



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Zakład Anatomii Prawidłowej

ul. Święcickiego 6
60-781 Poznań

tel. 061 854 65 64
fax 061 854 65 68
e-mail: zap@ump.edu.pl

Poznań, 31 maja 2022 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej lek. med. Łukasza Zadka
pt. „Znaczenie egzocytozy w patogenezie raka jelita grubego”
wykonanej w Katedrze Morfologii i Embriologii Człowieka,
Zakładzie Histologii i Embriologii
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
promotor: prof. dr hab. Piotr Dziegiel

Rozprawa doktorska lek. med. Łukasza Zadka pt.: „Znaczenie egzocytozy w patogenezie raka jelita grubego” składa się z cyklu trzech, spójnych tematycznie, publikacji odnoszących się do roli egzocytozy w procesie kancerogenezy jelita grubego. Przedstawiony do recenzji manuskrypt liczy 92 strony maszynopisu obejmującego pięć rozdziałów, włączając w to przedruki artykułów składających się na pracę doktorską. Doktorant przedstawił streszczenia publikacji w języku polskim i angielskim, obejmujące wprowadzenie do każdej z nich, istotę podjętego problemu badawczego, cele badań, uzyskane wyniki oraz wnioski. Streszczenia w obydwóch wersjach językowych zostały przedstawione w sposób niezwykle przemyślany, co świadczy o dużym zrozumieniu problemu badawczego przez Autora. Ponadto sprawne posługiwanie się językiem naukowym, dobór formy przedstawiania wyników oraz trafne sformułowanie wniosków podkreśla dużą dojrzałość naukową Doktoranta.

W pierwszym rozdziale, który stanowi wstęp, Autor przedstawia krótki opis procesu egzocytozy, podkreślając jego rolę w fizjologii i patofizjologii komórek ssaków. W mojej opinii na szczególną uwagę zasługuje charakterystyka pęcherzyków pozakomórkowych. Doktorant podkreśla istotną rolę tych struktur w komunikacji i przekaźnictwie międzykomórkowym, ale także w zwraca uwagę, iż są to elementy komórkowe, które stanowią swoisty „magazyn” białek, lipidów i kwasów nukleinowych. Tym samym, pęcherzyki pozakomórkowe pełnią bardzo ważną funkcję w metabolizmie komórek

docelowych oraz regulacji wielu procesów fizjologicznych zachodzących w komórkach. W drugiej części wstępu, Autor przytacza dane epidemiologiczne odnoszące się do częstości występowania raka jelita grubego w populacji polskiej zarówno mężczyzn, jak i kobiet. Doktorant przedstawił również prognozy sugerujące procent populacji, który może być dotknięty tą chorobą w ciągu kilku najbliższych lat. Ponadto opisane zostały schorzenia predysponujące do rozwoju raka jelita grubego. Następnie Autor przedstawił podział pęcherzyków zewnątrzkomórkowych ze względu na ich wielkość i rodzaj przekazywanych cząsteczek. W tym miejscu chciałbym podkreślić, iż temat egzosomów jest mi szczególnie bliski w aspekcie prowadzonych przez mój zespół badań nad ich rolą jako „czynników” regulujących procesy regeneracyjne w obrębie komórek i tkanek ludzkich oraz zwierzęcych. Nie do końca mogę zgodzić się ze stwierdzeniem Doktoranta o trudnościach w separacji poszczególnych rodzajów pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, ponieważ dostępnych jest kilka urządzeń, które dedykowane są właśnie do izolacji. Ponadto z uwagi na różnice w rodzajach cząsteczek przekazywanych przez poszczególne typy pęcherzyków, możliwe jest ich rozróżnienie na podstawie analiz transkryptomicznych czy proteomicznych. Niemniej jednak, zgadzam się z tym, iż separacja pęcherzyków na pewno nie należy do najprostszych zadań. Rozdział wstęp zakończony został komentarzem Autora dotyczącym wielu ograniczeń badań nad rolą pęcherzyków pozakomórkowych w patogenezie i przerzutowaniu nowotworów, głównie z uwagi na trudności metodologiczne w pozyskiwaniu i charakterystyce tych struktur w tkankach litych guza i jego mikrośrodowiska. Wstęp został opracowany na podstawie 22 pozycji piśmiennictwa, w większości anglojęzycznego obejmującego pozycje sprzed czterech ostatnich lat.

Cykl publikacji składający się na rozprawę doktorską obejmuje trzy artykuły opublikowane w czasopismach o łącznym IF o wartości 14,314 oraz 340 punktach MEiN. Pierwszy artykuł pt.: „Modeling of the immune response in the pathogenesis of solid tumors and its prognostic significance”, który został opublikowany w czasopiśmie *Cellular Oncology*, stanowi przegląd danych literaturowych na temat roli aktywności układu immunologicznego oraz odpowiedzi immunologicznej w transformacji oraz progresji nowotworów litych. Zagadnienie transformacji guzów oraz związanej z nią odpowiedzi immunologiczną jest bardzo aktualne i niestety nadal słabo poznane. Szczególnie ważnym aspektem progresji nowotworów jest także aktywność sekrecyjna komórek nowotworowych, co - jak się powszechnie uważa - jest głównym czynnikiem sprawczym zmian fenotypowych komórek układu immunologicznego oraz środowiska zewnątrzkomórkowego. Badania te, jak podkreśla Autor, posiadają dużą wartość diagnostyczną i prognostyczną.

Publikacja została podzielona na dziesięć rozdziałów opisujących rolę czynników prozapalnych w progresji guzów, charakterystykę komórek układu immunologicznego na tle zmian zachodzących w mikrośrodowisku guza, rolę wybranych cytokin w regulacji kancerogenezy, wybrane przykłady nowotworów, których progresja jest związana z indukcją procesów zapalnych, zmiany metaboliczne zachodzące w komórkach nowotworowych oraz rolę pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w odpowiedzi immunologicznej. W publikacji Doktorant zawarł jedną tabelę przedstawiającą charakterystykę cytokin w aspekcie odpowiedzi immunologicznej związanej z rozwojem guzów oraz pięć informatywnych rycin. Ryciny te przedstawiają model zależności pomiędzy procesami zapalnymi i onkogenezą, znaczenie procesów zapalnych w zmianach neoplastycznych, hamowanie odpowiedzi immunologicznej oraz jej wpływ na proces gojenia się ran powstałych na skutek resekcji guza, charakterystykę oraz funkcje pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, a także rolę komórek układu immunologicznego jako czynników prognostycznych.

W związku z niewielką liczbą doniesień literaturowych odnoszących się do zagadnienia roli modulacji układu immunologicznego w procesie kancerogenezy, artykuł ten przedstawia niezwykle ważną wiedzę z punktu widzenia współczesnej onkologii.

Drugi artykuł pt.: „Comparative analysis of exosome markers and extracellular vesicles between colorectal cancer and cancer-associated normal colonic mucosa”, opublikowany w Polish Archives of Internal Medicine, przedstawia analizę porównawczą ekspresji wybranych markerów egzosomów oraz pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w raku jelita grubego. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że w przeprowadzonych przez Doktoranta badaniach wykorzystano pobrane śródoperacyjnie tkanki pochodzące aż od 109 pacjentów. Do analiz Autor wykorzystał wiele technik badawczych, tj. mikromacierze tkankowe, immunohistochemia, Western-blot, transmisyjna mikroskopia elektronowa oraz analizy statystyczne. W wyniku przeprowadzonych badań wykazano wzrost ekspresji markerów egzosomalnych w tkance nowotworowej w porównaniu do tkanki kontrolnej. Ponadto Doktorant uzyskał znaczącą korelację pomiędzy ekspresją markerów egzosomalnych a białka Ki-67 oraz zaobserwował zróżnicowaną ekspresję tetraspanin w węzłach chłonnych. Uzyskane wyniki pozwalają wnioskować o istotnym znaczeniu markerów egzosomalnych oraz procesu egzocytozy w patogenezie raka jelita grubego. W związku z ważną funkcją tych zewnątrzkomórkowych pęcherzyków w indukcji procesów regeneracyjnych, wyniki przedstawione w powyższej publikacji uważam za niezwykle istotne z punktu widzenia nowych mechanizmów regulujących progresję i transformację nowotworów.

Trzecia publikacja pt.: „Label-free quantitative phase imaging reveals spatial heterogeneity of extracellular vesicles in select colon disorders” składająca się na rozprawę doktorską przedstawia charakterystykę pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w odniesieniu to metody ich izolacji. Ponadto Autor przedstawił analizy zależności pomiędzy heterogenicznością pęcherzyków zewnątrzkomórkowych a danymi histopatologicznymi tj. stopień złośliwości oraz aktywność proliferacyjną komórek jaka jelita grubego. Badania zostały przeprowadzone także na ustalonych liniach komórkowych raka jelita grubego (HT-29, CaCo-2 i LoVo) oraz liniach nienowotworowych, kontrolnych (HMEC-1 i CCD-18Co). Ocena heterogeniczności pęcherzyków została przeprowadzona w oparciu o holotomografię cyfrową (DHT) oraz mikroanalizy pierwiastkowe (EDS). Warto podkreślić w tym miejscu, że Doktorant wykazał między innymi, że indeks refrakcji był wyższy w pęcherzykach izolowanych z komórek nowotworowych i zwiększał się wraz ze stopniem złośliwości oraz aktywnością proliferacyjną guzów.

Z uwagi na fakt, iż w dalszym ciągu poszukuje się najbardziej wydajnej metody pozyskiwania wszystkich typów pęcherzyków zewnątrzkomórkowych zarówno z komórek, jak i tkanek, dobór właściwej metodologii jest bardzo cenny również i w kontekście prowadzenia przyszłych badań. Opracowanie efektywnej techniki izolacji w przypadku egzosomów odgrywa kluczowe znaczenie w ich zastosowaniu klinicznym w terapii wybranych chorób człowieka. Jest to szczególnie istotne w odniesieniu do ich wykorzystania jako nośników białek, lipidów oraz kwasów nukleinowych, które - jak udowodniono - regulują indukcję procesów regeneracyjnych w tkankach i narządach.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawione publikacje składające się na rozprawę doktorską odnoszą się do bardzo aktualnych zagadnień związanych z onkologią eksperymentalną i kliniczną. W mojej ocenie szczególnie wartym podkreślenia jest wykorzystanie przez Autora najnowszych i wysoce zaawansowanych metod biologii komórkowej i molekularnej. Przedstawiony cykl publikacyjny został wcześniej pozytywnie oceniony przez redakcje czasopism i niezależnych recenzentów, co potwierdza, że badania zostały prawidłowo zaplanowane i przeprowadzone przez Doktoranta. Uważam, że uzyskane wyniki stanowią istotny wkład w zrozumienie patogenezy raka jelita grubego oraz sugerują ich potencjalne wykorzystanie w diagnostyce klinicznej tego nowotworu.

W mojej ocenie przedłożona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowych oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego im.

Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie lek. med. Łukasza Zadka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na niezwykłą wartość zarówno poznawczą, jak i aplikacyjną wyników przedstawionych w artykułach stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o przyznanie wyróżnienia rozprawy doktorskiej lek. med. Łukasza Zadka pt. „Znaczenie egzocytozy w patogenezie raka jelita grubego”.

Andrzej Kempich