

dr hab. med. Paweł Rzymiski
Katedra i Klinika Zdrowia Matki i Dziecka
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Poznań 8 luty 2019r

**Recenzja rozprawy doktorskiej z cyklu prac lek. Agnieszki Horały
pt: "Proteomiczno-metaboliczna strategia poszukiwania metod wczesnej
diagnostyki raka jajnika z wykorzystaniem spektrometrii masowej"**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska przygotowana przez lek. Agnieszkę Horałę składająca się z trzech publikacji stanowi spójny tematycznie cykl. Temat rozprawy jest nowatorski a celowość podjęcia badań w przedmiotowym zakresie opisano zwięźle. Pomimo licznych badań naukowych w zakresie wczesnej diagnostyki raka jajnika w ostatnich dekadach, możemy mówić niestety tylko o ewolucji. Zarówno naukowcy jak i klinicyści od lat oczekują przełomu w diagnostyce tego nowotworu, stąd podjęcie tego tematu jest palące i aktualne.

Rozprawa liczy 29 stron omówienia cyklu prac wraz ze streszczeniem w języku polskim, angielskim i opatrzone jest dodatkowym piśmiennictwem. Kolejne, nienumerowane strony zajmują 3 prace oryginalne opublikowane w renomowanych i recenzowanych czasopismach, zgody komisji bioetycznej, oświadczenia współautorów o ich zgodzie na wykorzystanie publikacji jako części rozprawy doktorskiej. Tytuł rozprawy doktorskiej w pełni odpowiada tematyce publikacji, co więcej, w chronologii publikacji widać zamierzony cel i rozwój badań. Od początkowej identyfikacji zestawu potencjalnych markerów proteomicznych i metabolicznych po identyfikację i testowanie najskuteczniejszych z nich w zakresie konkretnego zastosowania klinicznego. Przedstawione prace o łącznej punktacji Impact Factor (współczynnik oddziaływania) wynoszącym 7,451 należy ocenić wysoko. Analizując te publikacje



oraz dorobek naukowy doktorantki można dostrzec jej bezpośrednie zaangażowanie w kompleksowe badania nad profilowaniem molekularnym w diagnostyce nowotworów. Lek Agnieszka Horała jest współautorem licznych prac o charakterze zespołowym. Tak złożona metodologicznie praca wymaga zgranego współdziałania co wskazuje, że doktorantka jest samodzielnym i sprawnym naukowcem. Warto podkreślić, że nie są to powielające się zespoły, i choć wszyscy współautorzy publikacji z cyklu prac wyrazili zgodę na ich wykorzystanie dla celów rozprawy doktorskiej, to brakuje ewentualnej wzmianki o udziale procentowym lek Agnieszki Horały w dziełach. Ale wiodąca rola doktorantki w przedstawionym cyklu nie budzi wątpliwości w zakresie planowania, opracowania, analizy wyników i przygotowania manuskryptów.

W pierwszej publikacji cyklu doktorantka analizuje przydatność diagnostyczną obszernego panelu markerów w diagnostyce raka jajnika (sEGFR, FGF-basic, Follistatin, G-CSF, sHER2/neu, HGF, sIL-6Ralfa, Leptin, Osteopontyna, PDGF-AB/BB, PECAM-1, Prolaktyna, SCF, sTIE-2, sVEGFR-1, sVEGFR-2, CA125, HE4). Przeanalizowano to zarówno w wartościach stężeń, jak również przedstawiono nowoczesną analizę jako potencjalnych testów diagnostycznych w wykrywaniu i różnicowaniu za pomocą krzywych ROC i analizy PLS-DA. Wartym wyróżnienia jest również unikalny dobór obszernego panelu markerów i analiza w zakresie typu I i II raka jajnika, charakteryzujących się odmiennym rokowaniem, co może przyczynić się do wyłonienia skuteczniejszych markerów szczególnie gorzej rokującego typu. W drugiej publikacji skupiono się na klinicznym przetestowaniu wybranych spośród panelu kombinacji markerów. Badaniem objęto zarówno znane markery CA-125, HE4 i ocenę ryzyka raka jajnika (ROMA) w powiązaniu z pojedynczym najskuteczniejszym markerem osteopontyną. Ciekawym spostrzeżeniem jest ustalenie statystycznie odmiennego poziomu odcięcia (cut-off) dla HE4. Wykazano poprawę skuteczności dyskryminacyjnej, przy zastosowaniu znanych markerów w powiązaniu z osteopontyną. Publikacja trzecia traktuje o użyciu metody jonizacji próbki i analizy czasu przelotu w spektrometrze masowym (MALDI-TOF MS), gdzie doktorantka wykorzystuje wiarygodną metodę w profilowaniu białkowym i peptydowym. Zastosowanie tej metody w przypadku raka jajnika ma charakter nowatorski.



Wyizolowano 170 unikalnych szczytów sygnału w spektrometrze (piki m/z), które przeanalizowano jako potencjalnie przydatne w diagnostyce za pomocą krzywych ROC. Przy czym analizy chemometryczne kombinacji szczytów sygnału (peaków) ze spektrometru obejmowały modelowanie neuronowe (SNN, supervised neural network), algorytmy genetyczne (GN, genetic algorithm) i metodę klasyfikatora quick classifier (QC). W pracy tej zastosowano bardzo zaawansowane metody analiz biochemicznych w powiązaniu z modelowaniem statystycznym i wyłoniono zestaw sygnałów szczytowych ze spektrometru (m/z peaks) najskuteczniejszych w różnicowaniu raka jajnika. Pomimo tego pole powierzchni pod krzywą ROC w ich przypadku pozostaje niezadowalające (AUROC od 0,66-0,77). Jak podsumowuje autorka, jest to niewątpliwie istotna i unikalna praca w zakresie poznawczym, będąca asumptem do dalszych poszukiwań markerów raka jajnika.

Zrecenzowane prace w cyklu publikacji są wartościowym wkładem w naukę światową i należy ocenić je wysoko. Jednocześnie sukcesywnie prowadzone badania są poszerzane i pogłębiane, co może znaleźć odzwierciedlenie w dalszych ciekawych i wartościowych pracach. Szczególnie istotne byłoby analizowanie wybranych, najprzydatniejszych markerów metodami analizy regresji, jak chociażby najlepiej ocenianą osteopontynę. Z obowiązku recenzenta wśród kilku drobnych niedociągnięć dotyczących przede wszystkim omówienia cyklu prac wymieniłbym m.in. mało rozwinięte omówienie aktualnej wiedzy na temat skryningu. W uzasadnieniu podjęcia tego tematu pewien niedosyt pozostawia wzmiankowe omówienie aktualnego stanu i prób skryningu raka jajnika. Ponadto autorka nie scharakteryzowała w omówieniu badanych pacjentek, które różnią się między 3 publikacjami cyklu. W jakim zakresie były to te same pacjentki, czy grupa ulegała sukcesywnemu poszerzaniu czy też zastosowano różne kryteria włączenia i wykluczenia w każdej z prac. W każdej publikacji liczebność grup jest różna, co jest zapewne związane z etapowaniem badań i ich rozwojem na przestrzeni lat. Niezręczne jest również sformułowanie w omówieniu cyklu, że niewątpliwymi zaletami jest liczna grupa badana. Analizy przeprowadzono w metodologicznie bardzo poprawnej grupie, jednak nie jest ona aż tak liczna jak spotykane w literaturze przedmiotu, szczególnie w zakresie



nowotworów we wczesnym stopniu zaawansowania (FIGO 1 i 2). Oczywiście zebranie dużej grupy pacjentek we wczesnym stopniu zaawansowania jest problematyczne na całym świecie wobec nieskuteczności skryningu. Ponadto w publikacji pierwszej lub w omówieniu cyklu prac, można było pokusić się o przedyskutowanie roli badanych markerów angiogenezy w prognosyce i odpowiedzi na leczenie. Podobnie mało zaakcentowano analizy badanych markerów we wczesnych stadiach raka jajnika w pracy 1 i 2, co wiąże się również z niefortunnym stwierdzeniem autorki, że osteopontyna wykazuje silny potencjał zarówno w diagnostyce różnicowej jak i skryningu, czego wyraźnie nie wykazano. Dlatego też pewien niedosyt pozostawia brak analizy korelacyjnej poziomów markerów a stopnia zaawansowania choroby, pomimo dostępności danych na ten temat. Być może będzie to przedmiotem dalszych analiz i wskazówką dla doktorantki pod kątem przygotowania przyszłych publikacji. Jednak dojrzewanie naukowe i dystans w tym zakresie autorka przejawiała w publikacji 2, stwierdzając ostrożnie, że osteopontyna może być przydatna we wczesnej diagnostyce. W publikacji 3 ogranicza się wręcz do stwierdzenia istnienia możliwości profilowania białkowego i różnic w tym zakresie nie wskazując na obecnie ich dużą przydatność w praktyce. Wspomniane uwagi w żaden sposób nie obniżają wartości pracy doktorskiej szczególnie, że mam świadomość, iż nie jest to pojedyncza zamknięta praca, a badania rozwojowe i wiele z powyższych analiz będzie zapewne w przyszłości ich częścią.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa z cyklu prac lek Agnieszki Horały przygotowana pod kierunkiem prof. dr hab. med. Ewy Nowak-Markwitz spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych w dyscyplinie medycyna zgodnie z art 13 ust 1 ustawy z dnia 13 marca 2003r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65 poz. 595 z późn. zm.). Stanowi ona oryginalne rozwiązanie aktualnego i istotnego problemu naukowego poszukiwania nowoczesnych i skuteczniejszych metod diagnostyki raka jajnika.



Dlatego z przekonaniem zwracam się do Rady Wydziału Lekarskiego I Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu o dopuszczenie lek. Agnieszki Horały do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Rozw. *Agnieszka*

dr hab. n. med. Paweł Kzyński
specjalista ginekolog położnik
tel. 695-393096
2652298