

Gdańsk, 20 września 2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej
lekarza Łukasza Zadka
pt. „Znaczenie egzocytozy w patogenezie raka jelita grubego”

Rak jelita grubego (CRC, *colorectal cancer*) - pierwotny nowotwór złośliwy jelita grubego wywodzący się z nabłonka błony śluzowej jelita grubego, pod względem zapadalności na świecie stanowi drugi co do częstości nowotwór złośliwy u kobiet i trzeci u mężczyzn. Mimo ogromnego postępu w minionych kilku dekadach metod analitycznych stosowanych w medycynie laboratoryjnej związanych z szeroko pojętymi badaniami omicznymi, a także wdrożonych badań przesiewowych takich jak kolonoskopia - wspomagana w diagnostyce dodatkowo badaniami obrazowymi przyżyciowymi (TK, MRI, PET, endoskopia kapsułowa, endoskopowa USG), wciąż nie zrealizowanym wyzwaniem pozostaje opracowanie metod, które w sposób dostateczny dla potrzeb klinicznych pozwalałyby wykryć ten nowotwór na wczesnym etapie rozwoju i diagnozować stopień zaawansowania choroby. Problem jest szczególnie istotny gdyż nowotwór może przez długi czas przebiegać bezobjawowo, a pojawiające się objawy choroby są niespecyficzne.

Przedstawiona do oceny praca doktorska jest próbą poszukiwania biomarkerów odpowiedzialnych za transformację nowotworową w kierunku CRC w oparciu o analizę pęcherzyków pozakomórkowych (EVs, *extracellular vesicles*). Celem pracy było poznanie znaczenia egzocytozy w CRC poprzez analizę występowania i charakterystyki fizykochemicznej EVs w tkance nowotworowej oraz ustalenie związku EVs z cechami histopatologicznymi tego nowotworu. O oryginalności podjętych wysiłków naukowych bardzo istotnie zaważył fakt wykonania badań na EVs wyizolowanych z tkanki litej, co umożliwiło ocenę egzocytozy zarówno w komórkach nowotworowych jak i w mikrośrodowisku guza. Dotychczas przeprowadzane tego typu badania zawężyły się do ustalenia znaczenia EVs w patogenezie CRC w modelach *in vitro* wybranych linii komórkowych oraz analizy EVs w surowicy lub osoczu krwi bądź innych płynach ustrojowych.

Praca doktorska Pana Łukasza Zadka jest oparta na cyklu trzech artykułów naukowych, w tym jednej pracy poglądowej (1) i dwóch artykułów oryginalnych (2,3), opublikowanych w międzynarodowych czasopismach naukowych z listy JCR (*Journal Citation Reports*) o łącznej wartości wskaźnika oddziaływania IF (*Impact Factor*) = 14,314, a sumaryczna punktacja MEiN wynosi 340:

1. *Cell Oncol (Dordr)*. 2020;43(4):539-575; IF = 6,730.
2. *Pol Arch Intern Med*. 2020;130(7-8):640-648; IF = 3,277.
3. *Am J Pathol*. 2021;191(12):2147-2171; IF = 4,307.

W rozprawie doktorskiej Doktorant zawarł również, oprócz wymienionych powyżej publikacji naukowych, podrozdział „Podsumowanie i wnioski” w którym bardzo zwięźle, z dobrą znajomością tematyki badawczej opisał główne założenia swoich dociekań naukowych, jasno zdefiniował cele badawcze, przedstawił metodologię prowadzonych badań, opisał syntetycznie uzyskane rezultaty badań oraz sformułował – adekwatnie do uzyskanych wyników – wnioski ze stosownymi implikacjami do praktyki klinicznej. Ta część jest napisana poprawną polszczyzną. Doktorant nie uniknął drobnych błędów literowych i interpunkcyjnych, niemniej nie mają one negatywnego wpływu na wartość merytoryczną wyników. Dodatkowymi podrozdziałami rozprawy są streszczenia napisane po polsku i po angielsku.

W publikacji poglądowej (1) przedstawiono stan wiedzy związany z transformacją nowotworową raków litych ze szczególnym uwzględnieniem znaczenia przewlekłego stanu zapalnego w onkogenezie i progresji nowotworów, w tym również w CRC. Z emfazą potraktowano w artykule zagadnienia roli i własności fizyko-chemicznych EVs w procesie nowotworzenia oraz analizy potencjalnych możliwości wykorzystania EVs w diagnostyce molekularnej i terapii wybranych nowotworów.

W pracy eksperymentalnej opublikowanej w *Pol Arch Intern Med*. (2) wykazano zwiększoną liczbę EVs, a także nadekspresję biomarkerów egzosomalnych - tetraspanin CD9 i CD36, w tkankach guza CRC resekowanych w trakcie zabiegów chirurgicznych w stosunku do kontroli (fragmentów tkanki pobranych z marginesów resekowanych guzów, uznanych histopatologicznie za nienowotworowe). Liczba EVs i stopień ekspresji obu tetraspanin pozostawał w istotnym związku z nasileniem proliferacji komórkowej mierzonej ekspresją antygenu Ki-67, a także z obecnością przerzutów do węzłów chłonnych. Obserwacje te dokonano wykorzystując metody immunohistochemii, Western blot, transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM, *transmission electron microscopy*) oraz techniki śledzenia nanocząsteczek (NTA, *nonoparticle tracking analysis*).

W drugiej pracy eksperymentalnej zawartej w rozprawie doktorskiej, opublikowanej w *Am J Pathol*. (3), udowodniono występowanie heterogeniczności EVs w odniesieniu do metody izolacji pęcherzyków, postawionej diagnozy i wybranych danych histopatologicznych takich jako stopień złośliwości i aktywność proliferacyjna komórek nowotworowych w guzach CRC. Heterogeniczność EVs była także wykazana w odrębnych badaniach na komercyjnie dostępnych liniach komórek nowotworowych CRC (HT-29, CaCo2, LoVo) w porównaniu do linii kontrolnych (HMEC-1, CCD-18Co). Obserwowane w tych badaniach odmienności EVs we własnościach optycznych analizowanych za pomocą cyfrowej holotomografii cyfrowej (DHT,

digital holographic tomography) czy też mikroanalizy pierwiastkowej z użyciem rentgenowskiej spektroskopii energodispersyjnej (EDS, *energy-dispersive X-ray spectroscopy*) dostarczyły dowodów eksperymentalnych, że są następstwem zmian molekularnych zachodzących w składzie i strukturze EVs.

Doktorant jest pierwszym autorem trzech wymienionych powyżej publikacji, co uwidacznia Jego wiodący wkład w prowadzone badania, potwierdzony także oświadczeniami współautorów. W mojej ocenie uzyskane wyniki stanowią istotny wkład w rozwój dziedziny, którą zajmuje się Doktorant, a dyskusję nad nimi przedstawioną w trzech opublikowanych artykułach oceniam bardzo wysoko pod względem merytorycznym. Pokreślenia wymaga wysoka wartość i aktualność podjętej problematyki badawczej – potencjalnego wykorzystania EVs do opracowania efektywnych testów laboratoryjnych dla wczesnego rozpoznania i oceny stadium zaawansowania choroby w CRC. Z uznaniem również należy odnieść się do zastosowanych przez Doktoranta bardzo nowoczesnych technik pomiarowych, adekwatnie dobranych w stosunku do poszukiwania odpowiedzi na stawiane tezy badawcze.

Rozważania nad uzyskanymi wynikami prowokują do zadania pytań, które mają odniesienie zarówno do wykorzystania w praktyce diagnostyczno-klinicznej już uzyskanych wyników jak i tych, które mogłyby być stawiane dla kontynuowania badań przedstawionych w rozprawie doktorskiej:

- na jakie elementy należy zwrócić szczególną uwagę w protokołach izolacji EVs, które mogą prowokować artefakt - „sztuczną” heterogeniczność EVs, która nie ma istotnego związku z potencjalną rolą EVs w patogenezie CRC?;

- jakie techniki badawcze do pogłębionej analizy molekularnej składu EVs chciałby Doktorant zastosować w dalszych badaniach nad rolą EVs w CRC?

Podsumowując, przedstawiona rozprawa doktorska Pana Łukasza Zadka pod tytułem „Znaczenie egzocytozy w patogenezie raka jelita grubego” ma oryginalny i nowatorski charakter, a zawarte w niej wyniki badań posiadają silne implikacje do aspektów klinicznych w onkologii. Doktorant trafnie wybrał metody badawcze do swoich eksperymentów zarówno pod względem modeli doświadczalnych jak metod analityczno-badawczych, a otrzymane z Jego wiodącym udziałem wyniki składające się na rozprawę doktorską zostały opublikowane w międzynarodowych recenzowanych czasopismach naukowych. Po całkowitej ocenie przedstawionej pracy z całą pewnością stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 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.).

Wnoszę więc do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie lekarza Łukasza Zadka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Podkreślając wysoki poziom merytoryczny pracy, dobry dorobek naukowy i duży wpływ wyników na rozwój dyscypliny wnioskuję także o wyróżnienie pracy.



Prof. dr hab. n. med. Leszek Kalinowski