



Recenzja pracy magisterskiej
Włodzki @ Wydział Lekarski
M. Pawłowska

prof. dr hab. Małgorzata Pawłowska

ZAKŁAD MEDYCZYNY REGENERACYJNEJ I IMMUNOREGULACJI

UNIwersytet Medyczny w Białymstoku

Wydział Lekarski

z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim

Białystok, 03 maj 2023

Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych
pt. „Diagnostic potential of extracellular vesicles in prostate cancer”
autorstwa mgr Kamila Szeliskiego
realizowanej pod kierunkiem
prof. dr hab. Marty Pokrywczyńskiej – promotora pracy oraz
dr n. med. Filipa Kowalskiego, FEBU – promotora pomocniczego

Rak prostaty jest drugim co do częstości występowania nowotworem u mężczyzn. Pomimo znacznego postępu w diagnostyce oraz leczeniu nowotworów układu moczowo-płciowego męskiego, polegających na wprowadzeniu nowoczesnych metod obrazowania, rozwoju technik chirurgii małoinwazyjnej oraz wprowadzeniu nowych leków, nadal poszukuje się sposobu wczesnego wykrywania choroby oraz lepszej stratyfikacji i monitoringu pacjentów. Jedną z obecnie rozwijanych strategii jest wykorzystanie tzw. płynnej biopsji (ang. *Liquid Biopsy*), która powszechnie uznawana jest za narzędzie posiadające potężne możliwości diagnostyczne umożliwiające analizę krążących komórek nowotworowych lub materiału uwalnianego przez nowotwór do płynów ustrojowych włączając w to osocze i mocz. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (pęcherzyki wydzielnicze, ang. *extracellular vesicles*) to niewielkie sfery ograniczone błoną komórkową uwalniane przez wszystkie komórki organizmu, w tym również komórki nowotworowe. Ich rola w procesie rozwoju nowotworu nie została w wystarczający sposób poznana i opisana, ale powszechnie uznaje się, że jako czynniki uwalnianie przez komórki nowotworowe mogą pomóc w procesie diagnostycznym. Aby było to możliwe konieczna jest optymalizacja procedur ich pozyskiwania

oraz lepsze ich scharakteryzowanie. W związku z powyższym wysoce interesująca i aktualna jest tematyka badań podjętych przez Pana magistra Kamila Szeliskiego.

Przedstawiona do recenzji rozprawa została przygotowana w języku angielskim i ma układ charakterystyczny dla dysertacji na stopień naukowy doktora. Na 119 stronach maszynopisu Doktorant zawarł 14 rozdziałów obejmujących: wstęp, cel badań, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, streszczenie w języku angielskim, streszczenie w języku polskim, spis piśmiennictwa, spis używanych skrótów, listę tabel, listę rycin, zgodę komisji bioetycznej oraz referencyjne sekwencje miRNA wykorzystywane podczas prowadzonych analiz. Część graficzna obejmuje 29 czytelnych rycin oraz 4 tabele. Rozdziały poprzedzone są spisem treści ułatwiającym poruszanie się po tekście. Praca przygotowana jest starannie, poprawnie językowo i zrozumiale.

Wprowadzenie, obejmuje dwadzieścia dwie strony maszynopisu. W rozdziale tym Doktorant przedstawia najbardziej istotne zagadnienia związane z tematem badawczym. Wprowadzenie podzielone jest na 3 podrozdziały, a każdy podrozdział na kolejne sekcje. W podrozdziale 1.1 Doktorant opisuje anatomiczną budowę oraz funkcję prostaty. Dziwić może wprowadzenie w tej części dodatkowej sekcji, która jest jedynym elementem tego rozdziału i nie została poprzedzona słowem wstępu. W podrozdziale 1.2 mgr Szeliski charakteryzuje nowotwory prostaty. Rozdział ten podzielony został na 4 sekcje, w których Doktorant szczegółowo opisuje: epidemiologię i etiologię choroby, rolę androgenów w rozwoju raka prostaty, możliwości diagnostyczne, a także opcje terapeutyczne. Podrozdział 1.3 poświęcony został charakterystyce pęcherzyków wydzielniczych. W trzech sekcjach Doktorant przedstawia definicję i klasyfikację pęcherzyków wydzielniczych, opisuje metody ich analizy oraz charakteryzuje ich rolę w procesach fizjologicznych i patologicznych. Odbiór wstępu ułatwiają załączone dwie tabele oraz dziewięć starannie przygotowanych rycin.

W rozdziale drugim Doktorant przedstawia dwa jasno sprecyzowane cele pracy, obejmujące: 1) Porównanie różnych metod izolacji/oczyszczania małych pęcherzyków wydzielniczych z osocza krwi obwodowej oraz moczu osób chorych na raka prostaty; 2) Analizę markerów powierzchniowych oraz małych niekodujących fragmentów RNA (miRNA) znajdujących się w pęcherzykach wydzielniczych o średniej wielkości izolowanych z osocza krwi obwodowej pacjentów z rakiem prostaty celem oceny ich przydatności diagnostycznej w ocenie ryzyka w strategii aktywnego nadzoru.

Rozdział trzeci „Materiały i Metody” stanowi 9-stronicowy opis wykorzystywanego materiału biologicznego, kwalifikacji dawców oraz metod analitycznych wykorzystywanych podczas realizacji projektu doktorskiego. Podobnie jak wstęp podzielony został na podrozdziały i sekcje.

Materiał do badań stanowiły krew obwodowa oraz mocz pobrane od pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem prostaty zakwalifikowanych do radykalnej prostatektomii w Klinice Urologii Ogólnej i Onkologicznej Szpitala Akademickiego numer 1 w Bydgoszczy. Do badania zakwalifikowano 39 pacjentów. Materiał od 15 pacjentów został wykorzystany do porównania różnych protokołów oczyszczania małych pęcherzyków wydzielniczych. Materiał od pozostałych 24 chorych został wykorzystany podczas analizy przydatności diagnostycznej pęcherzyków wydzielniczych o średniej wielkości. Pacjenci zakwalifikowani do drugiej części projektu zostali następnie podzieleni na dwie grupy - pacjentów zakwalifikowanych do aktywnego nadzoru (AS, n=12) oraz niezakwalifikowanych (non-AS, n=12) – na podstawie badań diagnostycznych. Niestety, Doktorant nie wyjaśnia w jaki sposób zostały wyselekcjonowani dawcy do obu części projektu. Zastanawiające jest również, czy podczas kwalifikacji pacjentów stosowane były dodatkowe kryteria włączenia do lub wyłączenia z badania?

Na przeprowadzenie badań Doktorant uzyskał zgody Lokalnej Komisji Bioetycznej (KB 239/2019 oraz KB 183/2019), których kopie zostały załączone do dysertacji w rozdziale 13.

Na uwagę zasługuje bardzo dokładny opis sposobu w jaki został pozyskiwany oraz przetwarzany materiał biologiczny. Niezwykła dbałość o czas pobierania oraz jego przetwarzania świadczy o wysokiej świadomości Doktoranta. Podejście takie zapewnia wysokie standardy jakościowe i wskazuje na doskonałą współpracę z personelem Kliniknym. W podrozdziale 3.2 Doktorant prezentuje strategię mającą na celu porównanie różnych metod oczyszczania pęcherzyków wydzielniczych o małej wielkości. Do porównania Doktorant wybrał trzy metody oczyszczania, mianowicie: metodę precypitacji, metodę chromatograficzną (ang. size exclusion chromatography), oraz metodę separacji magnetycznej. Opis zaproponowanych metod poprzedza rycina wizualizująca przyjęty plan badań. Brakuje jednak informacji czy materiał pobrany od każdego pacjenta zakwalifikowanego do tej części badania poddawany był wszystkim trzem procedurom oczyszczania?

W podrozdziale 3.3. mgr Szeliski opisuje metody analizy wielkości oraz stężenia/ilości małych pęcherzyków wydzielniczych. Następnie w podrozdziale 3.4 opisuje cytometryczne analizę markerów powierzchniowych małych pęcherzyków wydzielniczych. Aby umożliwić ich detekcję z wykorzystaniem cytometru przepływowego FACS Canto II przeprowadzono ich immobilizację na kulkach lateksowych wykorzystując zmodyfikowany protokół opisany przez Suareza i współpracowników. Podejście takie jest oczywiście bardzo dobrym rozwiązaniem, zastanawiające jest jednak w jaki sposób zostały dobrane warunki immobilizacji małych pęcherzyków wydzielniczych? Czy Doktorant prowadził ocenę efektywności procesu immobilizacji?

W kolejnych etapach próbki były barwione z wykorzystaniem panelu przeciwciał monoklonalnych. Kontrolę barwienia stanowiły kulki lateksowe niepoddawane procedurze immobilizacji (zakładam, że były one inaktywowane) oraz próbki niebarwione. Wyniki przeprowadzonych analiz zaprezentowano jako Staining Index (SI). Proszę o informację czy do obliczania SI wykorzystano uśrednione wartości z obu kontroli czy tylko najwyższą? W jaki sposób dobrano stężenia przeciwciał monoklonalnych do barwień cytometrycznych? Czy prowadzono kalibrację urządzenia – kompensację fluorochromów? Czy podczas analizy danych stosowano bramkowanie zdarzeń czy raczej brano pod uwagę wszystkie zdarzenia zebrane podczas analizy próbek? Ile zdarzeń było zbieranych podczas analizy próbek?

W podrozdziale 3.5 Doktorant opisuje sposób analizy zanieczyszczeń białkowych. Podrozdział 3.6 poświęcony jest opisowi metod analizy pęcherzyków wydzielniczych o średniej wielkości, izolowanych z osocza krwi. Podobnie jak w przypadku analiz pęcherzyków wydzielniczych o małej wielkości Doktorant prezentuje rycinę graficznie obrazującą protokół postępowania, a następnie w kolejnych sekcjach szczegółowo opisuje wykorzystane metody pozwalające ocenić wielkość pęcherzyków i ich stężenie/ilość, markery powierzchniowe oraz profil miRNA. W ostatnim podrozdziale Doktorant zawarł opis metod statystycznych wykorzystanych podczas analizy wyników.

Wszystkie opisy wykorzystanych metod wykonane są szczegółowo oraz w sposób pozwalający w razie potrzeby na odtworzenie wykonanych badań. Szeroki wachlarz metod badawczych oraz odpowiedni ich dobór świadczą o doskonałym przygotowaniu Doktoranta do pracy laboratoryjnej. Pojawiające się w tej części recenzji pytania nie stanowią zarzutów merytorycznych są jedynie prośbą o uzupełnienie informacji.

Rozdział „Wyniki” składa się z 5 podrozdziałów w których Doktorant przedstawia rezultaty przeprowadzonych analiz laboratoryjnych. Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na pojawiające się błędy edycyjne obejmujące m.in. błędne oznaczenie podrozdziałów w spisie treści oraz tekście, mianowicie brakuje podrozdziału 4.1 a podrozdział 4.4 występuje dwukrotnie, błędne odniesienie do niektórych rycin (np. odniesienie do ryciny 27 zamiast 26 czy pojawienie się ryciny 30, której w pracy nie ma) oraz nieliczne błędy interpunkcyjne. Wskazane błędy nie umniejszają wysokiej wartości merytorycznej uzyskanych wyników. Sposób prezentacji danych oraz ich jakość nie budzą zastrzeżeń.

Mgr Szeliski rozpoczyna prezentację wyników od podsumowania części porównującej różne metody izolacji/oczyszczania pęcherzyków wydzielniczych o małej wielkości. Doktorant zaobserwował, że pęcherzyki wydzielnicze izolowane z osocza krwi obwodowej, oczyszczone metodą precypitacji, cechują się wyższym zróżnicowaniem wielkości oraz niższymi właściwościami przepływu w porównaniu do dwóch pozostałych metod oczyszczania. Nie zaobserwowano podobnych różnic w materiale pozyskanym z moczu. Doktorant zaobserwował natomiast istotnie niższe wartości SI dla markera CD9, znajdującego się na pęcherzykach wydzielniczych oczyszczanych metodą magnetyczną izolowanych z moczu, ale nie z osocza krwi. Dobrym zwyczajem jest włączenie podczas prezentacji wyników cytometrycznych reprezentatywnych wykresów (cytogramów) przeprowadzonych analiz, których w tej części dysertacji niestety brakuje. W kolejnych analizach mgr Szeliski zaobserwował istotnie wyższe zabrudzenie białkami w materiale izolowanym z osocza krwi po oczyszczeniu metodą precypitacji w porównaniu do dwóch pozostałych protokołów. Pomimo widocznego trendu nie zaobserwowano istotnych różnic w materiale oczyszczanym z moczu.

W podrozdziale 4.3 Doktorant charakteryzuje grupy pacjentów (zakwalifikowanych i niezakwalifikowanych do aktywnego nadzoru) włączonych do drugiej części projektu doktorskiego, mającego na celu określenie przydatności diagnostycznej mikropęcherzyków o średniej wielkości. W kolejnych podrozdziałach Doktorant opisuje kolejno: a) wyniki analiz wielkości oraz ilości/stężenia mikropęcherzyków izolowanych z osocza krwi; b) wyniki analiz cytometrycznych oceniających fenotyp mikropęcherzyków, c) wyniki profilowania miRNA. Doktorant nie zaobserwował istotnych różnic w zakresie wielkości i ilości izolowanych pęcherzyków wydzielniczych pomiędzy analizowanymi grupami pacjentów. Wyniki analiz cytometrycznych poprzedzają dane kalibracyjne, będące wynikiem prac optymalizacyjnych.

W zakresie analizowanych markerów powierzchniowych na pęcherzykach wydzielniczych izolowanych od pacjentów z analizowanych grup, mgr Szeliski nie zaobserwował istotnych statystycznie różnic. Co ciekawe, analizując stosunek odsetka mikropęcherzyków wydzielniczych PSMA+ względem mikropęcherzyków PSMA+CD9+ zaobserwował podwyższony współczynnik w grupie non-AS w porównaniu do AS. Należy podkreślić, że odsetki obu populacji mikropęcherzyków są niewielkie i wynoszą <1%. Mamy zatem do czynienia z analizą rzadkich zdarzeń (ang. *rare events*). Jedynie populacja mikropęcherzyków posiadających na swojej powierzchni marker CD9 była liczniejsza i stanowiła więcej niż 1% wszystkich analizowanych zdarzeń (średnio 6,939% w grupie AS względem 3,636% w grupie non-AS). Okazuje się zatem, że przeważająca większość analizowanych mikropęcherzyków nie miała na swojej powierzchni żadnego z analizowanych markerów. Oceniając wielkość fenotypowo różnych mikropęcherzyków pomiędzy grupami pacjentów Doktorant zwraca uwagę na możliwe ograniczenia zastosowanej metody, po raz kolejny pokazując dojrzałość naukową. Co ciekawe, średnia wielkość analizowanych zdarzeń z wykorzystaniem metody cytometrii przepływowej (zaprezentowanych na rycinie 25) w większości analizowanych fenotypowo różnych mikropęcherzyków wydzielniczych jest znamienne różna od wcześniejszych wyników zaprezentowanych na rycinie 19. Byłbym wdzięczny za komentarz do tej uwagi.

W rozdziale 4.5 Doktorant opisuje wyniki profilowania małych niekodujących fragmentów RNA wykonanych metoda ilościowego PCR. W pierwszej części skupia się na kontroli jakości, wskazując na ograniczenia metody. Następnie płynnie przechodzi do opisu uzyskanych wyników, które obrazuje w przejrzysty sposób w postaci "volcano plots" oraz „heatmaps”, a także dodatkowo podsumowuje je w postaci tabeli. Zgodnie z przedstawionymi danymi wydaje się, że potencjał diagnostyczny posiadają miR-99a-5p, miR-125b-5p, miR-145-5p oraz miR-365a-3p. Doktorant trafnie zauważa jednak, że konieczne są dalsze badania na znacznie większej grupie chorych.

Wyniki zostały omówione wyczerpująco w szerokiej i krytycznej dyskusji opartej o współczesne, dobrze dobrane piśmiennictwo. Przeprowadzona dyskusja świadczy o dużej wiedzy Pana mgr Kamila Szeliskiego, jego dojrzałości naukowej oraz krytycznym podejściu do uzyskanych wyników. Dyskusję podzielono na podrozdziały, które w odróżnieniu od pozostałych rozdziałów dysertacji nie znalazły swojego odniesienia w spisie treści.

Podsumowanie pracy stanowi 8 wniosków, odpowiadających na założone cele badań. Wnioski są trafnie sformułowane i poparte uzyskanymi wynikami przeprowadzonych przez Doktoranta badań.

Reasumując stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska jest opracowaniem niezwykle ciekawym, aktualnym, oryginalnym i inspirującym do dalszych badań. Wskazane w recenzji nieliczne błędy edycyjne oraz uwagi, które wymagają doprecyzowania, nie wpływają na jakość merytoryczną uzyskanych wyników, które oceniam bardzo wysoko.

Niniejszym stwierdzam, iż przygotowana przez Pana mgr Kamila Szeliskiego rozprawa doktorska spełnia wymogi określone w art. 13. Ustawy z dnia 14 marca 2013 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Wnoszę więc do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie Pana mgr Kamila Szeliskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto z uwagi na oryginalność przeprowadzonych badań, ich szeroki zakres metodyczny oraz potencjał aplikacyjny uzyskanych wyników, składam wniosek o wyróżnienie niniejszej rozprawy.

Białystok, 03.05.2023

dr hab. Andrzej Eljaszewicz



