



Prof. dr hab. Renata Zaucha

Klinika Onkologii i Radioterapii, Gdański Uniwersytet Medyczny
Gdańsk, ul. Smoluchowskiego 17, Tel. 58 584 4405

**Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych lek. Krzysztofa
Ossolińskiego pod tytułem "Metabolomiczna analiza tkanki, surowicy i moczu w
poszukiwaniu potencjalnych biomarkerów raka pęcherza moczowego"**

Zgodnie z uchwałą Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie z dnia 29 sierpnia 2023r o powołaniu mnie na recenzenta w/w rozprawy mam zaszczyt przedstawić swoją opinię.

I. Wartość celu badawczego

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska dotyczy ważnego problemu medycznego jakim jest znalezienie metod wczesnego rozpoznawania raków pęcherza moczowego. Rosnąca zapadalność na te nowotwory, stale zwiększający się niedobór pracowników służby zdrowia na całym świecie i ograniczone zasoby finansowe są podstawą do poszukiwania coraz skuteczniejszych metod zapobiegania zarówno ich rozwojowi jak i progresji. Jednocześnie pilnie potrzebne są mniej inwazyjne i tańsze metody diagnostyki pierwotnego i nawrotowego raka pęcherza moczowego w praktyce klinicznej. Wczesne wykrycie może u wielu chorych zapobiec okaleczającym radykalnym cystektomiom.

Literatura na temat potencjalnych powiązań między czynnikami stylu życia a występowaniem raka pęcherza moczowego jest skąpa. Wykazano niekwestionowany związek między paleniem a rakiem pęcherza moczowego, co skłania do kontynuowania wysiłków skupiających się na profilaktyce pierwotnej, przede wszystkim poprzez szersze wdrażanie polityk kontroli tytoniu na całym świecie. Biorąc pod uwagę dane obserwacyjne wskazujące korzystny wpływ zdrowego stylu życia na wyniki kliniczne w przypadku innych typów

nowotworów, aspekt ten powinien stanowić priorytet także w badaniach nad rakiem pęcherza moczowego.

Dotychczas stosowane standardowo metody diagnostyki obrazowej są suboptymalne. Jest to powodem obserwowanej migracji stopnia zaawansowania - najczęściej zmiany stopnia zaawansowania patologicznego na wyższy niż stopień zaawansowania klinicznego u nieleczonych neoadjuwantowo pacjentów poddanych radykalnym zabiegom operacyjnym. Nieprawidłowa ocena stopnia zaawansowania jest powodem suboptymalnego leczenia i w konsekwencji pogorszenia rokowania. Wczesne rozpoznanie raków pęcherza moczowego oraz ich nawrotów podobnie jak precyzyjne i właściwe ustalenia klinicznego stopnia zaawansowania jest więc kluczowe dla poprawy jakości życia oraz efektów leczenia wyrażonych na przykład wskaźnikami przeżyć pięcioletnich.

Metabolomika należy do grupy badań translacyjnych, które mają za cel przełożenie odkryć naukowych „od stołu laboratoryjnego do łóżka chorego” (*bench-to bedside; B2B*). W 2003 roku przedstawiono je w modelu dwustopniowym, gdzie T1 odnosi się właśnie do *B2B*, a T2 obejmuje przełożenie wiedzy uzyskanej z badań klinicznych na poprawę zdrowia publicznego. Obecnie powszechnie stosowany jest model czterostopniowy, w którym:

- T1 jest charakteryzowane jako przekładanie wiedzy podstawowej, uzyskanej w wyniku badań laboratoryjnych, na zastosowanie kliniczne. Polega to na zgłębianiu wiedzy o ludzkiej fizjologii i poszukiwaniu możliwości wykorzystania jej w medycynie. Z tym stopniem związane są między innymi badania przedkliniczne i na zwierzętach oraz badania „pierwsze podanie/zastosowanie u człowieka”;
- T2 związane jest z przekładaniem wiedzy teoretycznej na pacjentów, innymi słowy polega na sprawdzaniu skuteczności nowych metod leczenia;
- T3 to wprowadzanie nowych zaleceń i wytycznych do rutynowej praktyki, kiedy to powstają nowe, powszechnie stosowane schematy leczenia;
- T4 oznacza translację nowych praktyk na zdrowie publiczne, gdzie analizuje się czynniki wpływające na zdrowie populacji, a celem jest opracowanie metod jego poprawy.

Problemy i pytania postawione przez Doktoranta są więc ważne, mają charakter poznawczy, choć uzyskane przez Niego wyniki obecnie nie wpływają na decyzje kliniczne umiejscawiając je w zakresie wspomnianego wyżej T1.

II. Poprawność metodyczna

Przedstawione badanie miało charakter prospektywny.

Autor włączył do analizy 100 chorych na raki pęcherza moczowego oraz 100 zdrowych ochotników.

Na przeprowadzenie badań Autor uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Rzeszowskim.

Hipoteza badawcza, która jest najważniejszym elementem każdego badania naukowego, została właściwie sformułowana.

Analizując dobór i liczebność grupy badanej trudno jest jednoznacznie stwierdzić, że jest satysfakcjonująca. Zarówno w dysertacji jak i w publikacjach brakuje charakterystyki badanej populacji. Autor posługuje się terminem "raki pęcherza moczowego", podczas gdy sam dosyć obszernie opisuje różnorodność tej grupy nowotworów wymieniając poszczególne typy histopatologiczne. Wydaje się niemożliwe, aby różne typy nowotworów, dodatkowo o różnej złośliwości biologicznej charakteryzowały identyczne zaburzenia czy zmiany metaboliczne. Prawdopodobnie miało to wpływ na różnorodność zaobserwowanych przez Autora typowych, według Jego oceny, zmian metabolicznych, które opisuje w poszczególnych publikacjach. Być może było to także powodem braku znamienności statystycznej w każdym z analizowanych parametrów. Powyższe spostrzeżenia nie umniejszają wartości pracy, którą należy uznać za cenny wstęp do dalszego poszukiwania jakże potrzebnych w tej jednostce chorobowej biomarkerów.

Doktorant posługuje się zaawansowanymi technikami analitycznymi, jak spektrometria mas (MS), spektroskopia magnetyczna rezonansu jądrowego (NMR), spektrometria atomowa emisyjna z indukcyjnie sprzężoną plazmą (ICP-OES). Swobodnie posługuje się metodami modelowania jak maszyny wektorów nośnych, algorytm k-najbliższych sąsiadów, sztuczne sieci neuronowe, konwolucyjne sieci neuronowe, rekurencyjne sieci neuronowe czy *random forest*.

Metody statystyczne wykorzystane w pracach są wysokospecjalistyczne. Poza standardowo stosowanymi w nauce testami jak ANOVA, AUC, ROC, OPLS-DA Autor korzystał z zaawansowanych metod analizy metabolomicznej jak na przykład VIP, R2Y, Q2, test permutacji. Analiza korelacji zaobserwowanych zmian ze skąpyimi wprowadzicie i opartymi na niedoskonałych metodach diagnostyki danymi klinicznymi jest wnikliwa.

III. Redakcja pracy

Przedłożona mi do oceny rozprawa na stopień doktora nauk medycznych składa się z cyklu monotematycznych prac, opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych, w których w Doktorant jest pierwszym lub drugim autorem.

Na cykl prac składają się:

1. **Ossoliński K.**, Ruman T. Ossoliński T i wsp.: Monoisotopic silver nanoparticles-based mass spectrometry imaging of human bladder cancer tissue. *Advances in Medical Sciences* 2022; 68(1):38-45.

IF = 3,287, MNiSW = 100

2. Nizioł J., **Ossoliński K.**, Płaza-Altamer A. i wsp.: Untargeted ultra-high-resolution mass spectrometry metabolomic profiling of blood serum in bladder cancer. *Scientific reports* 2022; 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19576-9>.

IF = 4,997, MNiSW = 140

3. **Ossoliński K.**, Ruman T., Copie V. i wsp.: Metabolomic and elemental profiling of blood serum in bladder cancer. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 2022; 12(6): 889-900.

IF = 14,026, MNiSW = 140

4. **Ossoliński K.**, Ruman T., Copie V. i wsp.: Targeted and untargeted urinary metabolic profiling of bladder cancer. *Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2023; 233; 115473.

IF = 3,571, MNiSW = 100

5. Nizioł J., **Ossoliński K.**, Płaza-Altamer A. i wsp. *Scientific Reports* 2023; 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36874-y>.

IF = 4,997, MNiSW = 140

Łączna punktacja prac włączonych do cyklu publikacji stanowiących rozprawę doktorską wynosi 620 pkt MNiSW, łączny IF: 30,878.

Zgodnie z oświadczeniami współautorów udział Doktoranta w każdej z publikacji jest istotny zarówno pod względem koncepcyjnym jak i wykonawczym i wynosi ok. 60%.

Do cyklu publikacji Autor dodał streszczenie przeprowadzonych badań, które zawiera:

- Wprowadzenie (omawiające epidemiologię - niestety powołując się m. innymi na dane z GLOBOCAN z 2010 roku i nie zawierające danych dla populacji polskiej, klinikę, diagnostykę, zarys metabolomiki, metody analityczne i statystyczne)

- Założenia i cel pracy (na cel pracy składają się trzy cele główne i trzy cele poboczne)
- Materiały i Metody
- Wyniki i Dyskusję (zawierające omówienie poszczególnych publikacji wchodzących w skład rozprawy)
- Podsumowanie i wnioski a właściwie jeden wniosek - "Badanie wykazało odmienne profile metabolomiczne pomiędzy pacjentami z rakiem pęcherza moczowego a grupą kontrolną.....Konieczne są jednak dalsze badania walidacyjne w celu potwierdzenia tych ustaleń w większych i bardziej zróżnicowanych kohortach pacjentów."

W pierwszej publikacji wykazano znaczne różnice w metabolitach z tkanki nowotworowej wobec prawidłowej. Na przykład aminokwasy takie jak glicyna i glutamina wykazywały obniżone wartości w tkance guza. Wysokie wartości uzyskane w wyniku przeprowadzonych badań mogą sugerować ich przydatność w analizie patomorfologicznej.

Kolejne dwie prace są zaadresowane profilowaniu metabolomicznemu w surowicy chorych na raki pęcherza moczowego - w każdej z prac Autor posługiwał się innymi metodami analitycznymi - w jednej metodą MS a w drugiej NMR. Teoretycznie zastosowana metodyka nie powinna wpływać na wyniki - wydaje się, że profile metaboliczne surowicy różnicujące chorych na raki pęcherza moczowego od zdrowych powinny być takie same niezależnie od metody badawczej. Wyniki obu prac należy więc traktować jako wstępne, tym bardziej, że w żadnej z analiz nie osiągnięto znamienności statystycznej.

Ostatnie dwie prace adresują profilowanie metabolomiczne na podstawie badania moczu. W tych badaniach zidentyfikowano metabolity różnicujące mocz od zdrowych i chorych jednak takich, które pozwoliłyby na ocenę stopnia zaawansowania czy stopień złośliwości histologicznej.

W dyskusjach zamieszczonych w opublikowanych pracach lekarz Krzysztof Ossoliński krytycznie omawia wyniki swoich badań, niektóre odnosząc do wyników uzyskanych przez innych autorów. Problem zmian metabolicznych w rakach pęcherza moczowego zajmowano się od około 20 lat a wyniki przedstawiono w około 90 pracach. Publikacje Doktoranta mają charakter innowacyjny, ponieważ poszukuje on zaburzeń nowocześniejszymi metodami wykorzystując kompleksowo surowice, mocz oraz tkankę guza. Najmocniejszym elementem wniosków jest krytyczne przedstawienie mocnych i słabych stron metod oraz wyników przeprowadzonych badań. Podkreślenie konieczności zwalidowania wyników,

przeprowadzenia badań prospektywnych oraz potrzeby posiadania drogiego specjalistycznego sprzętu oraz zespołu osób, które będą ten sprzęt obsługiwać a następnie analizować wyniki.

IV. Znaczenie naukowe i praktyczne wniosków wynikających z przeprowadzonych badań

Analiza metabolomiczna różnych tkanek pochodzących od chorych na raki pęcherza moczowego pogłębia wiedzę na temat tych nowotworów, jej wpływ na klinikę pozostaje w sferze futurystyki.

V. Wniosek końcowy

Oceniając rozprawę doktorską lekarza Krzysztofa Ossolińskiego pragnę stwierdzić, że nie mam istotnych zastrzeżeń merytorycznych odnośnie hipotezy, celu podjętych badań i zastosowanych metod badawczych. W pracy znajdują się drobne błędy stylistyczne i literowe - nie wpływają one jednak w żaden sposób na moją ocenę. Uzyskane wyniki badań są interesujące i wartościowe, choć na obecnym etapie nie mają przełożenia na korzyści kliniczne, które są nadrzędnym celem badań translacyjnych. Wysunięte przez Doktoranta wnioski a przede wszystkim ich krytyczna interpretacja odpowiadają postawionym celom i wnoszą nowe informacje do podstawowej wiedzy dotyczącej raka pęcherza moczowego. W załączonym streszczeniu Autor nie cytuje wielu z dotychczas opublikowanych badań o tej samej tematyce jednak są do nich odniesienia w poszczególnych publikacjach.

Przedstawiona do recenzji praca lekarza Krzysztofa Ossolińskiego spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim, ma istotny charakter poznawczy. Mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie wysoce pozytywną recenzję pracy, z wnioskiem o dopuszczenie lekarza Krzysztofa Ossolińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie pracy.

Prof. dr hab. Renata Zaucha

Gdańsk 16 listopada 2023.

Renata Zaucha
Prof. dr hab. Renata Zaucha
specjalista onkologii i radioterapii
F222 2754792