

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

Ocena

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Mrowiec p.t.

„Wykorzystanie profilu metabolitów surowicy w ocenie ryzyka zachorowania na raka piersi”

Błyskawiczny postęp technik biologii molekularnej znacząco zwiększył dostępne biologom i lekarzom możliwości wglądu w strukturę i funkcję organizmów żywych na poziomie komórkowym lub subkomórkowym. Możliwość kompleksowego badania ilości wszystkich białek, ekspresji wszystkich genów lub ilości wszystkich metabolitów – zbierana pod parasolem zwanym badaniami omicznymi – umożliwia nadzwyczaj dokładny i holistyczny wgląd w toczące się procesy, ich interakcje i współzależności. Wśród badań omicznych badanie metabolomu jest tym, które pozwala na ocenę finalnych skutków procesów regulujących ekspresję genów, białek i aktywności procesów biologicznych. Badania te często dostarczają fundamentalnych informacji na temat możliwych do oznaczania prostych biomarkerów i dynamicznie zmieniających się wskaźników aktywności choroby. Zagadnienia dotyczące badania metabolomu w onkologii, ze szczególnym naciskiem położonym na raka piersi, stanowią oś pracy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Mrowiec.

Oceniana praca ma układ IMRaD, typowy dla prac badawczych w naukach medycznych. 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 86 stron maszynopisu. Głównym wątkiem wstępu jest omówienie technik omicznych, zapoznanie czytelnika z ich metodyką, wskazanie na dotychczasowe kluczowe odkrycia w tym obszarze i możliwe perspektywy rozwoju. Rozdział



ten zwięźle i przejrzysto podsumowuje bardzo złożone i zaawansowane obszary badań. Widocznym jest jak dużym zainteresowaniem środowiska naukowego charakteryzują się obecnie badania omiczne, a to w jaki sposób autorka je opisuje świadczy o dobrej znajomości badanej tematyki i świadomości ich miejsca we współczesnej onkologii.

Metody zastosowane w pracy opisano ze szczegółami technicznymi na 13 stronach rozprawy. Rozdział obejmuje charakterystykę kliniczną grup pacjentek których próbki wykorzystano w badaniach. Pierwszą była kohorta HUNT2 zebrana w Norwegii a drugą grupa zrekrutowana w jednostce macierzystej doktorantki. Selekcja pacjentek odpowiadała celom badawczym postawionym w pracy. Dalszą część sekcji metod stanowią opisy optymalizacji procedur oznaczania metabolitów, ze szczególnym naciskiem położonym na zabezpieczenie wyników badań przed źródłami zakłóceń wynikających z technik pomiarowych, układu próbek, sekwencji oznaczania i innych czynników mogących maskować poszukiwane przez Doktorantkę zależności o biologicznym i klinicznym znaczeniu. Wykorzystane techniki molekularne były adekwatne do realizacji zamierzeń projektu i przeprowadzone zgodnie z zasadami sztuki. 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.

Zastosowane techniki statystyczne zostały opisane w sposób zrozumiały. Przyjęte podejście analityczne było poprawne, jakkolwiek sekwencja badań rozpoczęta od grupy HUNT2 (z pomiarami wyprzedzającymi rozpoznanie) z analizą *case-control* przeprowadzoną w kolejnym etapie wydaje się być trudniejszym wariantem niż kolejność, w którym najpierw analizowanoby próbki o największych potencjalnych różnicach (rak vs kontrola), a potem walidowano gradient zmian różnicujących metabolitów zależnie od wieku i czasu do rozpoznania.

Wyniki badań, przedstawione na 30 stronach maszynopisu w przejrzysty sposób pokazują nakład pracy Doktorantki. Sekcja wyników ilustrowana za pomocą kilkunastu klarownych rycin i tabel w czytelny i logiczny sposób ilustrują plan i wykonanie badań zmierzających do realizacji zamierzonych celów pracy. Pierwsza sekcja wyników opisuje sekwencję badań oraz problemy techniczne napotkane podczas ich wykonywania i metody



wykorzystane do poprawy jakości wyników. Są to informacje istotne potwierdzające znajomość technik badawczych przez doktorantkę, jakkolwiek niebędące w ostatecznym rozrachunku wartościowymi poznawczo odkryciami. Niemniej, jeśli dobrze zrozumiałem intencje Doktorantki, dzięki tym zabiegom możliwe było wykalibrowanie metod pomiarowych i przeprowadzenie kluczowych oznaczeń w maksymalnie jednolity technicznie sposób.

Kolejne sekcje wyników koncentrują się na opisie profili ilości metabolitów w kohorcie HUNT2 i identyfikacji związków ich zmienności z czynnikami klinicznymi takimi jak wiek pacjentek oraz czas do rozpoznania nowotworu. Zidentyfikowane różnice i efekty nie wykazywały różnic na tyle dużych by wyraźne były oczywiste metody wykorzystania poszczególnych metabolitów lub ich zbiorów do efektywnej separacji klas lub predykcji czasu do nowotworu. Jakkolwiek zidentyfikowano potencjalnie ciekawe związki stężeń cytruliny, glicyny, glutaminy i innych aminokwasów z wiekiem lub czasem do rozpoznania w sekcji tej brakowało mi prób nadania opisywanym wynikom kontekstu biologicznego oraz poszukiwania możliwości praktycznego zastosowania opisywanych zależności. Kolejna sekcja dotyczy badania porównawczego pacjentek z rozpoznanym rakiem piersi porównywanych z grupą kontrolną. W sekcji tej Autorka zagłębia się bardziej w biologię obserwowanych zależności i wskazuje na możliwe procesy powiązane z obserwowanymi zmianami profili metabolitów surowicy. Dość zaskakująco, w tej sekcji również brakuje trochę prób poszukiwania metod pozwalających na separację klas lub wskazanie na możliwe kierunki wykorzystania zidentyfikowanych różnic ilości metabolitów w klinicznie użyteczny sposób. Sekcję wyników zamyka porównanie profili metabolitów pomiędzy grupą kontrolną a 4 grupami pacjentek z różnymi nowotworami. O ile koncepcja ta jest naukowo ciekawa, brakowało mi w opisie jej dokładniejszej charakterystyki klinicznej grup oraz uzasadnienia wyboru tych konkretnych typów nowotworów oraz sposobu rekrutacji pacjentów. Stopnie zaawansowania, wiek i niewątpliwie czynniki ryzyka, różniły się istotnie pomiędzy grupami, a biorąc pod uwagę to jak ultraczułą metodą Doktorantka prowadziła badania, można sądzić, że niektóre z czynników klinicznych mogły w znacznym stopniu nakładać się na efekt badanego czynnika (typ nowotworu vs grupa kontrolna).

Sekcja dyskusji odnosi się do aktualnych pozycji literatury światowej, nadaje wynikom odpowiedni kontekst i tłumaczy przypuszczalne przyczyny obserwowanych zależności. Nie budzi ona istotnych zastrzeżeń. Piśmiennictwo obejmuje ponad 150 pozycji w układzie



alfabetycznym, w większości opublikowane w ostatnich 10 latach w opiniotwórczych, międzynarodowych czasopismach onkologicznych, co świadczy o aktualności poruszanego tematu i olbrzymim zainteresowaniu tym obszarem badań biomedycznych.

Pracę zamyka zwięzła sekcja Wniosków, 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 inż. Katarzyny Mrowiec oceniam 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 oraz jakkolwiek zapewne przekracza zakres wykonanych lub planowanych prac to być może stanie się przyczynkiem do ciekawej dyskusji lub kolejnych projektów:

1. Lektura publikacji w obszarze metabolomiki w raku piersi wskazuje, iż mgr inż. Mrowiec była autorem kilku wartościowych prac w obszarze badań metabolomicznych opublikowanych w latach 2020-2024. Mimo to żadna z nich nie była cytowana w niniejszej rozprawie. Czy w wynikach tamże opisanych znajdują się rozwinięcia koncepcji badanej w niniejszym doktoracie? Połączenie grup lub wsparcie opisanych wyników analizą większej liczby próbek byłoby korzystnym zabiegiem wzmacniającym poziom naukowy ocenianej rozprawy.
2. O ile brak różnic obserwowanych pomiędzy grupami kohorty HUNT2 można tłumaczyć niewielkim biologicznym efektem odległych onkologicznych punktów końcowych, o tyle zastanawiający jest brak podjęcia próby analizy statystycznej ukierunkowanej na stworzenie modeli diagnostycznych w oparciu o zgromadzoną lokalnie grupę kobiet. Co stało na przeszkodzie by określić potencjał separacji klas w zebranych materiale w obu etapach pracy?
3. Na ile wyniki uzyskane w oparciu o analizę metabolomiczną próbek surowicy korespondują z procesami metabolicznymi zachodzącymi na poziomie tkankowym, opisanych w literaturze lub zamieszczonych w ogólnodostępnych zbiorach danych metabolomicznych, proteomicznych lub transkryptomicznych?



4. Jakie względy statystyczne lub techniczne zadecydowały o ustaleniu liczebności grupy do analizy „*pan-cancer signature*”? Uwzględniając wcześniejsze obserwacje o związku wieku z profilem metabolitów zdecydowanie się na dobór grupy kontrolnej istotnie młodszej od wszystkich 4 grup onkologicznych było zabiegiem ryzykownym. Co więcej, zwiększenie liczebności grupy kontrolnej (choćby kosztem ograniczenia którejś z grup onkologicznych) pozwoliłoby na podjęcie próby tworzenia modeli klasyfikacyjnych o potencjalnym charakterze aplikacyjnym.
5. W jaki sposób dokonano wyboru 35 pacjentek do badania sygnatury *pan-cancer* spośród 95 pacjentek kontrolnych? Czy przeprowadzono to metodą losową, a jeśli tak, to w jaki sposób zapewniono reprezentatywność grup?
6. Poszukiwania sygnatury uniwersalnej dla 4 typów raków jest niewątpliwie ciekawą koncepcją badawczą. Charakterystyka kliniczna przedstawionych grup wskazuje na możliwość realizacji innej, klinicznie użytecznej analizy – poszukiwania biomarkerów, które byłyby typowe dla stadiów wczesnych i zaawansowanych. O ile w przypadku podgrupy pacjentów z HNC byłoby to niemożliwe, to w przypadku pozostałych trzech grup liczba pacjentów ze stadiami I lub II była wystarczająca. Sprawdzenie, które ze zidentyfikowanych metabolitów charakteryzują się gradientem stężeń kontrola -> stadium wczesne -> stadium zaawansowane pozwoliłoby, przynajmniej częściowo zwalidować obserwacje dotyczące dynamiki zmian stężeń metabolitów w zależności od czasu do rozwoju raka piersi u pacjentek z kohorty HUNT2. Czy podjęto próby takiej analizy?

Jak w każdej pracy o tej objętości Autorce zdarzyło się kilka literówek, błędów językowych (kancerogeneza zamiast karcynogenezy, ilość ciąż zamiast liczba, nie losową zamiast nielosową itp.) i niezręczności stylistycznych. Podobnie Autorka pomija niektóre istotne szczegóły kliniczne, np. wykorzystanie ultrasonografii do wsparcia procedur skriningowych w niektórych krajach. Jednakże błędy te niewątpliwie zostaną one usunięte podczas korekty edytorskiej wersji przygotowywanej do publikacji w języku Angielskim. Powyższe drobne uwagi nie umniejszają w żadnym stopniu wartości merytorycznej rozprawy i mojej bardzo pozytywnej opinii o wyróżniającej się pracy Pani mgr inż. Katarzyny Mrowiec.



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 i istotne wartości poznawcze z dużą przyjemnością przedkładałam Radzie Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego wniosek o dopuszczenie mgr inż. Katarzyny Mrowiec do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz publicznej obrony pracy doktorskiej.

Łódź, dnia 6 Czerwca 2024 roku

Kierownik
Zakładu Biostatystyki i Medycyny Translacyjnej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Prof. dr hab. n. med. Wojciech Fendler
nr PWZ 2326708
tel. 42 272 53 85 / 691 705 646

