

Warszawa, 13 marca 2017 r.

Prof. dr hab. Anna Lankoff
Centrum Radiobiologii i Dozymetrii Biologicznej
Instytut Chemii i Techniki Jądrowej
w Warszawie

Zakład Radiobiologii i Immunologii
Instytut Biologii
Uniwersytet Jana Kochanowskiego
w Kielcach

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Małgorzaty Roś-Mazureczk

pt.: Analiza lipidomu surowicy i wykorzystanie spektrometrii mas w diagnostyce chorób nowotworowych.

Praca została wykonana w Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów Centrum Onkologii – Instytutu w Gliwicach. Promotorami pracy są: prof. dr hab. Piotr Widłak oraz dr hab. Monika Pietrowska.

Nowotwory złośliwe stanowią narastający problem zdrowotny i ekonomiczny na całym świecie, przyczyniając się do przedwczesnej umieralności. Należy spodziewać się, że wraz z wydłużającą się długością życia człowieka, rozwojem cywilizacji i związanym z tym większym narażeniem na nowe czynniki rakotwórcze, będzie wzrastać ryzyko zachorowania na nowotwory. Świadczą o tym obserwowane od wielu lat trendy. Chociaż zauważa się pewien postęp dotyczący wyleczalności nowotworów, to jednak w ostatnim trzydziestoleciu liczba nowych przypadków nowotworów złośliwych, jak również zgonów, wzrosła istotnie. Biorąc powyższe pod uwagę, oczywistym jest, że diagnostyka i terapia nowotworów jest obecnie jednym z największych wyzwań dla współczesnej medycyny i pokrewnych nauk biologicznych. I właśnie tym zagadnieniom poświęcona jest przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska.

Rozprawa Pani mgr Małgorzaty Roś-Mazureczk zawiera rozdziały typowe dla prac doktorskich. Pracę rozpoczyna przedstawienie *Celu pracy*, który został sprecyzowany jasno i konkretnie. Następnym rozdziałem jest kompetentnie napisany *Wstęp*, który wprowadza Czytelnika w zagadnienia z zakresu metabolomiki, ze szczególnym uwzględnieniem metabolizmu komórki nowotworowej, narzędzi analitycznych opartych o spektrometrię mas i wykorzystywanych w badaniach metabolicznych, zagadnienia związane z radioterapią raków głowy i szyi oraz raka prostaty jak również zagadnienia dotyczące odpowiedzi komórek i tkanek na promieniowanie jonizujące. *Materiały i metody*, obejmujące techniki używane w badaniach metabolomicznych: spektrometrię mas w połączeniu z chromatografią gazową GC/MS oraz spektrometrię mas MALDI w połączeniu z analizatorem czasu przelotu (ToF), jak również metody biochemiczne, przedstawione są w rozprawie

należycie szczegółowo. Użyty warsztat metodyczny był, w moim przekonaniu, optymalny dla realizacji celu pracy, nowoczesny i odpowiadający współczesnym światowym standardom badań w tej dziedzinie. *Opis wyników* jest dosyć jasny, chociaż ich prezentacja i treści dotyczące wyników skomplikowanej analizy statystycznej nie są dla mnie w pełni zrozumiałe. Dlatego odniosę się do tego zagadnienia w dalszej części recenzji. Literatura przedmiotu jest bardzo dobrze dobrana. Autorka wybrała 212 pozycji, nie ograniczając się do prac najnowszych. Język pracy jest poprawny, a zakres przeprowadzonych badań oraz dyskusja i wnioski przedstawione są klarownie.

Przedmiotem rozprawy są zagadnienia dotyczące możliwości wykorzystania narzędzi spektrometrii mas dla wykrycia w surowicy krwi metabolitów o potencjalnym zastosowaniu w diagnostyce chorób nowotworowych. Autorka postawiła sobie dwa zasadnicze cele: (1) identyfikację cech metabolomu surowicy o możliwym zastosowaniu we wczesnej detekcji raka płuc oraz (2) scharakteryzowanie zmian metabolomu surowicy krwi, towarzyszących odpowiedzi na radioterapię u pacjentów z rakiem prostaty lub rakami regionu głowy i szyi. Celom głównym towarzyszyły cele szczegółowe, które obejmowały:

- scharakteryzowanie profili masowych lipidowej frakcji surowicy krwi za pomocą spektrometrii MALDI-ToF, w celu identyfikacji sygnatury molekularnej pozwalającej na odróżnienie osób zdrowych z grupy wysokiego ryzyka od pacjentów z rakiem płuca we wczesnym stadium choroby,
- scharakteryzowanie profili metabolicznych surowicy krwi za pomocą chromatografii gazowej i spektrometrii mas (GC-MS), w celu identyfikacji sygnatury molekularnej pozwalającej na odróżnienie osób zdrowych z grupy wysokiego ryzyka od pacjentów z rakiem płuca we wczesnym stadium choroby,
- scharakteryzowanie profili masowych lipidowej frakcji surowicy krwi za pomocą spektrometrii MALDI-ToF, w celu identyfikacji sygnatury molekularnej związanej z wczesną odpowiedzią na promieniowanie u pacjentów z rakiem prostaty lub rakami regionu głowy i szyi,
- scharakteryzowanie profili metabolicznych surowicy krwi za pomocą chromatografii gazowej i spektrometrii mas (GC-MS), w celu identyfikacji sygnatury molekularnej związanej z wczesną odpowiedzią na promieniowanie u pacjentów z rakiem prostaty lub rakami regionu głowy i szyi.

Materiał do badań stanowiła surowica krwi pochodząca od osób z rozpoznaniem nowotworu oraz bez takiego rozpoznania (w sumie 595 próbek do analizy MALDI-ToF, w tym 143 próbki do analizy GC/MS). Biorąc pod uwagę swoje wieloletnie doświadczenie w uzyskiwaniu materiału doświadczalnego od pacjentów i zdrowych dawców, taka liczba próbek świadczy o dużym zaangażowaniu i determinacji Doktorantki. Aby zrealizować założone cele, Doktorantka wykonała badanie lipidomu w surowicy 100 pacjentów z rakiem płuc oraz 300 zdrowych dawców. Przeprowadzona analiza profili masowych lipidowej frakcji surowicy za pomocą MALDI-ToF wykazała 309 składowych lipidowych, których poziom różnił się w sposób statystycznie istotny między grupą pacjentów z rakiem płuc, a grupą kontrolną. Jednakże zastosowanie bardziej konserwatywnej metody korekty błędów pozwoliło na ograniczenie tej grupy do 31 składowych

lipidowych. Wśród tych składowych różnicujących, poziom większości z nich o masach od ok. 500 do 525 Da (odpowiadających klasie lizofosfatydylocholin) był obniżony w próbkach pochodzących od pacjentów z rakiem płuc, w stosunku do grupy kontrolnej. Natomiast poziom składowych o masach powyżej ok. 685 Da (odpowiadających klasie fosfatydylocholin, innym diacylofosfolipidom oraz sfingomielinom) był wyższy w grupie pacjentów z rakiem płuc. Następnie, dane uzyskane przez Autorkę zostały wykorzystane do budowy wieloskładnikowego klasyfikatora raka płuc. Klasyfikator został opracowany w oparciu o skomplikowaną analizę statystyczną i zawierał finalnie 15 składowych. Optymalizacja klasyfikatora pozwoliła na zmaksymalizowanie wartości predykcyjnej ujemnej, przy zachowaniu wartości predykcyjnej dodatniej większej od 25%. Klasyfikator został poddany wewnętrznej walidacji za pomocą walidacji krzyżowej Monte Carlo. Po jej przeprowadzeniu uzyskany klasyfikator charakteryzował się 95% czułością, 18% specyficznością, 28% wartością predykcyjną dodatnią, 92% wartością predykcyjną ujemną oraz wartością pola pod krzywą ROC równą 0.71.

Kolejnym aspektem pracy była analiza profili metabolicznych w surowicy krwi 31 pacjentów z rakiem płuc i 92 zdrowych dawców za pomocą metody GC/MS. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę wykazały 195 różnych metabolitów, wśród których 103 były obecne w co najmniej 60% próbek w każdej grupie. Wyniki dotyczące poziomu tych wybranych metabolitów poddano następnie analizie statystycznej. Analiza różnicująca pozwoliła na wyłonienie 17 metabolitów, których poziom był istotnie różny w grupie pacjentów z rakiem płuc i w grupie kontrolnej. Wśród nich, poziom 16 metabolitów był obniżony w grupie pacjentów z rakiem płuc, w porównaniu do grupy kontrolnej. Doktorantka następnie podjęła próbę określenia funkcji metabolitów, których zmiany poziomu pozwoliły na rozróżnienie grupy chorych od zdrowych dawców. W tym celu zidentyfikowane metabolity zostały przypisane do ścieżek metabolicznych. Uzyskane wyniki wykazały, że metabolity o obniżonym poziomie w surowicy zdrowych dawców, w porównaniu do pacjentów, zaangażowane były w metabolizm białek. Następnie, uzyskane wyniki zostały wykorzystane do opracowania wieloskładnikowego klasyfikatora raka płuc, który finalnie obejmował 9 metabolitów. Klasyfikator ten pozwolił na rozdzielenie obu grup otrzymując następujące cechy separatora: czułość 100%, specyficzność 95%, wartość predykcyjna dodatnia 86%, i wartość predykcyjna ujemna 100%.

Bardzo ciekawym aspektem pracy była próba scharakteryzowania zmian lipidomu i metabolomu surowicy krwi, towarzyszących odpowiedzi na promieniowanie jonizujące w trakcie radioterapii. W pierwszym etapie badań Doktorantka scharakteryzowała zmiany lipidomu w surowicy krwi 129 pacjentów z rakiem prostaty oraz 66 pacjentów z rakami głowy i szyi za pomocą metody MALDI-ToF. Analiza uzyskanych wyników pozwoliła na wyodrębnienie 240 składowych w zakresie mas: 350-900 Da. Następnie, Doktorantka skonstruowała widma różnicowe dla poszczególnych pacjentów i poddała je analizie. Uzyskane wyniki wykazały, że poziom kilku składowych spektralnych zmienił się istotnie pomiędzy punktami czasowymi. Największą liczbę lipidowych składowych różnicowych odnotowano w surowicy pacjentów z rakami głowy i szyi. W przypadku pacjentów z rakiem prostaty liczba składowych różnicowych była większa w grupie pacjentów, u

których plan napromieniania obejmował oprócz obszaru guza również obszar węzłów chłonnych miednicy. Na uwagę zasługuje fakt, że większość zmian indukowanych przez promieniowanie była odwracalna lub kompensowana przez zmiany zachodzące miesiąc od zakończenia terapii.

Powyższe wyniki zostały uzupełnione przez analizę zmian profili metabolicznych surowicy krwi 20 pacjentów z rakami głowy i szyi za pomocą metody GC/MS. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę pozwoliły na wyodrębnienie 166 metabolitów, wśród których znajdowały się 102 związki, które były obecne w co najmniej 60% próbek pobieranych zarówno przed, jak i po zakończeniu radioterapii. Następnie, Doktorantka oznaczyła różnicę poziomów każdego z tych metabolitów dla poszczególnych pacjentów. Uzyskane wyniki pozwoliły na wyodrębnienie 18 związków, których poziom różnił się istotnie przed i po zakończeniu radioterapii. Poziom 12 z nich wzrastał, a 6 spadał po zakończeniu radioterapii. Największą różnicę zaobserwowano w przypadku kwasu 3-hydroksymasłowego, którego poziom wzrósł około trzykrotnie. Następnie, Doktorantka określiła ścieżki metaboliczne związane z tymi metabolitami w celu określenia ich funkcji. Uzyskane wyniki wykazały, że metabolity, których poziom wzrastał po zakończeniu radioterapii związane były z metabolizmem metioniny i galaktozy. Metabolity, których poziom ulegał obniżeniu po zakończeniu radioterapii, zaangażowane były w metabolizm glicyny, seryny, treoniny, alaniny oraz tauryny.

Reasumując, wyniki uzyskane przez Doktorantkę pozwoliły na określenie sygnatur molekularnych, różnicujących pacjentów z rakiem płuca od zdrowych dawców. Wykazały również, że profil molekularny frakcji lipidowej może odzwierciedlać ryzyko wystąpienia reakcji popromiennej u pacjentów poddawanych radioterapii. Dyskusyjną kwestią pozostaje ocena potencjalnego znaczenia klinicznego otrzymanych sygnatur. Z pewnością przedstawione w pracy wyniki powinny zostać poddane dalszym badaniom. Bez wątplenia natomiast pozostaje fakt, że uzyskane wyniki stanowią niezwykle istotny wkład do osiągnięć naukowych w Polsce i na świecie.

Tym niemniej, Autorka nie ustrzegła się pewnych nieścisłości w rozprawie. Między innymi zabrakło mi w pracy wyjaśnienia zasady tworzenia efektywnego klasyfikatora nowotworowego do oceny podatności na raka płuc oraz klasyfikatora do oceny ryzyka wystąpienia reakcji popromiennej u pacjentów poddawanych radioterapii. W opisie wyników na stronie 73 pojawia się jedynie stwierdzenie: „Dane uzyskane w opisanych wyżej doświadczeniach zostały wykorzystane do budowy wieloskładnikowego klasyfikatora raka płuc.” Doktorantka wspomina, że klasyfikator złożony był z 15 składowych i podaje wyłącznie ich składowe spektralne. Bardziej szczegółowe przedstawienie tych składowych w tabeli ułatwiłoby zrozumienie treści przez czytelnika, który nie korzysta w codziennej pracy z tak zaawansowanych narzędzi statystycznych. Jednocześnie, Doktorantka zamieściła w pracy tabelę 3.2-1 na stronie 72, która zawiera charakterystykę składowych lipidowych różnicujących grupę chorych na raka płuc i grupę zdrowych dawców. W tabeli umieszczone są tylko wyniki średnie. Brakuje wartości SD lub SE, które są podstawową miarą zmienności obserwowanych wyników. Składowe spektralne w powyższej tabeli są różne od składowych spektralnych z klasyfikatora. Podobna uwaga dotyczy konstrukcji klasyfikatora nowotworowego na podstawie profili

metabolicznych surowicy krwi chorych na raka płuc. W opisie wyników na stronie 74 pojawia się stwierdzenie: „Wybrane metabolity zostały poddane dalszym analizom statystycznym, a na ich podstawie skonstruowano klasyfikator nowotworowy”. Wybrane, czyli które ? Zestawienie ww. metabolitów w tabeli ułatwiłoby zrozumienie treści przez czytelnika. W dalszej części pracy Doktorantka zamieściła tabelę 3.2-2, zawierającą 28 metabolitów, których poziom różnicuje próbki chorych na raka płuc od próbek zdrowych dawców. Nie rozumiem, na jakiej podstawie właśnie te konkretne metabolity (ze 103 wykrytych i oznaczonych ilościowo) znalazły się w tabeli, tym bardziej, że w dalszym fragmencie pracy Doktorantka stwierdza, że poziom jedynie 17 metabolitów wykazuje istotne różnice między grupą chorych na raka płuc i grupą zdrowych dawców. Ponadto, Doktorantka stwierdza, że na podstawie dalszej korekcji błędu, poziom tylko trzech metabolitów wykazuje istotne różnice między grupą chorych na raka płuc i zdrowych dawców. Muszę przyznać, że pogubiłam się w tym opisie wyników i nie jestem już pewna, ile metabolitów i które z nich mają znaczenie dla rozróżnienia grupy chorych na raka płuc i zdrowych dawców ? Wynika z tego fakt, że również nie bardzo rozumiem, które metabolity zostały przypisane do ścieżek metabolicznych. Z tekstu na stronie 75 wynika, że: „W celu określenia ich funkcji oraz potencjalnego znaczenia różnic pomiędzy grupami, zidentyfikowane metabolity różnicujące (p-wartość < 0.05) zostały przypisane do ścieżek metabolicznych...” Czy odnosi się to do 28, 17 czy może 3 metabolitów ? Dopelnieniem wspomnianych niejasności jest informacja ze strony 76, wskazująca, że na podstawie powyżej przedstawionych wyników opracowano wieloskładnikowy klasyfikator raka płuc, obejmujący 9 metabolitów. Mam również kilka uwag edytorskich. Pierwsza, główna uwaga, dotyczy bardzo fragmentarycznej prezentacji wyników. Zdaję sobie sprawę z tego, że niemożliwym jest przedstawienie wszystkich uzyskanych wyników z powodu ich ogromnej liczby, ale nawet w czasopiśmie naukowych określających limit stron, zwyczajowo umieszcza się wybrane wyniki wraz z właściwą publikacją jako materiały uzupełniające. Ponadto, moje uwagi dotyczą opisów tabel, które powinny zawierać wyjaśnienia stosowanych skrótów, aby nie odsyłać bez przerwy czytelnika do spisu skrótów. To rozprasza i nie pozwala skupić się na analizie wyników. Z powodu dbałości o poprawność językową, bardziej właściwym określeniem niż: „...grupę chorych na raka płuca od zdrowej kontroli.” (tabela 3.2-1, strona 72) wydaje się określenie: „...grupę chorych na raka płuca od grupy zdrowych dawców”. Powyższe uwagi nie wpływają na moją pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej Pani mgr. Małgorzaty Roś-Mazurczyk. Oceniając całość recenzowanej rozprawy należy uznać, iż jest ona świadectwem ogromnej pracowitości Doktorantki i bardzo dobrej znajomości podjętego tematu. Zarówno zawartość merytoryczna rozprawy, jak i sposób analizy wyników oraz ich dyskusji świadczą o dojrzałości naukowej oraz o doskonałym warsztacie badawczym.

W mojej opinii rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim. Wnoszę zatem do Rady Naukowej Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie o dopuszczenie pani mgr Małgorzaty Roś-Mazurczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.