

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Anety Kowal.

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).

Zgodnie z uchwałą Rady Dyscypliny Collegium Medicum Uniwersytetu Rzeszowskiego z dnia 08 lipca 2025 roku w sprawie powołania mnie na recenzenta wyżej wymienionej rozprawy w postępowaniu doktorskim w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne, mam zaszczyt przedstawić poniższą opinię.

Oceniając przedłożoną mi rozprawę na stopień doktora nauk medycznych, dokonam jej charakterystyki w zakresie:

1. Spełnienia ustawowych wymagań rozprawy doktorskiej (oryginalność rozwiązania problemu naukowego),
2. Poziomu wiedzy teoretycznej doktorantki,
3. Umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

1. Wartość celu badawczego

Mgr Aneta Kowal w swojej rozprawie doktorskiej zajęła się niezwykle istotnym problemem poszukiwania wskaźników diagnostycznych i prognostycznych u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL). Do badań wykorzystwała techniki spektroskopii w podczerwieni oraz spektroskopii Ramana jako dwie komplementarne techniki spektroskopii wibracyjnej, dostarczające informacji o składzie i strukturze biochemicznej analizowanych materiałów. Są to szybkie, nieinwazyjne, narzędzia diagnostyczne pozwalające na biochemiczną analizę próbki i śledzenie zmian molekularnych. Analizie poddane mogą zostać zarówno pojedyncze komórki, tkanki jak i płyny ustrojowe tj. ślina, moczu, wydzieliny z dróg

rodnych, popłuczyny oskrzelowe, co stanowi ważną przewagę tych technik obok szybkiego czasu pomiaru, niewielkiej objętości próbki i nieskomplikowanej preparatyki koniecznej do jej przeprowadzenia, nad technikami rutynowo stosowanymi w diagnostyce medycznej. Badania doktorantka prowadziła w grupie chorujących na ALL - najczęstszej chorobie nowotworowej u dzieci. W tym nowotworze wprowadzając innowacyjne narzędzia diagnostyczne i protokoły terapii osiągnięto częstość wyleczeń sięgającą 90%. Na tym etapie, badania nad ALL skupiają się na poszukiwaniu metod diagnostycznych i markerów, które pozwolą na wstępie wykazać z jednej strony, które dzieci wymagają intensyfikacji terapii, aby poprawić liczbę wyleczeń w grupie 10% dzieci opornych na terapię. Z drugiej strony oczekujemy na wskazanie grupy dzieci, u których można bezpiecznie zmniejszyć intensywność nadal bardzo toksycznej terapii. Dlatego mgr Aneta Kowal wybrała do badań narzędzia diagnostyczne rzadko stosowane w onkologii dziecięcej w Polsce, a z którymi Ośrodek Rzeszowski ma długotrwałe doświadczenie. Dodatkowo dla porównania te same metody diagnostyczne zastosowano w grupie nienowotworowych chorób krwi w tym anemii z niedoboru żelaza, leukopenii, pancytopenii i małopłytkowości.

Celami pracy były:

1. Zbadanie różnic molekularnych dla widm FT-IR i widm ramanowskich surowicy dzieci z ALL oraz grupy pacjentów zdrowych i z nienowotworowymi schorzeniami hematologicznymi,
2. Analiza zmian w widmach FT-IR i widmach ramanowskich lizatu komórkowego szpiku kostnego dzieci z ALL i pacjentów z nienowotworowymi zaburzeniami hematologicznymi,
3. Ocena wykorzystania uzyskanych widm FT-IR oraz ramanowskich surowicy i lizatu komórkowego szpiku kostnego dzieci z ALL jako potencjalnego markera diagnostycznego i rokowniczego.

3. Redakcja przedłożonej pracy

Rozprawę stanowi monografia obejmująca 193 strony. Ma zwięzłą strukturę spełniającą wymogi publikacji naukowej, którą rozpoczyna spis treści; następnie typowy układ: wykaz skrótów: str. 6-8; wstęp zawierający 64 pozycje piśmiennictwa: str. 9-21; Cel pracy: str. 23; Materiał i metody: str. 24-30; Wyniki: str. 31-134; Dyskusja zawierająca 151 pozycji piśmiennictwa: str. 135-158; Piśmiennictwo: str. 176-177; Streszczenie pracy doktorskiej: str.

176-177; streszczenie pracy w języku angielskim: str. 178-179; Wykaz rycin: 92 ryciny, str. 180-190; Wykaz tabel: 23 tabele, str. 191-193.

Praca napisana jest poprawnym językiem naukowym i ma staranną szatę graficzną.

2. Poprawność metodyczna

Grupę badawczą stanowiło 91 pacjentów Kliniki Onkohematologii Dziecięcej Klinicznego Szpitala Wojewódzkiego Nr 2 im. św. Jadwigi Królowej w Rzeszowie hospitalizowanych w latach 2016-2024. U 48 spośród tych pacjentów zdiagnozowano (ALL). W pozostałych przypadkach (N=43) obserwowano m.in. niedokrwistość z niedoboru żelaza (N=6), leukopenię (N=16), pancytopenię (N=8) oraz małopłytkowość (N=13). Materiałem badawczym była krew obwodowa i szpik kostny pobierane przy okazji rutynowej diagnostyki hematologicznej. Pacjenci mieli przeprowadzoną diagnostykę hematologiczną i onkologiczną zgodnie ze standardami Polskiego Towarzystwa Onkologii i Hematologii Dziecięcej i zaleceniami dedykowanych protokołów terapeutycznych. Zdrową grupę kontrolną stanowiło 15 pacjentów Działu Diagnostyki Laboratoryjnej w Przeworsku włączonych do badania w ramach realizowanego zadania grantowego pt.

„Opracowanie widm referencyjnych i algorytmu analizy widm spektroskopowych celem implementacji w diagnostyce medycznej” realizowanego między czerwcem i listopadem 2022 r.

Do analiz wykorzystano spektrometr w podczerwieni z transformatą Fouriera (FT-IR) model Vertex 70v firmy Bruker, wyposażony w detektor MCT i jednoodbiciową przystawkę ATR z diamentowym kryształem oraz spektrometr inVia Micro Raman Renishaw współpracujący z mikroskopem Leica DM 2500 M, wykorzystując w czasie pomiaru obiektyw o powiększeniu 50x i laser o długości fali 785 nm jako źródło wzbudzania (Renishaw, Wotton-under-Edge, UK). Wyznaczono pasma charakterystyczne dla widm FT-IR oraz widm ramanowskich oraz odpowiadające im wartości absorpcji i intensywności. Zastosowano liczne metody statystyczne. Uzyskane dane spektralne analizowano z wykorzystaniem testów nieparametrycznych test Shapiro-Wilka, test U Manna-Whitneya, test Anova Kruskala-Walisa oraz wielokrotne porównanie średnich rang dla wszystkich prób (Statistica, Polska). Czułość i specyficzność oraz wartość odcięcia (cut-off) i pole pod krzywą ROC (ang. area under the curve, AUC) dla danych zmiennych wyznaczono na podstawie krzywej charakterystyki operacyjnej odbiornika (ang. receiver operating characteristic curve,

ROC) korzystając z oprogramowania Origin Pro2021 (Massachusetts, USA). Wykorzystano także wielowymiarowe analizy statystyczne tj. analizę głównych składowych oraz hierarchiczną analizę skupień. W badaniu wykorzystano algorytm grupy parowanej. Metodyka badań została opisana w sposób staranny i szczegółowy. Spełnia ona kryteria dobrej praktyki badawczej i laboratoryjnej.

4. Wartość wniosków wynikających z przeprowadzonych analiz.

Mgr Aneta Kowal w oparciu o uzyskane wyniki badań wykazała, że:

1. Spektroskopia w podczerwieni i spektroskopia Ramana wykazują niski potencjał dla identyfikacji konkretnych zmian molekularnych zachodzących w przebiegu ALL u dzieci. Jednak analiza widma FTIR krwi obwodowej ujawniła istotne różnice pomiędzy grupą kontrolną (HC) a pacjentami z zaburzeniami hematologicznymi (HEMC) i ALL (LEUK-PD) dla następujących pasm przy $1398\text{--}1396\text{ cm}^{-1}$, $1309\text{--}1306\text{ cm}^{-1}$, $1239\text{--}1238\text{ cm}^{-1}$, $1170\text{--}1168\text{ cm}^{-1}$ i $1103\text{--}1102\text{ cm}^{-1}$, którym odpowiadają m.in. drgania rozciągające grup $\text{C}=\text{O}$ (białka, kwasy tłuszczowe) i grup PO_2 - kwasów nukleinowych, fosfolipidów i białek fosforylowanych oraz drgania rozciągające grup C-N i zginające w płaszczyźnie NH amidu III (białka). Świadczy to o możliwym wpływie schorzeń związanych ze zmianą składu komórkowego krwi, niezależnie od przyczyny, na skład fizykochemiczny osocza.
2. Struktura drugorzędowa białek nie różniła się istotnie w grupie kontrolnej oraz w grupach HEMC i LEUK-PD. Jedynie udział struktury nieuporządkowanej dla grup LEUK-PD i HEMC-E (pacjenci z niedokrwistością) z minimum przy pozycji $1646\text{--}1644\text{ cm}^{-1}$ wykazał istotną różnicę (AUC=0,89935, cut-off: 19,40%, sens.= 85,71%, spec.=90,90%, $p=0,030408$), a dla struktury alfa-helisy z minimum przy $1661\text{--}1660\text{ cm}^{-1}$ dla różnicowania grup HEMC-W (pacjenci z pancytopenią) i LEUK-PD metryki te przyjmują wartość (cut-off 11,663% AUC=0,77273, sens.= 75%, spec.= 85,71%) ale udział nie różnił się w sposób istotny. Obydwa parametry mogą zostać potencjalnie wykorzystane dla modeli diagnostycznych identyfikujących ALL jako przyczynę anemii lub pancytopenii krwi obwodowej.
3. Analiza białek surowicy dzieci z ALL w spektroskopii FTIR wykazała istotną różnicę w udziale struktury beta-kartki z minimum w zakresie 1630 cm^{-1} pomiędzy grupami wysokiego ryzyka (HR) oraz non-HR ALL. U wszystkich pacjentów z grupy HR (9/9) udział tej struktury wynosił $< 31,9\%$, podczas gdy w grupie non-HR tylko u 9 spośród 39. Metryki potencjalnego testu diagnostycznego różnicującego HR vs non-HR w oparciu o ten parametr to: AUC = 0,85397, sens.=100%, spec. =65,71%.

4. Dla 5 zakresów widma spektroskopii Ramana dla surowicy krwi obwodowej (1658 cm^{-1} , 1449 cm^{-1} , 958 cm^{-1} , 944 cm^{-1} i 900 cm^{-1}) oraz w 1 zakresie widma lizatu komórek szpiku kostnego (1236 cm^{-1}) zaobserwowano różnice w intensywności pików pomiędzy grupą dzieci z pancytopenią w przebiegu ALL oraz pancytopenią z innych przyczyn ($\text{AUC}=0,7556-0,9444$, $\text{sens.}=68,89-86,67\%$, $\text{spec.}=75-100\%$). W przypadku potwierdzenia występowania powyższych różnic w badaniach na większych grupach pacjentów, mogłyby one zostać podstawą dla opracowania testów diagnostycznych opartych na spektroskopii Ramana. Co istotne, większość z tych różnic dotyczy krwi obwodowej, co daje potencjalnie możliwość szybkiej, przesiewowej diagnostyki pancytopenii u dzieci bez konieczności wykonywania badania inwazyjnego, jakim jest biopsja szpiku kostnego.

Doktorantka wskazała, że istotnym ograniczeniem uzyskanych wyników są małe liczebności poszczególnych grup badanych schorzeń, co wpłynęło na niską dokładność klasyfikacji opartych na wielowymiarowych testach statystycznych (PCA, HCA). Dlatego powyższe wnioski powinny zostać zweryfikowane w badaniach na dużych grupach pacjentów. Wyniki zostały przedstawione w sposób bardzo szczegółowy i staranny.

WNIOSEK KOŃCOWY

Cel pracy wynika z przedstawionych danych z piśmiennictwa (w tym opublikowanych przez Ośrodek Rzeszowski), metodyka badań jest nowoczesna i właściwa, a analiza materiału wnikliwa.

Podsumowując przedłożona mi rozprawa na stopień doktora nauk medycznych:

1. Spełnienia ustawowe wymagania rozprawy doktorskiej. Należy podkreślić, że było to pierwsze opublikowane badanie obejmujące zakresem homogeną grupę dzieci i młodzieży z ALL dotyczące możliwości wykorzystania spektroskopii w podczerwieni oraz spektroskopii Ramana w różnicowaniu pacjentów z ALL od pacjentów z innymi zaburzeniami hematologicznymi nienowotworowymi i pacjentów zdrowych.
2. Potwierdza wysoki poziom wiedzy teoretycznej doktorantki. Tak wstęp jak i przeprowadzona dyskusja z wykorzystaniem 172 pozycji aktualnego piśmiennictwa dowodzi głębokiej znajomości przedstawionej wiedzy.

3. Umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Zastosowane i wykorzystane narzędzia badawcze i metody statystyczne są na poziomie prac spełniających kryteria nie tylko rozprawy doktorskiej, a nawet habilitacyjnej.

Biorąc pod uwagę wartość merytoryczną pracy, profil eksperymentalny, wkład pracy, przeprowadzenie wnikliwej dyskusji wyników opartej o najnowsze pozycje piśmienniczywa oraz staranną szatę graficzną, uważam że Rozprawa Doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 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.) w związku z art. 179 ust.1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. - przepisy wprowadzające Ustawę Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 z późn. zm.).

Na tej podstawie zwracam się do Rady Dyscypliny Collegium Medicum Uniwersytetu Rzeszowskiego o dopuszczenie mgr Anety Kowal do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę oryginalność i innowacyjność przeprowadzonych badań oraz duży wkład pracy Doktorantki włożony w opracowanie rozprawy doktorskiej, mam zaszczyt wnioskować o wyróżnienie pracy.

Kraków, 1 październik 2025 r.

Prof. dr hab. n. med. Szymon Skoczeń