). Płynna biopsja to minimalnie inwazyjna procedura badania cząsteczek związanych z rakiem w krążących komórkach nowotworowych (CTC), pozakomórkowym DNA i pęcherzykach zewnątrzkomórkowych (EV). Płynne biopsje mają tę zaletę, że wykrywają niejednorodność, a także nabytą oporność w raku. EV to pęcherzyki pochodzące z komórek otoczone dwuwarstwą lipidową i zawierające różne cząsteczki, takie jak kwasy nukleinowe, białka i lipidy. U pacjentów z rakiem EV pochodzące z guzów można izolować z moczu, osocza i surowicy. Postępy w technikach izolacji dają możliwość wykorzystania EV jako biomarkerów w klinice. Pojawiające się dowody sugerują, że EV mogą być przydatnymi biomarkerami do diagnozowania raka prostaty, zwłaszcza klonów o wysokim stopniu złośliwości. EV mogą być również silnymi markerami do przewidywania postępu choroby u pacjentów z rakiem prostaty opornym na kastrację. EV uwalniane z komórek rakowych i zrębowych biorą udział w rozwoju mikrośrodowisk guza, zwiększając progresję raka, przerzuty i lekooporność. Proces wdrożeniowy biomarkerów oprócz związku klinicznego oraz późniejszej walidacji wartości diagnostycznych poprzedzony jest opracowaniem prawidłowego procesu oznaczania z użyciem odpowiednich technik. Na podstawie dostępnej literatury wiemy, że istnieje szereg metod laboratoryjnych umożliwiających identyfikację pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, natomiast nie ma konsensusu, która z nich jest najbardziej precyzyjna i pozbawiona wad.

Należy zatem pogratulować autorowi wyboru tematu pracy doktorskiej, w której analizuje aspekty technologiczne izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz profil markerów powierzchniowych i miRNA u chorych z rakiem gruczołu krokowego. Temat dysertacji jest odzwierciedleniem aktualnych kierunków badań nad rolą biologiczną pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w raku prostaty.

Przedstawiona do oceny praca doktorska pod tytułem „Diagnostic Potential of Extracellular Vesicles in Prostate Cancer” wraz z piśmiennictwem liczy 119 stron. Praca jest napisana w języku angielskim i podzielona na klasyczne rozdziały: wstęp, cel pracy, materiał i metoda, wyniki i ich omówienie, dyskusja, wnioski i piśmiennictwo. Zawiera dodatkowo streszczenia w języku polskim i angielskim, spis rycin, spis tabel, wykaz skrótów i 2 załączniki (kopie zgód Komisji Bioetycznej na wykonanie zadania badawczego oraz referencyjne sekwencje miRNA). Uzupełnieniem tekstu są 4 tabele i 29 rycin.

We wstępie, po krótkim opisie anatomii gruczołu krokowego, doktorant w sposób jasny i zwięzły w oparciu o starannie dobrane piśmiennictwo omawia epidemiologię raka prostaty, etiologię, androgenozależność oraz metody diagnostyczne stosowane w celu ustalenia stopnia zaawansowania nowotworu. W dalszej części rozdziału autor dokonuje przeglądu obecnie stosowanych sposobów postępowania terapeutycznego w raku prostaty. Szkoda, że autor nie wspomniał o najnowszych lekach (antyandrogenach nowej generacji ARTA i inhibitorach PARP), co byłoby doskonałym uzupełnieniem tematu. W podrozdziale 1.3 przedstawiono definicję, klasyfikację metody oznaczania i rolę pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Należy podkreślić zwięzłość i syntetyczność wstępu, który stanowi swoiste kompendium wiedzy o raku gruczołu krokowego i biologicznych właściwościach EV.

Cel pracy został określony w 2 punktach. Pierwszy stanowiło porównanie wybranych metod oczyszczania małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (ang. Small Extracellular Vesicles – sEVs) z surowicy i moczu pacjentów z zdiagnozowanymi nowotworami prostaty, w celu doboru metody do dalszych badań nad diagnostycznym potencjałem tych cząsteczek. Kolejnym celem była analiza markerów powierzchniowych i profilu miRNA średniej wielkości EV pod kątem możliwości rozróżnienia pacjentów zaklasyfikowanych do AS od pacjentów nie kwalifikujących się do tej terapii.

W kolejnych rozdziałach dysertacji autor przedstawia sposób pozyskania materiału biologicznego oraz metodologię przeprowadzonych prac laboratoryjnych. Do badania włączono 39 pacjentów z rakiem prostaty kwalifikowanych do leczenia na drodze prostatektomii radykalnej. Próbkę od 15 chorych zakwalifikowano do porównania metod oczyszczania małych EV. W tej części doktorant przeanalizował następujące metody: wytrącanie, chromatografię wykluczania rozmiaru i separację immunomagnetyczną. Osocze pobrane od pozostałych 24 pacjentów zostało poddane analizie potencjału diagnostycznego pęcherzyków zewnątrzkomórkowych średniej wielkości w celu stratyfikacji ryzyka agresywności. Autor dokonał oceny markerów powierzchniowych za pomocą nano-cytometrii przepływowej oraz sprawdził profil miRNA.

Wątpliwości budzi dość prosty podział pacjentów na AS i nie-AS gdzie jedynym czynnikiem klasyfikującym jest stopień złośliwości histologicznej. Jak wiadomo pod uwagę bierze się również m.in. stopień zaawansowania miejscowego czy stężenie PSA. Ma to szczególne znaczenie w przypadku chorych z GGG 2 (Gleason score 3+4), którzy powinni być ściśle wyselekcjonowani a pomimo to siła zalecenia w wytycznych EAU odnośnie stosowania AS w tej populacji ma rangę: słaba. To zastrzeżenie również odnosi się do przedstawionej w wynikach dość ograniczonej charakterystyki klinicznej obu badanych podgrup. Nie odnosi się do małej liczebności porównywanych podgrup, gdyż jak sądzę badanie ma charakter pilotażowy.

Wyniki pracy przedstawione są w sposób przejrzysty i ilustrowane starannie opracowanymi tabelami i rycinami. Na szczególną uwagę zasługują obserwacje dotyczące wyników nano-cytometrii przepływowej średniej wielkości EV analizujących markery powierzchniowe i wskazujące na potencjalną wartość diagnostyczną sPSAM+/PSMA+CD9+. Równie ciekawa jest analiza profili miRNA pęcherzyków zewnątrzkomórkowych średniej wielkości, w której autor jako pierwszy dowodzi wartości diagnostycznej miR-99a-5p oraz miR-145-5p.

W rozdziale „Dyskusja” doktorant na podstawie dobrze dobranych i aktualnych pozycji piśmiennictwa wyczerpująco analizuje wszystkie aspekty przeprowadzonych badań. Interesujące są fragmenty, w których omawia profile miRNA i ich wartość kliniczną. Drobiazgowo przedstawienie własnych obserwacji i porównanie ich z wynikami innych autorów dowodzi dużej wiedzy autora dysertacji. Na podkreślenie zasługuje również krytyczne podejście do uzyskanych wyników i świadomość ograniczeń metodologicznych przeprowadzonych badań.

Zwieńczeniem dysertacji jest 8 wniosków, które logicznie wynikają z celów pracy i odpowiadają na pytania stawiane przez doktoranta. Stanowią podsumowanie dokładnej i wielopłaszczyznowej analizy. Należy podkreślić wartość istotną praktyczną konkluzji np. wskazanie na chromatografię wykluczania rozmiaru jako metodę dającą najlepsze rezultaty w przypadku obecności zanieczyszczeń białkowych czy potwierdzenie, że precypitacja nie jest optymalną metodą oczyszczania sEVs z surowicy krwi obwodowej, ponieważ znacznie zwiększa rozmiar uzyskiwanych sEVs oraz skutkuje najwyższym stężeniem zanieczyszczeń białkowych w porównaniu z innymi metodami. W aspekcie klinicznym potwierdzenie, że osocze krwi obwodowej pacjentów z rakiem prostaty może być źródłem pęcherzyków mEVs PSMA+ wydzielanych przez komórki gruczołu krokowego oraz wykazanie, że cytometryczna analiza nanoFlow markerów powierzchniowych mEVs w osoczu krwi obwodowej i profilowanie miRNA zapewnia nową, potencjalnie lepszą, nieinwazyjną alternatywę dla pomiarów PSA w celu stratyfikacji ryzyka progresji raka prostaty podczas aktywnego nadzoru stanowią podstawę do dalszych badań w tym obszarze.

Z obowiązku recenzenta zmuszony jestem do zgłoszenia kilku uwag. Oprócz wspomnianych wcześniej wątpliwości dotyczących kwalifikacji chorych do poszczególnych podgrup (AS, non-AS), zabrakło dokładniejszej charakterystyki klinicznej chorych. Autor nie ustrzegł także się błędów edytorskich, tj. strona 20 - Rycina 4 i cytowanie nr 103 - braku odniesienia w tekście, podobnie wyjaśnienia w tekście nie uwzględniono dla ryciny od 5 do 11 oraz nieprawidłowe cytowanie referencji nr 15 - EAU Guidelines. – powinno być: Mottet N, van den Bergh RCN, Briers E, Van den Broeck T, Cumberbatch MG, De Santis M, et al.. EAU-EANM-

ESTRO-ESUR-SIOG Guidelines on Prostate Cancer-2020 Update. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. Eur Urol. 2021 Feb;79(2):243-262.

Przytoczone powyżej potknięcia nie umniejszają merytorycznej wartości pracy. Badanie zostało przeprowadzone rzeczowo, wielowątkowo, z zachowaniem właściwych metod badawczych, co wskazuje na dojrzałość naukową autora. Oceniana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Art. 187 ust. 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz.U. 2018 poz. 1668). Pozwalam sobie zatem przedłożyć Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu wniosek o dopuszczenie mgr Kamila Szeliskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uwzględniając kompleksową analizę, nowatorski kierunek badań podjętych w przedstawionej do recenzji dysertacji wnioskuję o jej wyróżnienie.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
Uniwersyteckie Centrum Urologii
KLINIKA UROLOGII MAŁOINWAZYJNEJ I ROBOTYCZNEJ
Kierownik

dr hab. n. med. Bartosz Malkiewicz

