

Dr hab.n.med. Tomasz Kubiowski, prof. UWM^{1,2}

Warszawa 15 grudnia 2023 r.

¹ Katedra Onkologii,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

² Oddział Chemioterapii
Szpital Grochowski im. dr R.Masztaka w Warszawie.

Recenzja rozprawy doktorskiej lekarza medycyny Krzysztofa Ossolińskiego

Tytuł rozprawy

**METABOLOMICZNA ANALIZA TKANKI, SUROWICY I MOCZU W
POSZUKIWANIU POTENCJALNYCH BIOMARKERÓW RAKA
PĘCHERZA MOCZOWEGO**

Rak pęcherza moczowego stanowi jeden z najczęstszych nowotworów układu moczowego. Jego częstość w populacji ogólnej jest ściśle uzależniona od płci. Opierając się na danych zawartych w Krajowym Rejestrze Nowotworów w 2020 roku rozpoznanie tego nowotworu postawione zostało u 4886 mężczyzn oraz 1536 kobiet. Rak pęcherza moczowego stanowił ponadto przyczynę zgonu u 915 kobiet oraz 3202 mężczyzn. Rokowanie w tym nowotworze jest uzależnione od podtypu histologicznego, zróżnicowania tkanki nowotworowej, stopnia naciekania ściany pęcherza moczowego, zajęcia regionalnych węzłów chłonnych oraz obecności przerzutów w narządach odległych. Około 75% nowo wykrytych raków pęcherza moczowego stanowią guzy nienaciekające mięśniówkę pęcherza tj. ograniczone do błony śluzowej lub podśluzowej. U pozostałych chorych stwierdza się, w momencie rozpoznania, zaawansowanie procesu nowotworowego, niejednokrotnie uniemożliwiające podjęcie leczenia radykalnego. Stąd też niezmiernie ważnym jest poszukiwanie nowych biochemicznych lub molekularnych markerów procesu nowotworowego umożliwiających wczesne wykrycie

choroby lub monitorowanie efektów prowadzonej terapii przeciwnowotworowej. Jest to tym ważniejsze, gdyż jak pokazują dane kliniczne u znacznego odsetka chorych z pierwotnie rozpoznany nienaciekającym rakiem urotelialnym pęcherza moczowego dochodzi, pomimo podjęcia właściwego postępowania terapeutycznego, do progresji choroby. Poznanie roli poszczególnych szlaków sygnałowych w procesie transformacji nowotworowej oraz zaburzeń metabolicznych w transformującej komórce pozwolić może ponadto na wyodrębnienie nowych, potencjalnych celów dla przyszłych terapii, co w konsekwencji doprowadzić może do istotnej personalizacji leczenia poszczególnych chorych.

Przedłożona do recenzji praca Pana dr Krzysztofa Ossolińskiego nienagannie wpisuje się w tematykę poznania zaburzeń metabolicznych towarzyszących transformacji nowotworowej. Doktorant podjął trud oceny możliwości wykorzystania analizy metabolomicznej surowicy, tkanki i moczu do wskazania potencjalnych biomarkerów raka pęcherza moczowego. Porównanie profili metabolicznych reprezentatywnych dla osób zdrowych oraz pacjentów z rozpoznany rakiem pęcherza moczowego zmierzające do wyodrębnienia określonych metabolitów lub szlaków metabolicznych mogących spełniać rolę wczesnych markerów diagnostycznych procesu nowotworowego lub wskazujących na nowe „cele” dla terapii personalizowanych nieść może istotną wartość poznawczą mającą swoje implikacje kliniczne. W tym właśnie upatrywałem największą wartość pracy.

Podstawę przedłożonej do recenzji rozprawy stanowi 5 prac:

1. Ossoliński K, Ruman T, Ossoliński T, Ossolińska A, Arendowski A, Kołodziej A, Płaza-Altamer A, Nizioł J. Monoisotopic silver nanoparticles-based mass spectrometry imaging of human bladder cancer tissue: Biomarker discovery. *Adv Med Sci*. 2023 Mar; 68(1):38-45.
2. Nizioł J, Ossoliński K, Płaza-Altamer A, Kołodziej A, Ossolińska A, Ossoliński T, Ruman T. Untargeted ultra-high-resolution mass spectrometry metabolomic profiling of blood serum in bladder cancer. *Sci Rep*. 2022 Sep 7;12(1):15156.
3. Ossoliński K, Ruman T, Copié V, Tripet BP, Nogueira LB, Nogueira KOPC, Kołodziej A, Płaza-Altamer A, Ossolińska A, Ossoliński T, Nizioł J. Metabolomic and elemental profiling of blood serum in bladder cancer. *J Pharm Anal*. 2022 Dec;12(6):889-900.

4. Ossoliński K, Ruman T, Copié V, Tripet BP, Kołodziej A, Płaza-Altamer A, Ossolińska A, Ossoliński T, Nieczaj A, Nizioł J. Targeted and untargeted urinary metabolic profiling of bladder cancer. *J Pharm Biomed Anal.* 2023 Sep 5;233: 115473.
5. Nizioł J, Ossoliński K, Płaza-Altamer A, Kołodziej A, Ossolińska A, Ossoliński T, Nieczaj A, Ruman T. Untargeted urinary metabolomics for bladder cancer biomarker screening with ultrahigh-resolution mass spectrometry. *Sci Rep.* 2023 Jun 16;13(1):9802.

W trzech pracach Doktorant jest pierwszym autorem, zaś łączna wartość wskaźnika oddziaływania (IF) wynosi 30.878. Jest to wartość wskazująca na wysoką jakość prowadzonych badań oraz wagę uzyskanych wyników. Łączna punktacja MNiSW wynosi zaś 620 punktów. Analiza udziału procentowego Doktoranta w powstawaniu prac składających się na rozprawę doktorską dowodzi jego istotnego zaangażowania w powstanie dwóch prac (udział 40% i 30%, wskaźnik oddziaływania (IF) 8.568, punktacja MNiSW 240 pkt.). W pozostałych trzech pracach udział procentowy Doktoranta w ich powstaniu był zróżnicowany i wynosił 14.29%, 9.09% oraz 5.0%. Przytoczony powyżej udział procentowy może nie w pełni oddawać zaangażowanie merytoryczne Pana Doktora w powstawanie prac, gdyż jak wskazano w załączonych tabelach był on odpowiedzialny za opracowanie założeń teoretycznych przeprowadzonych badań, dobór, pozyskanie i zabezpieczenie materiału klinicznego, analizę danych klinicznych oraz współtworzenie treści wszystkich manuskryptów.

Analiza poszczególnych publikacji jasno dowodzi nie tylko dojrzałości w doborze tematyki prac badawczych, ale wskazuje także na fakt dostrzegania przez Doktoranta roli nauk podstawowych, których rozwój pozostaje w ścisłym związku z wczesnym wykrywaniem chorób nowotworowych oraz podnoszeniem jakości opieki onkologicznej.

Wszystkie prace składające się na cykl tematyczny są pracami badawczymi. Analiza metabolomiczna tkanki nowotworowej pęcherza moczowego umożliwiła wstępną identyfikację 28 związków wykazujących największe zróżnicowanie między obszarami tkanki nowotworowej i prawidłowej. Przeprowadzone w dalszym etapie badań analizy statystyczne pozwoliły na wyodrębnienie 10 metabolitów istotnie różnicujących tkankę nowotworową i prawidłową pęcherza moczowego. Metabolity te obejmowały m.in. glicynę, hipotaurynę, 3-metylobutanol, glutaminę i inne. Analiza metabolomiczna surowicy miała natomiast na celu identyfikację potencjalnych biomarkerów raka pęcherza moczowego obecnych w surowicy krwi. Zastosowanie spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego pozwoliło na

identyfikację 4 metabolitów różnicujących surowice nowotworowe i kontrolne. Wysokorozdzielcza spektrometria mas pozwoliła dodatkowo na identyfikację odpowiednio 25 i 27 metabolitów różnicujących obydwie grupy. Co więcej, zastosowane techniki badawcze pozwoliły na wyodrębnienie metabolitów mogących różnicować poszczególne stopnie złośliwości histologicznej oraz stopnie zaawansowania klinicznego w odniesieniu do surowicy osób zdrowych. Implementacja badań metabolomicznych dla analiz proliferyacji metabolicznej moczu pobieranego od chorych na raka pęcherza moczowego oraz osób zdrowych pozwoliła na wyodrębnienie metabolitów istotnie różnicujących mocz pochodzący od osób chorych i zdrowych. Ponadto w toku prowadzonych prac opisano metabolity reprezentatywne dla poszczególnych stopni złośliwości histologicznej oraz zaawansowania klinicznego choroby nowotworowej. Nie zidentyfikowano jednak statystycznie istotnych różnic we wzorcach metabolitów, które rozróżniałyby między sobą poszczególne stopnie zaawansowania klinicznego (pT1 vs pT1 vs pT2) lub stopnie złośliwości histopatologicznej (LG vs HG).

Wnioski wypływające z powyższych prac są inspirujące i bez wątpienia stanowić mogą bodziec dla dalszych prac badawczych. Oparcie prowadzonych analiz naukowych na technikach spektrometrii mas czy spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego stanowi ogromne wyzwanie począwszy od zrozumienia teoretycznych podstaw związanych z metodologią badania, poprzez właściwe zabezpieczenie materiału klinicznego, na odpowiednim doborze stosowanych analiz statystycznych kończąc. W mojej ocenie Doktorant wywiązał się z tego zadania bardzo dobrze. Niezwykle cennym jest umieszczenie we wstępie rozprawy podstawowych informacji na temat poszczególnych technik badawczych i statystycznych. Szkoda tylko, że ta część rozprawy napisana została niezwykle „technicznym” językiem.

Jak wspominałem powyżej wnioski wypływające z przedstawionej do recenzji pracy są bardzo inspirujące. Pan Doktor formułuje je w sposób niezwykle ostrożny. Dostrzega ograniczenia prowadzonych analiz oraz trudności związane z ich kontynuacją (konieczność walidacji wyników, dostępność do specjalistycznego sprzętu, etc.). Wskazuje także na konieczność weryfikacji uzyskanych wyników w prospektywnych badaniach klinicznych. Przedstawione opracowanie przygotowane zostało w sposób niezwykle staranny, z należytą dbałością o szczegóły graficzne i edytorskie. Całość, z wyłączeniem wspomnianych powyżej fragmentów, napisana została zrozumiałym językiem, nie zawierającym określeń żargonowych tak często stosowanych w codzienny języku medycznym. Postawione tezy i wnioski znalazły poparcie we właściwym doborze aktualnego piśmiennictwa medycznego.

Podsumowując, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana Doktora Krzysztofa Ossolińskiego stanowi dojrzałe i kompletne dzieło niosące duże wartości poznawcze. Praca powyższa spełnia również wszystkie kryteria przypisane rozprawom na stopień naukowy doktora, zdefiniowane w art. 13 ust. 1. Ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenia Pana Doktora Krzysztofa Ossolińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. n. med. Jacek Kwiatkowski
SPECIALISTA ONKOLOGII
KLINICZNEJ
2051607