

Poznań, 17 lipca 2024

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Mrowiec pt. „***Wykorzystanie profilu metabolitów surowicy w ocenie ryzyka zachorowania na raka piersi***”.

Przyczyną wysokiej śmiertelności raka piersi u kobiet jest zbyt późno wykonywana diagnoza nowotworu, oparta głównie o metody przesiewowe wspomagające metody obrazowe. Tak więc poszukiwanie nowych metod detekcji w oparciu o różnicowe panele biomarkerów jest szansą na określenie zmian chorobowych na bardzo wczesnym etapie powstawania nowotworów. Jednym z potencjalnych źródeł biomarkerów są płyny ustrojowe, odzwierciadlające aktualnie zachodzące procesy metaboliczne w tkankach. Analiza takich procesów prowadzona jest często w oparciu o metabolomikę, tj. globalne lub celowane analizy metabolomu wykonywane głównie przy użyciu spektrometrii mas (MS), bądź techniki NMR. Mimo niewątpliwego, olbrzymiego postępu w badaniach i zgromadzonej wiedzy and procesami nowotworowymi, włączając w to badania nad rakiem piersi, opracowane metody badań są czaso- i kosztochłonne i dalece mało efektywne w stosunku do oczekiwań. Dalsze poznawanie procesów, których wykorzystanie może ulepszyć stosowane metody jest więc niewątpliwie uzasadnione.

Przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr inż. Katarzyny Mrowiec, zatytułowana „***Wykorzystanie profilu metabolitów surowicy w ocenie ryzyka zachorowania na raka piersi***” doskonale wpisuje się w tę tematykę. Praca doktorska została wykonana w Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów im Profesora Mieczysława Chorażego, pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Piotra Widłaka, którego dotychczasowe osiągnięcia w zakresie badań nad mechanizmami molekularnymi nowotworów przy użyciu technik multiomicznych i spektrometrii mas są szeroko znane i cytowane. Badania przedstawione w niniejszej rozprawie były zatem, jak można się było spodziewać, bardzo dobrze zaplanowane pod względem metodycznym i metodologicznym. Ogrom pracy, jaki wykonała Doktorantka budzi uznanie, zwracają też uwagę liczące kilkaset gigabajtów dane suplementarne zawierające szczegółowe analizy wyników z profilowania metabolitów za pomocą spektrometrii mas.

Rozprawa ma układ klasyczny. W obszernym wstępie Doktorantka dyskutuje szeroko zagadnienie powstawania nowotworów w tym raka piersi wraz z obecnie przyjmowaną klasyfikacją, znanymi czynnikami ryzyka i epidemiologią. W następnej części Doktorantka skupia się na metodach detekcji raka piersi oraz wprowadza pojęcie markerów molekularnych i metabolitów jako markerów różnicowych raka. Duża część

Wstępu dotyczy metabolizmu komórkowego w raku, m.in. glukozy, glutaminy czy tłuszczów (lipidów). Ważna i obszerna część Wstępu dotyczy definicji zastosowań samej metabolomiki oraz stosowanych wysokoprzepustowych metod analiz biomarkerów raka piersi włączając w to spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (z ang. *Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy*, NMR) oraz spektrometrię mas. Cele pracy są bardzo dobrze sformułowane, następuje po nich obszerny rozdział dotyczący Metodyki badań, obejmujący materiał kliniczny stosowany w badaniach, techniczne parametry ilościowej analizy metabolicznej surowicy za pomocą MS, oraz szczegółowe informacje dotyczące analizy bioinformatycznej i statystycznej wyników, z uwzględnieniem analizy przyporządkowanych szlaków metabolicznych w oparciu o zidentyfikowane metabolity różnicujące. **Wyniki** zostały szeroko przedyskutowane w **rozdziale 4 (4.1-4.3.4)** i dotyczyły strony technicznej pomiarów oraz identyfikacji metabolitów w poszczególnych grupach pacjentek oraz ich porównanie z kobietami zdrowymi w tym samym przedziale wieku oraz powiązanych z tzw. uniwersalną sygnaturą nowotworową. **Dyskusja** jest być może trochę zbyt zwięzła jak na rozmiar pracy, można jednak uznać, że odnosi do wszystkich najważniejszych wyników i rozważa tematy do dalszych badań. Wyniki zostały raz jeszcze zwięźle omówione w **Podsumowaniu (rozdział 5.5)** oraz **Wnioskach końcowych (rozdział 6)**. Rozprawę kończy obszerny spis ponad 180 pozycji literatury. Wyniki analiz bioinformatycznych metabolitów zidentyfikowanych w ilościowej analizie metabolomicznej za pomocą MS zawarto w danych suplementarnych (załączniki do pracy).

Analiza uzyskanych wyników

Jak wynika z tytułu, celem badań opisanych w rozprawie było zidentyfikowanie, analiza ilościowa i różnicowa metabolitów surowicy w ocenie ryzyka zachorowania na raka piersi przy użyciu zestawu Absolute IDQp400 HR (płytki 96-dołkowe; Biocrates Life Sciences AG, Innsbruck, Austria) oraz systemu złożonego z chromatografu cieczonego 1290 Infinity UHPLC (Agilent Santa Clara, USA) i spektrometru masowego Orbitrap Q EXactive Plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

W pierwszej części **Wyników** opisano szczegółowo wpływ stabilności układu pomiarowego na jakość otrzymanych danych. Parametry te są często pomijane w opisach prac doświadczalnych tak więc samo przejrzyste przedstawienie parametrów analiz przez Doktorantkę jest/będzie bardzo pomocne przy projektowaniu podobnych wielkoskalowych doświadczeń (**1216 próbek łącznie**) w jej grupie badawczej jak i innych grupach

zajmujących się tą tematyką. Problemy te mogą dotyczyć samego układu chromatograficznego, zużywania się kolumn chromatograficznych, zanieczyszczeniu źródła jonów, stabilności rozpylania a także zmian w czasie retencji, czy optymalnej długości pomiarów. Wszystkie te parametry mają wpływ na tzw. *inter and intra batch effects* (efekt paczki w obrębie wielu analizowanych płytek lub pojedynczej płytki). Prawidłowe działania korekcyjne (np. odpowiedni rozkład próbek na płytkach, użycie kalibrantów, wzięcie pod uwagę parametrów kształtu i poszerzenia pików, brak odpowiednich pików w kontrolach, dobra separacja pików ADMA i SDMA, czy intensywność pików wzorca o m/z 743 powyżej $2e^6$) podjęte przez Doktorantkę pozwoliły na **utrzymanie odpowiedniego CV dla metabolitów (w granicy 15%)**, co ma bardzo duże znaczenie w analizie wielkoskalowej próbek!

Następne rozdziały Wyników dotyczyły analiz metabolomu surowicy jako potencjalnego źródła biomarkerów molekularnych związanych z ryzykiem wystąpienia raka piersi. W tym przypadku celem szczegółowym była analiza metabolitów obecnych w przed-diagnostycznych próbkach surowicy pobranych od zdrowych kobiet uczestniczących w norweskim badaniu **Trøndelag Health Study** (badanie **HUNT2**), dla których zebrano długoterminowe informacje na temat rozwoju raka piersi (906 próbek). Wybrano tu kobiety, u których w ciągu 15 lat obserwacji rozwinął się rak piersi (przypadki określone jako BC, *breast cancer*). Grupę kontrolną stanowiły kobiety w tym samym wieku, u których nie wykryto raka piersi ($n=453$, stanowiące tzw. pary kliniczno-kontrolne). Przeanalizowano **ilościowo 284 związki**, w tym 30 aminokwasów i aminy biogenne, heksozy oraz 253 lipidy (w tym acylokarnityny, glicerydy, fosfatydylocholino, sfingolipidy i estry cholesterolu). Stwierdzono, że czynnikiem zakłócającym za dużą heterogeniczność zbioru danych był wiek pacjentek (**Rycina 19**), ta więc podgrupy określone pod względem wieku przeanalizowano oddzielnie. Najwięcej metabolitów, których stężenie w surowicy różnicowało przypadki BC i grupę kontrolną (**82 związki**) zaobserwowano w **podgrupie młodszych kobiet (<45 lat)**. Podwyższony poziom glicerydów, fosfatydylocholin i sfingolipidów był powiązany **ze zmniejszonym ryzykiem raka u kobiet młodszych i tych w średnim wieku (≤64 lata)**, natomiast podwyższony poziom lipidów w surowicy był powiązany **ze zwiększonym ryzykiem raka piersi u starszych kobiet (> 64 lat)**. Stężenie w surowicy szeregu metabolitów różniło się pomiędzy przypadkami BC zdiagnozowanymi wcześniej (<5 lat) i później (>10 lat) po pobraniu próbki, przy czym związki te były również skorelowane z wiekiem uczestników. Uzyskane wyniki były spójne z wynikami badań metabolomicznych opartych na NMR przeprowadzonych w kohorcie uczestniczek HUNT2, gdzie zwiększone stężenie subfrakcji VLDL w surowicy wiązało się

ze zmniejszonym ryzykiem raka piersi u kobiet przed menopauzą. **Zmiany w stężeniu metabolitów wykryte w przed-diagnostycznych próbkach surowicy, które odzwierciedlały zaburzony metabolizm lipidów i aminokwasów, powiązano z długoterminowym ryzykiem zachorowania na raka piersi w sposób zależny od wieku.** Pomimo dużej liczby uczestników i dokładnego oszacowania ilościowego metabolitów, **powiązania między określonymi metabolitami a ryzykiem raka piersi były na ogół nieznaczące.** Należy stwierdzić, że wartość predykcyjna (tzw. *positive predictive value*) uzyskanej sygnatury metabolomicznej okazała się zbyt niska, aby można ją było zastosować w przyszłych badaniach przesiewowych raka piersi. Korelacja między stężeniem metabolitów została przedstawiona jako ważna przeszkoda w analizie biomarkerów ryzyka wystąpienia raka piersi. Uzyskana wiedza na temat profili metabolomicznych związanych z tą analizą może pomóc w opracowaniu dedykowanych strategii profilaktyki raka piersi w oparciu o zmodyfikowane wzorce diety i stylu życia.

W dalszej części dysertacji Doktorantka skupiła się na analizie zmian molekularnych w metabolomie płynów ustrojowych, mogących odpowiadać za progresję nowotworów litych. Porównano profile metaboliczne chorych na raka piersi (BC, n=112) z dwiema grupami kobiet zdrowych (z Polski i Norwegii; odpowiednio n=95 i n=112), o podobnym rozkładzie wieku. Pomimo różnic pomiędzy obydwoma kohortami kontrolnymi, **zestaw 43 metabolitów i lipidów jednakowo różnicował pacjentki z rakiem piersi i zdrowe kobiety.** Ponadto przeanalizowano mniejsze grupy pacjentek cierpiących na inne rodzaje nowotworów litych, włączając w nie przypadki z rakiem jelita grubego (colon cancer, CC), głowy i szyi (head and neck cancer, HNC) oraz płuc (lung cancer, LC), co pozwoliło na wyodrębnienie **42 metabolitów i lipidów, które jednakowo różnicowały wszystkie trzy typy nowotworów od obu grup zdrowych kobiet.** Tak zwana sygnatura wielonowotworowa (multi-cancer molecule signature), zawierała **23 związki**, obejmującą m.in. obniżone poziomy aminokwasów (alaniny, asparagianu, glutaminy, histydyny, fenyloalaniny i leucyny/izoleucyny), lizofosfatydylocholiny (na przykład przez LPC(18:0)) i diglicerydy. W surowicy chorych na raka piersi zaobserwowano obniżone stężenie estru cholesterolu (CE(18:2)), typowego dla innych nowotworów. Zestaw cząsteczek obecnych w sygnaturze szeregu nowotworów pozwolił na wyodrębnienie **klasyfikatora raka piersi, który przewidywał raka z bardzo dużą precyzją w niezależnych grupach kobiet (AUC>0.95).** Metabolity różnicujące pacjentki z rakiem piersi od grupy kontrolnej były podobne w wielu nowotworach, co sugeruje na możliwość szerszego potencjalnego zastosowanie ogólnego biomarkera raka w surowicy.

Odnosząc się do Wniosków, **wiek uczestników/-czek badania stanowił ważne kryterium różnicujące**, tak więc zdaniem Doktorantki badania powinny być prowadzone na grupach o podobnej strukturze wiekowej. Obniżone stężenie lipidów i aminokwasów w surowicy powiązane było z **podwyższonym ryzykiem występowania raka piersi w grupie zdrowych kobiet**, ale wartość predykcyjna uzyskanych wyników **nie pozwalała na wyodrębnienie metabolomicznej sygnatury ryzyka raka piersi**. Obniżony poziom aminokwasów (ale nie Argininy i Glutaminy), glicerydów i lizofosfatydylocholin oraz zwiększone stężenie heksoz i acylokarnitin **charakteryzuje pacjentki z BC**. Tego rodzaju zmiany wykrywa się również **w innych nowotworach, tzw. guzach litych**.

Zalety doktoratu

Oceniana rozprawa prezentuje nowoczesne podejście w poszukiwaniu nowych biomarkerów i szlaków molekularnych, których regulacja ma znaczenie w mechanizmach zawiadującym tworzeniem raka piersi. Doktorantka wykazała się umiejętnością planowania i przeprowadzenia wielkoskalowej, celowanej analizy metabolomicznej surowicy pochodzącej od różnych grup pacjentek. Praca pokazuje doskonale i bardzo cenne umiejętności Doktorantki w zakresie obsługi sprzętu i wdrażania metod mających na celu tzw. *troubleshooting*, znajomości i wykorzystania technik celowanej spektrometrii mas oraz bioinformatycznej i statystycznej obróbki wyników. Rozprawa prezentuje również dużą wiedzę teoretyczną Doktorantki w zakresie mechanizmów powstawania raka piersi a także liczne umiejętności praktyczne, obejmujące analizy chromatograficzne i bioinformatyczne z wykorzystaniem dedykowanych narzędzi oraz wnikliwą analizę zmienionych ścieżek bioinformatycznych. **Otrzymane wyniki mogą się przyczynić do opracowania skuteczniejszych metod detekcji i progresji raka piersi w oparciu o stworzone metody analityczne.**

Uwagi krytyczne i pytania

Przedłożona rozprawa ma charakter monografii, ale przedstawione wyniki zostały opublikowane w dwóch pracach oryginalnych (patrz poniżej), które to jednak nie zostały uwzględnione w spisie literatury a ryciny i opisy do rycin w części dysertacji dotyczących opisu **Wyników** nie mają odpowiednich odnośników do oryginalnych prac. Dotyczy to zwłaszcza pracy opublikowanej we *Frontiers in Oncology* w 2023 roku. Ponieważ uwaga ta dotyczy szeregu ilustracji nie uważam za konieczne ich szczegółowe wymienienie ale procedura ta jest powszechnie stosowana w pracach dyplomowych, w szczególności

doktorskich i rozprawach habilitacyjnych. Informacja o opublikowanych pracach powinna się również znaleźć na **stronie poprzedzającej rozdział Wstępu**. Proszę o ustosunkowanie się do powyższej uwagi, zwłaszcza że Doktorantka jest w nich pierwszym autorem. Prace te są następujące:

- 1) **Mrowiec K.** i wsp. Association of serum metabolome profile with the risk of breast cancer in participants of the HUNT2 study. *Front Oncol.* 2023 Mar 16;13:1116806. doi: 10.3389/fonc.2023.1116806; IF₂₀₂₃=3.5, 4 cytowania,
- 2) **Mrowiec K.** i wsp. Profiling of serum metabolome of breast cancer: multi-cancer features discriminate between healthy women and patients with breast cancer *Front Oncol.* 2024 Apr 04;14:1377373. doi:10.3389/fonc.2024.1377373; IF₂₀₂₃=3.5, 1 cytowanie.

Co więcej, bardzo istotną pozycją byłaby zamieszczenie tabeli (bądź schematu) ukazującą **proponowany** przez Doktorantkę **panel biomarkerów raka piersi**, który mógłby być podstawą do dalszych analiz surowicy pacjentek oraz stanowił załączek do bardziej szczegółowych badań funkcjonalnych nad zidentyfikowanymi cząsteczkami w surowicy bądź/i innych tkankach (np. guzy lite). Byłoby to dobrym uzupełnieniem danych przedstawionych na **Rycinie 37**, dotyczącej stężenia metabolitów, których poziom był różny u pacjentek z 4 typami nowotworów litych, oraz rozwinięciem **Tabeli 3 (strona 36)** dotyczącej *Podsumowania potencjalnych, metabolicznych markerów ryzyka obecnych w surowicy/osoczu krwi*.

W odczuciu Recenzenta możliwe przyczyny małej (ewentualnie średniej) wielkości efektu różnicującego (r , zgodnie z kryterium Cohena) w wielu przedstawionych porównaniach powinny być bardziej uwypuklone. Uwaga ta dotyczy generalnie samego profilowania metabolomicznego, być może należałoby się pokusić w przyszłości o niecelowane metody globalnej analizy metabolomicznej w oparciu o bardziej złożone i zwalidowane biblioteki związków (np. we współpracy z firmą Metabolon Inc.). Oczywiście to uwaga bardziej otwarta i nie dotycząca samej przedstawionej rozprawy doktorskiej.

Uwagi o charakterze technicznym

1. Wydaje się, że w niektórych miejscach przydatne byłyby schematy, np. w opisie funkcjonowania metabolitów, chociażby dotyczących metabolizmu glukozy (**strona 24**), metabolizmu glutaminy (**strona 25**) i lipidów (**strona 26**). Brakuje tu również tzw. graficznego abstraktu odnoszącego się o wyników opisanych i przedstawionych w

przedstawionej dysertacji oraz pracach oryginalnych (Mrowiec i wsp., *Front Oncology* 2023 i 2024).

2. **Strona 86**, „Oryginalna metoda opracowana przez dr Agatę Kurczyk”? Jaka to jest metoda, czy została poprzednio opisana, gdzie znajduje się odnośnik do pozycji literaturowej?

Uwagi redakcyjne

1. W niektórych przypadkach brakuje odnośników literaturowych, np. na **stronie 14**, „20 głównych typów BC”. Wyjaśnienie skrótu BC jest na **stronie 13** i **powtórzone na stronie 17**. **Rycina 3**- odnosi się do 15.6% zgonów a nie 16% jak na stronie 17. Mutacje genów *BRCA1* i *BRCA2* odpowiadają za 15-25% przypadków dziedzicznych nowotworów (brak cytowania, **strona 20**). **Strona 21**, brak cytacji odnośnie samego „metabolomu”, w pierwszym zdaniu!

2. Do pracy wkradły się pojedyncze błędy literowe, czy frazeologiczne (np. na **str. 18** „mammografie” zamiast „mammografię”, czy nadmiar lub brak spacji w szeregu miejscach. Powinno być również użyte sformułowania takie jak. „Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe”, **strona 20**, „...utleniająca natura i nagromadzenie...”, **strona 26**, „...55 acylokarnityn...” (**strona 55**), „test U Manna-Whitneya” (**strona 51**).

3. Użyta przez Doktorantkę metoda cytowania literatury jest dość rzadko używana, w formie „(...) (...)”. Dlaczego nie użyto standardowego formatu cytowania literatury z czasopism np. *Nature*, *Science* czy choćby z *Frontiers in Oncology*?

4. Niektóre skróty w języku polskim powinny być poprzedzone nazwą w języku angielskim i skrótem (np. Circulating tumor cells, CTs, na **stronie 19**), czy na **stronie 20** (CEA, CA15-3). **Strona 21**, brakuje szeregu wyjaśnień np. EGF, PI3K-AKT-mTOR, LDH i MCT1, NOX4 (**strona 26**), etc.

5. Uwaga frazeologiczna, **strona 23**: „...komórki nowotworowe faworyzują przekształcanie większości pirogronianu...”. „Faworyzują” jest w tym znaczeniu słowem kolokwialnym. **Strona 75**, powinno być „... oraz Cer(44:0) był istotnie statystycznie częściej obserwowany w przypadku grupy BC”.

6. Tytuł tabeli: Podsumowanie potencjalnych, metabolicznych markerów ryzyka obecnych w surowicy/osoczu krwi, **Tabela 3, strona 36.**

Uwagi końcowe i wnioski

Przedstawione uwagi i pytania merytoryczne oraz wskazane drobne zastrzeżenia techniczne i formalne nie wpływają oczywiście na moją bardzo pozytywną ocenę rozprawy. Ogrom pracy Doktorantki, wielość zastosowanych technik i analiz budzą uznanie i wskazują z jednej strony na znaczącą pracę eksperymentalną, jaką wykonała Doktorantka, a z drugiej strony na jej bardzo dobre umiejętności analityczne. Sposób przygotowania rozprawy dowodzi także zdolności do krytycznej analizy wyników, zarówno tych opublikowanych jak i własnych. Przedstawiona do oceny rozprawa wnosi ważne informacje do wiedzy na temat profilowania raka piersi i wielkoskalowej oceny markerów. Na podstawie przeprowadzonej analizy stwierdzam, że **recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr inż. Katarzyny Mrowiec spełnia wszystkie wymagania** określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) (zgodnie z art. 175.1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U.2018, poz. 1669). Na tej podstawie wnoszę do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii o dopuszczenie Pani mgr inż. Katarzyny Mrowiec do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Maciej Lalowski, PhD, DSc, visiting prof.
Department of Gene Expression
Institute of Molecular Biology and Biotechnology
Faculty of Biology,
Adam Mickiewicz University
Uniwersytetu Poznańskiego 6 St.
61-614 Poznań, Poland
Tel. (mobile) +48-797991432
E-mail: maciej.lalowski@amu.edu.pl
<https://ibmib.web.amu.edu.pl/groups/omics-diabetes-group/>
<https://maclal1-polonezbis.web.amu.edu.pl/>

Maciej M. Lalowski, Ph.D., D.Sc., Associate professor
Principal investigator
Medicum
Biochemistry/Developmental Biology
Meilahti Clinical Proteomics Core Facility
PO Box 63 (Haartmaninkatu 8), Room C214a
FI-00014 University of Helsinki
Finland
Tel. (office) +358-294125203
Tel. (mobile) +358-407790950
e-mail: maciej.lalowski@helsinki.fi