dr hab. med. Wojciech Fendler Prof. UM
Zakład Biostatystyki i Medycyny Translacyjnej
I Katedra Pediatrii UM w Łodzi
Ul. Mazowiecka 15, 92-215 Łódź

Ocena

Rozprawy doktorskiej mgr Liliany Czernek p.t.

„Investigations on the Role of Cancer-Derived Exosomes in Intercellular Communication"

Błyskawiczny postęp technik biologii molekularnej znacząco zwiększył dostępne biologom i lekarzom możliwości wglądu w strukturę i funkcję organizmów żywych na poziomie komórkowym lub subkomórkowym. Bardzo dynamicznie rozwijającym się obszarem badań jest komunikacja między komórkami. Jednym z mechanizmów umożliwiających taki przepływ informacji są eksosomy – pęcherzyki wydzielane przez komórki zdrowe oraz nowotworowe. Eksosomy mogą być wchłaniane przez komórki docelowe co prowadzi do przeniesienia ich ładunku i wpływa na funkcję i przeżywalność komórek akceptorowych. Mechanizm ten jest prawdopodobnie wykorzystywany przez komórki nowotworowe do wpływania na funkcję układu immunologicznego. Transport eksosomalny stanowi również potencjalną drogę precyzyjnego dostarczania leków adresowanych do komórek posiadających receptor dla eksosomów przenoszących lek. Zagadnienia te stanowią oś pracy doktorskiej mgr Liliany Czernek.

Szczegółowe cele pracy zdefiniowano w sposób poprawny, typowy dla tego typu projektów. Ze względu na złożoność i kompleksowość projektu, nie dziwi ich znacznie większa niż typowo liczba. Wymienione cele składają sięw sposób logiczny i uporządkowany w spójną całość. Należy podkreślić, że są to cele bardzo wartościowe, o istotnym elemencie poznawczym a wieloetapowość i kompleksowość działań badawczych podjętych aby zrealizować każdy z nich zasługuje na uznanie.

Oceniana praca ma układ typowy dla prac eksperymentalnych o strukturze IRDaM. Po obszernym wstępie, przedstawiona jest sekcja wyników i ich omówienie, po czym pracę zamyka opis wykorzystanych w projekcie metod molekularnych. Ciekawym elementem jest przedstawienie głównych osiągnięć Doktorantki przed wstępem pracy – pozwala to w prosty sposób zapoznać się z jej karierą naukową i ocenić jakość już opublikowanych oraz przedstawionych podczas konferencji prac naukowych.

Główny tekst pracy doktorskiej liczy 140 stron maszynopisu. Głównym wątkiem wstępu jest omówienie charakterystyki, pochodzenia i roli eksosomów w komunikacji międzykomórkowej. Rozdział ten jest bardzo obszerny, co wynika bezpośrednio z tego jak

dużym zainteresowaniem środowiska naukowego charakteryzują się eksosomy komórek nowotworowych. W tym kontekście nie dziwi staranie Autorki aby przybliżyć czytelnikom ten złożony i wielopłaszczyznowy problem. Syntetyczne zebranie i podsumowanie kilkunastu lat badań w obszarze eksosomów, ich zawartości i możliwości transferu informacji między komórkami, świadczy o dojrzałości Autorki jako pracownika naukowego i jej dogłębnej znajomości tematu.

Wyniki badań, przedstawione na siedemdziesięciu dwóch stronach maszynopisu w bardzo przejrzysty sposób pokazują nakład pracy Doktorantki. Łącznie sekcja wyników i dyskusji, ilustrowane za pomocą kilkudziesięciu klarownych tabel i rycin w czytelny i logiczny sposób ilustrują plan i wykonanie badań zmierzających do realizacji zamierzonych celów pracy. Pierwsza sekcja wyników opisuje charakterystykę wielkości, liczby, dystrybucji i pochodzenia eksosomów. Autorka realizuje te działania z wykorzystaniem zróżnicowanych technik badawczych: cytometrii, mikroskopii sił atomowych, techniki śledzenia nanocząstek i wielu innych, co wskazuje na staranne i wielokierunkowe podejście eksploratywne. Kolejne sekcje wyników koncentrują się na zbadaniu zawartości eksosomów oraz możliwych implikacjach transferu mikroRNA, białek i RNA między komórkami. Te mechanizmy komunikacji międzykomórkowej, obejmujące wymianę informacji pomiędzy komórkami nowotworowymi a układem odpornościowym mogą stanowić potencjalny punkt uchwytu dla leków oraz wyjaśniać mechanizmy indukowanej przez nowotwór immunotolerancji. Rozdział zamyka charakterystyka eksosomów jako potencjalnych nośników leków. Każdy podrozdział jest omówiony zwięźle w kontekście bieżącego piśmiennictwa, co pozwala ocenić jakość i znaczenie wyników uzyskanych przez Doktorantkę w kontekście aktualnego stanu wiedzy.

Metody zastosowane w pracy opisano ze szczegółami technicznymi na 22 stronach rozprawy. Wykorzystane techniki molekularne w znacznej mierze obejmują optymalizację przebiegu reakcji izolacji, pomiaru cech fizycznych i biologicznych eksosomów oraz badania ich zdolności do transferu informacji/mediatorów między komórkami. Zauważalny jest ogrom pracy włożony w optymalizację warunków reakcji służących realizacji celu pracy oraz dbałość o szczegóły. Podsumowując, rozdział ten obrazuje całość skrupulatnie zaplanowanych i przeprowadzonych eksperymentów pozwalając, w moim odczuciu, na ich powtórzenie i weryfikację przez innych naukowców, co spełnia kryteria eksperymentalnej pracy naukowej.

Piśmiennictwo obejmuje aż 518 pozycji, w olbrzymiej większości opublikowane w ostatnich latach w czasopismach z Impact Factor, co świadczy o aktualności poruszanego tematu i olbrzymim zainteresowaniu tym obszarem badań biomedycznych.

Pracę zamyka zwięzła sekcja „conclusions", w syntetyczny i logiczny sposób formułująca wynikające z wyników pracy wnioski dobrze podsumowujące znaczenie i implikacje przedstawionych w pracy odkryć.

Ogółem pod względem merytorycznej zawartości, poprawności zaplanowania badań, ich przeprowadzenia, jak również pod względem ogólnej formy i organizacji treści pracy, rozprawę mgr Liliany Czernek oceniam bardzo wysoko.

Chociaż w całości rozprawa nie budzi wątpliwości w zakresie oryginalności tematyki badawczej, zastosowanej metodyki badań, czy interpretacji wyników tych badań, po jej lekturze nasunęło mi się kilka pytań, na które odpowiedzi nie byłem w stanie wydedukować w oparciu o tekst pracy. Część z nich wynika z mojej własnej badawczej ciekawości i, jakkolwiek zapewne przekracza zakres wykonanych lub planowanych prac, być może stanie się przyczynkiem do ciekawej dyskusji lub kolejnych projektów:

- Ryciny 26 i 27 przedstawiają wychwyt eksosomów przez różne typy komórek. Zaskakujący jest brak porównania statystycznego uzyskanych wyników oraz dyskusji, choćby spekulatywnej, w jaki sposób komórki dendrytyczne są w stanie efektywniej wychwytywać eksosomy?
- Wyniki analizy ekspresji miRNA przedstawione w tabeli 4 wymagają szerszego kontekstu. Dlaczego autorka koncentruje się jedynie na miRNA o zwiększonej ekspresji w eksosomach? Obniżenie ekspresji w eksosomach, może świadczyć o zwiększeniu retencji miRNA w komórkach produkujących eksosomy lub faktycznym zmniejszeniu ich ekspresji. Znane są przypadki kiedy wewnątrzkomórkowe zwiększenie ekspresji miRNA przekłada się na spadek ich liczby kopii w medium hodowlanym, surowicy pacjentów i eksosomach – być może z takim fenomenem mamy tu do czynienia? Graficzne przestawienie tego typu wyników za pomocą mapy termicznej lub wykresu typu „Volcano plot" znacznie zwiększyłoby przejrzystość ich prezentacji i ułatwiło interpretację.
- Rycina 41 przedstawia ocenę przeżywalności komórek po poddaniu wzrastającym stężeniom badanych związków chemicznych. Z bliżej niewyjaśnionego powodu, wskazano na 120 i 130-procentową przeżywalność komórek w początkowym punkcie obserwacji. Podobne wyniki przedstawia rycina 46 (viability >105% przy stężeniu 0.001 mM). Czy Autorka ma jakieś wytłumaczenie dla aktywnego wzrostu komórek przy niskich stężeniach badanych substancji, czy to oczywista omyłka pisarska?
- Opis metod w zakresie analizy statystycznej jest zdecydowanie zbyt skąpy – badania ekspresji genów i miRNA, oznaczenie przeżywalności komórek i wyznaczenie LC/IC50,

porównania między liniami komórkowymi – wszystko to wymaga testów statystycznych by uwiarygodnić czy obserwowane różnice nie są dziełem przypadku czy też wielkość ich przekracza różnice wynikające z losowej zmienności. Niewątpliwie Doktorantka przeprowadziła stosowną analizę jednak zarówno opis wyników oraz metod zastosowanych w analizy danych znacząco poprawiłby jakość recenzowanej pracy oraz możliwości oceny poprawności wysnutych na podstawie wyników wniosków.

Nieistotne merytorycznie uwagi edytorskie dotyczą przygotowania pracy w języku angielskim, który nie jest językiem ojczystym ani dla Autorki ani Recenzenta. Ten fakt leży u podstaw dość licznych błędów stylistycznych i literowych, jednak niewątpliwie zostaną one usunięte podczas korekty edytorskiej wersji przygotowywanej do publikacji.

Przytoczone powyżej drobne uwagi, natury bardziej redakcyjnej niż merytorycznej, nie umniejszają w żadnym stopniu wartości merytorycznej rozprawy i mojej bardzo pozytywnej opinii o tej wyróżniającej się pracy Pani mgr Liliany Czernek.

W podsumowaniu stwierdzam, że ta bardzo wartościowa rozprawa jest świadectwem, iż Doktorantka wykazała umiejętność samodzielnego rozwiązywania problemów naukowych i badawczych, wykazując potrzebną do tego wiedzę, jak i przygotowanie teoretyczne w zakresie zagadnień, których rozprawa dotyczy. Praca ta zawiera bez wątpienia elementy nowości naukowej, a przedstawione wyniki wskazują, że cele badawcze stawiane przez Doktorantkę zostały zrealizowane z nadwyżką.

Uwzględniając warsztat badawczy, wartości poznawcze i ogromne znaczenie praktyczne dociekań naukowych z dużą przyjemnością przedkładam Wysokiej Radzie Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych wniosek o dopuszczenie mgr Liliany Czernek do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz publicznej obrony pracy doktorskiej oraz wyróżnienie pracy.

Łódź, dnia 2 Stycznia 2019 roku

Kierownik Zakładu Biostatystyki
i Medycyny Translacyjnej
Dr. hab. n. med. Wojciech Fendler Prof.UM
2326708
tel.691-705-646