

Prof. dr hab. n med. Marek Ussowicz
Katedra i Klinika Transplantacji Szpiku,
Onkologii i Hematologii Dziecięcej
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

Recenzja rozprawy doktorskiej

Tytuł rozprawy: Zastosowanie spektroskopii IR i spektroskopii Ramana w poszukiwaniu potencjalnych markerów diagnostycznych i prognostycznych w surowicy i szpiku kostnym pacjentów pediatrycznych z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL)

Promotorzy: dr hab. n. med. Radosław Chaber, prof. UR
dr hab. n. fiz. Józef Cebulski, prof. UR

Zawartość Rozprawy

Rozprawa dotyczy zastosowania spektroskopii wibracyjnej (FT-IR i Ramana) w diagnostyce i prognozowaniu ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL) u dzieci. Jest to innowacyjne podejście, które ma na celu identyfikację markerów molekularnych w łatwo dostępnych materiałach biologicznych (surowicy i szpiku kostnym) i może przyczynić się do rozwoju nieinwazyjnych, szybkich metod wspierających klasyczne badania cytologiczne, molekularne i immunofenotypowe.

Przedstawiona do recenzji praca liczy 193 strony i składa się z 7 rozdziałów. Podział rozprawy jest tradycyjny na Wstęp, Cel pracy, Materiał, Metody, Wyniki, Dyskusję, Wnioski, Streszczenie i Piśmiennictwo. Rozprawa jest wzbogacona o 92 rycin i 23 tabele umieszczonych w tekście.

Ocena ogólna

Praca została napisana bardzo starannie i przejrzysto, a jej układ nie budzi zastrzeżeń. Doktorantka wykazała się umiejętnością właściwego sformułowania problemu badawczego, dobrania właściwych metod badawczych, uzyskała wartościowe wyniki o znaczeniu praktycznym i przedstawiła dobrą znajomość prowadzonych badań.

Wstęp

Rozprawa zawiera szczegółowo opracowany wstęp z epidemiologią ALL, aktualnymi protokołami leczenia, a także z wyczerpującym opisem metod spektroskopowych.

Cel

Cele badania zostały starannie dobrane i przedstawione w jasny sposób.

Materiał i Metody

W rozdziale Doktorantka scharakteryzowała grupę badawczą oraz zastosowane techniki laboratoryjne. Badania objęły 91 pacjentów, w tym 48 z ALL, co jest dużą grupą jak na pediatryczne badania nowotworowe, dodatkowo zebrano grupy kontrolne (zdrowi i pacjenci z innymi chorobami hematologicznymi). Metodyka została opisana w sposób dokładny i szczegółowy, dowodząc znajomości wykorzystanych technik badawczych. Analiza statystyczna została przeprowadzona z użyciem prawidłowo dobranych metod statystycznych.

Wyniki

Wyniki badań zostały przedstawione w sposób bardzo szczegółowy, ale też uporządkowany i przejrzysty.

Doktorantka przedstawiła wyniki wskazujące, że zmiana składu fizykochemicznego osocza towarzyszy ALL i innym zaburzeniom hematologicznym. W pewnym uogólnieniu, spektroskopia FTIR ujawniła istotne różnice pomiędzy grupą kontrolną i pacjentami z zaburzeniami hematologicznymi lub ALL m.in. w pasmach 1398–1396, 1309–1306, 1239–1238, 1170–1168 i 1103–1102 cm^{-1} , odpowiadających białkom, lipidom, w tym fosfolipidom, i kwasom nukleinowym.

Interesujące są obserwacje różnic w niższym udziale struktury β -arkusza (1630 cm^{-1}) w grupie wysokiego ryzyka, które wymagają dalszych badań i są potencjalnym biomarkerem.

W surowicy krwi dzieci z ALL wykryto różnice w intensywności pików Ramana, które pozwalały rozróżnić pancytopenię w przebiegu ALL od pancytopenii innych przyczyn.

Analizy PCA i HCA nie wykazały jednoznacznego klastrowania pacjentów wg grup ryzyka (HR vs non-HR) ani korelacji z rokowaniem, ale Doktorantka zaobserwowała, że pacjenci zdrowi tworzą odrębny, zwarty klaster, co daje potencjał do dalszych badań.

Dyskusja

Dyskusja ma obiektywny i zdystansowany charakter w stosunku do uzyskanych przez Autorki wyników i odnosi je do wyników przedstawionych przez innych badaczy. Doktorantka wykazuje się zdolnością kojarzenia faktów i dobrą znajomością piśmiennictwa w postaci 172 odnośników literaturowych. Walorem piśmiennictwa jest

trafny dobór wyczerpujący stan aktualnej wiedzy i jego nowoczesność, gdyż większość pozycji pochodzi z ostatnich lat.

Wnioski w liczbie 4 wynikają z przeprowadzonych badań i odnoszą się do pytań postawionych w celach pracy.

Uwagi krytyczne

Metody analizy widm na dzień dzisiejszy są we wczesnej fazie wymagającej walidacji klinicznych. Jak Doktorantka przytacza, w opublikowanych przez inne zespoły badaniach „różnicowanie pacjentów zdrowych i pacjentów z białaczką z dokładnością 66%, czułością 99% i specyficznością 57%, a także pacjentów z białaczką (AML i ALL) od pacjentów z innymi nowotworami wieku dziecięcego z dokładnością, czułością i specyficznością wynoszącą odpowiednio 67%, 72% i 60%” jest niewystarczające i wymaga poprawy o ile ma mieć szanse na zastosowanie praktyczne.

Poniżej przedstawiam główne uwagi krytyczne, które nasunęły mi się podczas lektury rozprawy.

Do rozpoznania ALL konieczne jest 25% limfoblastów, a nie jak podano na str. 13 - 20%. Podobnie w rozdziale Materiał jest stwierdzenie „Średni odsetek komórek blastycznych w szpiku kostnym wynosił 79% i mieścił się w przedziale od 20% do 96%”. Jest to uwaga, która wymaga poprawy.

Doktorantka odnotowuje wiele interesujących wyników, które zasługują na głębszą dyskusję. Obserwacja niższej częstości występowania struktur beta arkusza w próbkach pacjentów z ALL wymaga identyfikacji, które białka odpowiadają za pojawienie się tej różnicy.

Badana metodologia na obecną chwilę ma istotne ograniczenia techniczne i zależy od jakości i składu badanej próbki. Jak sama Doktorantka zauważyła, „Jedną z prawdopodobnych przyczyn uzyskania wyników, które nie wydorębiają w sposób jednoznaczny pacjentów z ALL, jest maskowanie ważnych zmian spektralnych przez obecność hemoglobiny w próbkach, uwolnionej z prekursorów erytrocytów.” (str.150), co od strony praktycznej oznacza istotną trudność, możliwe że powodującą konieczność poszukiwania metod oczyszczania próbki z zanieczyszczenia w postaci wolnej hemoglobiny.

Interesujące byłoby odniesienie się do pytania, czy w uzyskanych wynikach były sygnatury odpowiadające obecności wolnokrążącego DNA (cfDNA), ponieważ u pacjentów z ALL można oczekiwać jego podwyższonego stężenia i wpływu na widmo w postaci silniejszej ekspresji pików nukleinowych w porównaniu z widmami osób zdrowych, co czyni cfDNA kolejnym potencjalnym markerem diagnostycznym. Z drugiej strony nadmiar cfDNA może być nieodnotowanym czynnikiem zakłócającym interpretację analizy białek czy lipidów. Podobną grupą cząstek, która mogłaby odgrywać rolę biomarkerową i uwidoczniłaby się w analizie spektralnej, są egzosomy, co też warto przeanalizować, zwłaszcza że w próbkach surowicy mogą prowadzić do przekłamań w interpretacji – np. widziane zmiany w lipidach mogą pochodzić bardziej od egzosomów niż od wolnych lipidów surowicy.

W tym kontekście należy zauważyć, że badany materiał - surowica i lizaty szpiku - są materiałem wysoce złożonym, ulegającym zmianom biologicznym wskutek różnych zjawisk, co stwarza trudności interpretacyjne. Uważam, że kolejnym krokiem badań mogłoby być włączenie zaawansowanych metod bioinformatycznych i uczenia maszynowego do analizy danych.

Pewnym ograniczeniem dla opisanych badań jest niska liczebność podgrup, np. w T-ALL (tylko 5 pacjentów) lub w grupie pacjentów wysokiego ryzyka, co obniża moc statystyczną i może odpowiadać za brak istotności statystycznej.

Uwagi redakcyjne

Praca napisana jest starannie, poprawnym językiem bez błędów stylistycznych i interpunkcyjnych. Poniżej wymieniono zauważone drobne usterki redakcyjne.

W tekście pojawiają się sformułowania żargonowe np. „wysokim poziomem choroby resztkowej”, „Zaprojektowane na poziomie molekularnym inhibitory kinazy tyrozynowej” (powinno być np. „Molekularnie zaprojektowane inhibitory kinazy tyrozynowej”), str. 18 „gdy zostanie pobrane lub oddane ciepło bądź zostanie wykonana nad lub przez dane ciało/układ praca.” (może być „gdy układ wymienia ciepło z otoczeniem lub gdy wykonywana jest nad nim bądź przez niego praca”). W rozprawie Doktorantka konsekwentnie określa strukturę „beta sheet” jako „beta kartkę”, natomiast w polskiej

terminologii naukowej zalecany jest termin „arkusz” (za: SŁOWNIK TERMINÓW KRYSTALOGRAFICZNYCH, 2003) lub „harmonijka”.

Cel 1 jest niejasno sformułowany, mogłoby być „Analiza różnic molekularnych w zależności od widm...”.

W Dyskusji pojawiają się obszerne powtórzenia i opis wyników, co wpływa na czytanie i zwiększa jej długość.

Przedstawione w niniejszej recenzji uwagi krytyczne, w głównej mierze mające charakter marginalny lub polemiczny, w niewielkim jedynie stopniu obniżają bardzo wysoką ogólną ocenę przedstawionej rozprawy. Doktorantka wykazała się umiejętnością sformułowania i rozwiązania problemu badawczego, osiągnęła cele dając dowód umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Istotne elementy rozprawy i wkład Autorki

Do istotnych i oryginalnych elementów rozprawy zaliczam:

- nowatorstwo i praktyczną przydatność uzyskanych wyników. Rozprawa jest oryginalna, opiera się o połączenie medycyny, biologii molekularnej, fizyki i chemometrii. Rozprawa stanowi oryginalny wkład w rozwój nieinwazyjnych narzędzi diagnostycznych w ALL u dzieci, Doktorantka wykazuje, że spektroskopia IR i Ramana może dostarczyć istotnych informacji o stanie molekularnym pacjentów z ALL. Najważniejsze odkrycia – różnice wynikające ze zmian ilościowych struktury β -arkusza oraz różnice w widmach FT-IR i Ramana – mogą stać się podstawą przyszłych badań nad biomarkerami spektralnymi. Praca ma istotną wartość naukową i translacyjną, ale w przyszłości wymaga walidacji klinicznej.
- zastosowanie nowoczesnych i pracochłonnych metod badawczych,
- doskonałą znajomość technik świadczącą o samodzielnym wykonaniu badań.

Stwierdzam, że praca p.t. „Zastosowanie spektroskopii IR i spektroskopii Ramana w poszukiwaniu potencjalnych markerów diagnostycznych i prognostycznych w surowicy i szpiku kostnym pacjentów pediatrycznych z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL)” jest oryginalnym i wartościowym dokonaniem Autorki i spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez „Prawo o szkolnictwie

wyższym i nauce”. Mam zaszczyt i przyjemność przedstawić wniosek o dopuszczenie pracy do publicznej obrony. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom recenzowanej rozprawy oraz dorobek naukowy Autorki, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.