

Recenzja
Właściciel o wyjątkowość
Prodziekan
Wydziału Lekarskiego
ds. Nauki
Małgorzata Pawłowska
prof. dr hab. Małgorzata Pawłowska

Profesor Zenon Mariak
Klinika Neurochirurgii
Uniwersytetu Medycznego
W Białymstoku

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr Joanny Bogusiewicz pt. „Analiza lipidomiczna w diagnostyce guzów mózgu”

Od czasu fundamentalnego opracowania Bailey'a i Cushinga z 1926 r. neurochirurdzy dysponują usystematyzowaną wiedzą na temat guzów glejowych mózgu. Umiemy je dzielić na odpowiednie grupy zgodnie z ich histologiczną, histochemiczną - a nawet ostatnio - genetyczną sygnaturą, przypisując poszczególnym rodzajom mniej lub bardziej zdefiniowane cechy biologiczne i kliniczne. Dzięki znakomitemu postępowi badań obrazowych coraz lepiej umiemy rozpoznać rodzaj nowotworu, jego umiejscowienie, a nawet przypuszczalny charakter. Dzięki rozwojowi mikrochirurgii usuwamy te guzy bardziej doszczętnie, nie urażając przy tym zdrowych okolic mózgu. Pacjenci korzystają też z leczenia uzupełniającego w postaci coraz bardziej wyrafinowanej chemio- i radioterapii.

I mając do dyspozycji te wszystkie cudowności nie możemy stwierdzić, że leczymy złośliwe nowotwory mózgu dużo bardziej skutecznie niż czynił to Harvey Cushing. Nieco nawet rozczarowani brakiem przełomu po „kompletnym” rozszyfrowaniu genomu, ostatnio zwracamy się ku innym niż genetyczne kierunkom badań tych nowotworów licząc, że te nowe metody pozwolą nam wreszcie dotrzeć do zjawisk leżących u podstaw ich karcinogenezy. Próbujemy zatem określać i wykorzystać diagnostycznie (a w perspektywie i terapeutycznie) charakterystyczne ich cechy molekularne, wyznaczone przez kompozycję i proporcje różnych obecnych w nich substancji. Takie podejście określa pole do popisu dla nowopowstałych kierunków analizy chemicznej, znanych pod zbiorową nazwą badań „omicznych”. Te zaś z kolei tworzą laboratoryjną podstawę do ułtymatywnie holistycznego podejścia nazywanego „badaniem systemów”. Jednym z działów badań „omicznych” jest lipidomika, która ostatnio zyskała obiecujące narzędzie do pozyskiwania chemicznych bioptatów tkankowych w postaci mikroekstrakcji do fazy stałej z następczą analizą chromatograficzną połączoną ze spektrometrią mas (SPME-LC-MS). I właśnie rozwinięciem tej techniki w celu jej (przyszłościowego na razie)

dostosowania do użytku w rzeczywistej diagnostyce klinicznej guzów mózgu, zajęła się mgr Joanna Bogusiewicz.

Na ten ogólnikowy wstęp do recenzji pozwoliłem sobie, aby podkreślić, że podjęta praca doktorska bezkompromisowo wkracza w aktualny oraz główny nurt światowego wysiłku badawczego, dążącego do rozwikłania w końcu tajemnicy jednej z dotychczas „niepokonanych” grup nowotworów - tych rodzących się w mózgu. Chciałbym też podkreślić skalę wyzwania, jakim jest próba zidentyfikowania (na razie tylko uproszczonego - do celów diagnostycznych), takich kompleksów molekularnych, które oddawałyby naturę danego rodzaju nowotworu mózgu. Bo chociaż armamentarium badawcze, którym dysponuje doktorantka jest na światowym poziomie technologicznym i metodologicznym, a laikowi wydaje się wręcz kosmicznie wyrafinowane, to jednak i tak prawdopodobnie wciąż pozostaje w dysproporcji do rzeczywistej skali skomplikowania procesów przebiegających w chorobie nowotworowej mózgu. Dlatego uprzedzając tezę opinii stwierdzam, że uzyskane w tej pracy wyniki należy cenić naprawdę wysoko.

Oprócz aktualności i wagi podjętych badań należy dostrzec też ich interdyscyplinarny charakter, bez którego to waloru uzyskanie jakichkolwiek sensorycznych wyników w badaniach nowotworów mózgu byłoby po prostu niemożliwe. Nie ulega dla mnie przy tym wątpliwości, że tak ambitne zadanie mogłoby zostać podjęte jedynie przez placówki stojące na bardzo wysokim poziomie merytorycznym. W pracy tej skutecznie spotkały się bowiem dwa plany i dwa oczekiwania. Ze strony klinicysty – neurochirurga było to oczekiwanie prostej w zastosowaniu, szybkiej, trafnej i możliwie minimalnie urażnej (miejmy nadzieję, że w przyszłości również stosunkowo niedrogiej) metody rozpoznania rodzaju usuwanego guza mózgu. Natomiast od strony poznawczej byłaby to próba uchwycenia charakterystycznych cech metabolicznych, składających się na ów „system” jakim w tym wypadku jest nowotwór mózgu.

Swój cykl badań stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej rozpoczyna autorka od dość skromnie zakrojonej próby przekonania się, czy możliwe byłoby zastosowanie metody ekstrakcji do fazy stałej w celu uzyskania wiarygodnego profilu lipidów obecnych w usuniętym guzie mózgu. Metoda ta była wcześniej już testowana w badaniach metabolomicznych guzów mózgu, ale dotychczas nikt nie wykonał z jej użyciem przekrojowego badania lipidomicznego. Problem do rozwiązania był natury zarówno technicznej, jak i biologicznej: mianowicie czy pokryta sorbentem powierzchnia drucika o zaledwie dwustumikronowej grubości będzie w ogóle w stanie przyjąć i oddać do dalszego procedowania rzeczywisty, t.j. reprezentatywny dla danego typu guza zestaw związków lipidowych. Tym bardziej, że guzy glejowe mózgu potrafią być niezwykle heterogenne w swojej budowie, co nawet znalazło odbicie w nazwie „glejaka wielopostaciowego”.

Obawy okazały się zbędne: każdy z wycinków guza został nakłuty trzy razy na głębokość 7 mm i okazało się, że kiedy poziomy stężen poszczególnych lipidów rzuci się w przestrzeń wielowymiarową, to wariacje wielu z nich układają się we wzory odpowiadające po pierwsze – rodzajowi guza (glejak – oponiak), a po drugie – każdemu z czterech przebadanych w ten sposób glejaków indywidualnie. Po odpowiedniej redukcji wymiarów pola wokół centroidów odpowiadających oponiakom i glejakom w ogóle na siebie nie zachodziły, co pokazuje doskonałą wartość dyskryminacji dwóch odmiennych rodzajów guza mózgu za pomocą biopsji z absorpcją do fazy stałej. Natomiast wyniki pozyskane z jednego wycinka guza wykazywały wysoki stopień korelacji pomiędzy sobą, co wskazuje na dobrą powtarzalność metody.

Komentując te wyniki: oczywiście, słuszny jest wniosek autorki, że zastosowany sposób biopsji daje „technicznie” wyniki reprezentatywne dla danej próbki guza. Niemniej jednak patrząc na rycinę 1 można zauważyć, że badany wycinek ma rozmiary niewielkie i zapewne został przez chirurga pobrany z „reprezentatywnej” okolicy glejaka wielopostaciowego. Jednak guz obecny w mózgu potrafi być nie tylko rozległy, ale bardzo miejscowo różnorodny: ma obszary intensywnego rozrostu, ale i niedokrwienia, czy wręcz martwicy, jest też różnorodny genetycznie na skutek niezwykle intensywnych mutacji miejscowych. Dlatego przed badaczami jeszcze zapewne długa droga do rzeczywiście wiarygodnej „biopsji cienkoigłowej” metodą absorpcji do fazy stałej i analizy chromatograficznej ze spektrometrią mas.

Ale chociaż to dopiero początek, to zadziwiające jest uzyskanie za pomocą tej metody całkowicie rozsądnej dyskryminacji pomiędzy glejakami o różnym statusie mutacji genu dehydrogenazy izocytrynianowej, a jednocześnie jednak dużo już bardziej „rozmytej” pomiędzy glejakami niskiego i wysokiego stopnia złośliwości. O ile można już wnioskować na tym etapie badań, to wydaje mi się, że ten wynik daje dobry prognostyk praktycznego zastosowania metody w diagnostyce glejaków. Wszak status genu IDH jest jednym z „kamieni węgielnych” nowej, aktualnej klasyfikacji WHO tych guzów, która przecież lepiej odzwierciedla ich rzeczywistą naturę biologiczną, niż budowa histologiczna, będąca podstawą „starej” klasyfikacji do czterech klas złośliwości. Dlatego mniej ostra dyskryminacja pomiędzy klasami złośliwości niż pomiędzy dwoma statusami IDH nie powinna dziwić, bo same te „klasy” nie są dobrze pomiędzy sobą rozgraniczone rzeczywistą biologią guza. Ten wynik więc wydaje się dobrze rokować w kwestii siły diagnostycznej proponowanej metody. Z kolei nieco zaskakujący może być brak silnej dyskryminacji pomiędzy guzami o różnym statusie delekcji 1p-19q, zważywszy, że status ten wiarygodnie rozgranicza dwa zasadniczo różne typy glejaków: astrocytomaty od oligodendrogliomów.

Co do tego opracowania, to miałbym tylko małe formalne zastrzeżenie, ale wyłącznie do jednego z wniosków, podanego w polskojęzycznym elaboracie, a nie w publikacji. Nie sądzę

mianowicie, aby uzyskane wyniki dawały podstawę do stwierdzenia, że cyt. „*wykorzystana platforma analityczna umożliwiła ekstrakcję fosfolipidów i sfingolipidów, które to odpowiadają za różnicowanie glejaków w zależności od stopnia złośliwości i obecności mutacji IDH*”. Pomijając już zasadę ogólną, że nie należy wnioskować o przyczynowości bazując tylko na podstawie wykazanych związków statystycznych (korelacja, powiązanie, etc), to stwierdzenie, że właśnie taki, a nie inny lipidom sprawia (tak należy rozumieć, skoro odpowiada za zróżnicowanie ?), że glejak należy do tej, a nie innej klasy, wymagałoby uzasadnienia merytorycznego. Równie dobrze, a nawet bardziej prawdopodobnie, mógłby być skutkiem, lub nawet skutkiem ubocznym przynależności danego guza do klasy określonej bardziej podstawowymi cechami jego biologii, n.p. zestawem mutacji genowych.

Kolejne sprawozdanie z badań nad profilem lipidowym glejaków opublikowano w czasopiśmie „Molecules”. Opracowanie to obejmowało próbę swojego rodzaju uszczegółowienia tegoż profilu poprzez skupienie się na grupie związków stanowiących rozmaite formy i pochodne karnityny. Chodziło o to, czy za pomocą metody ekstrakcji do fazy stałej oraz spektrometrii mas udało się potwierdzić znany już fenomen zwiększonej obecności karnityny w guzach o większym stopniu złośliwości, w porównaniu do nowotworów mniej złośliwych. Ten wzrost jest oczywiście związany z większym „głodem energetycznym” guzów bardziej złośliwych, które jak wiemy, trawią i zmieniają w energię wszystko co tylko się da spalić, niszcząc przy okazji okoliczne tkanki, a w końcu i swoje komórki, które ulegają martwicy. A dopóki tylko mogą, to obficie korzystają z „naturalnego” źródła energii jakim są wolne kwasy tłuszczowe. Te z kolei, aby zostać utlenione, muszą zostać wprowadzone do mitochondriów, co może się odbyć tylko przy udziale mechanizmu opartego o przemianę karnityny do acylokarnityny. Stąd właśnie zwiększona obecność tejże karnityny i jej metabolitów właśnie w guzach złośliwych.

Efekt ten jak najbardziej udało się potwierdzić za pomocą biopsji guza metodą ekstrakcji do fazy stałej. Jest to wynik o znacznym potencjale praktycznego zastosowania w diagnostyce klinicznej, ponieważ stwarza perspektywy orzekania w trybie przyśpieszonym, a w przyszłości nawet może natychmiastowym, o stopniu złośliwości usuwanego, lub tylko poddawanego biopsji glejaka. Co zresztą szczególnie godne uwagi to fakt, że wartości pod krzywą pików odpowiadających poszczególnym formom karnityny zdecydowanie i istotnie statystycznie różniły się pomiędzy guzami posiadającymi różny status mutacji genu dehydrogenazy izocytrynianowej (IDH-mutant vs IDH wild type). Obok więc wyżej wzmiankowanego „profilu lipidowego”, udało się doktorantce w sposób bardzo pomysłowy zidentyfikować jeszcze inny, alternatywny punkt uchwytu dla przyszłościowej diagnostyki molekularnej glejaków mózgu za pomocą biopsji SPME-LC-MS.

Kolejnym kierunkiem badań ujętym w pracy doktorskiej była próba wykonania chemicznej biopsji mózgu *in vivo*, oczywiście znowu z wykorzystaniem technologii SPME-LC-MS. Oczywiście, sama idea tego rodzaju biochemicznej diagnostyki mózgu jest znana, a nawet prawie rutynowo stosowana w intensywnym nadzorze w postaci mikrodiializy. Jednak ta jest niezbyt stosowna w odniesieniu do lipidomu mózgu, jak też do badań mających na celu pozyskanie chemicznej reprezentacji poszczególnych struktur tego narządu.. Jest ponadto bardziej kłopotliwa w wykonaniu ze względu na konieczność utrzymania przepływu płynu przez sondę, lub nawet dwie sondy, gdybyśmy planowali jednocześnie pozyskiwać materiał z kory mózgu i z istoty białej. Alternatywnie należałoby wówczas sondę mikrodializacyjną zagłębiać stopniowo w kolejne struktury, co mogłoby powodować nieakceptowalne dla chirurga wydłużenie procedury.

Zresztą, proste wydawałoby się w założeniu, umieszczenie mikrosondy SPME w obu badanych strukturach również wymagało rozwiązania szeregu problemów metodologicznych, a nawet czysto technicznych. Skutecznej biopsji udało się dokonać w czasie „rutynowej” biopsji stereotaktycznej bez nadmiernego przedłużenia, ani też skomplikowania całości procedury. Całość przedsięwzięcia została opisana w publikacji zamieszczonej w prestiżowym czasopiśmie *Scientific Reports* i zakończona wnioskiem o pozytywnych perspektywach na zastosowanie tej metody w codziennej, a nawet „przyłóżkowej” diagnostyce klinicznej. Choć praca miała charakter głównie opracowania metodologicznego, to przyniosła również nieco zaskakujący wynik merytoryczny, wskazujący na brak istotnych różnic w profilu lipidowym pomiędzy istotą białą i szarą mózgu.

Oceniając całościowo, przedłożona do oceny rozprawa doktorska składa się z trzech publikacji, zamieszczonych w prestiżowych czasopismach o wysokim współczynniku wpływu: *Molecules*, *Scientific Reports* oraz *International Journal of Molecular Sciences*, wszystkie z pierwszym autorstwem Doktorantki. Została ponadto poprzedzona krótkim, ale treściwym i zrozumiałe zredagowanym wprowadzeniem do tematyki nowotworów mózgu i samej metodologii SPME-MS, jak też polskojęzycznym streszczeniem wyników zawartych w każdej z trzech publikacji. Już sam fakt zamieszczenia publikacji w tak wysoko notowanych czasopismach dają rękojmię nowoczesności koncepcji, aktualności podjętej tematyki badawczej, technicznego zaawansowania użytych metod, nienagannego wykonania planu badań, jak i merytorycznego ugruntowania uzyskanych wyników. Aby jeszcze upewnić odbiorcę dzieła o braku jakichkolwiek słabych punktów opracowania, dodatkowo udostępniła autorka zestawy „surowych” danych - przed ich statystycznym przekształceniem.

Co oczywiste, w całej rozciągłości podzielam taką wysoką ocenę całości pracy i jako neurochirurg mogę tylko dodać, że tak chwalebnie rozpoczęte przystosowanie technologii SPME

do diagnostyki mózgu i jego nowotworów ma przed sobą ogromne perspektywy zastosowania w praktyce klinicznej. Z całą pewnością prace Pani Joanny Bogusiewicz, wykonane pod kierunkiem Profesor Barbary Bojko będą już w niedalekiej przyszłości licznie cytowane jako te, które dały metodologiczną podwalinę zupełnie nowego kierunku diagnostyki neurochirurgicznej.


Chciałbym jednak też zauważyć, że swoimi opracowaniami Doktorantka wraz z zespołem wkracza również w tę nową dziedzinę biologii, jaką są badania „systemowe”. Wiele się po nich dzisiaj spodziewamy, jako po podejściu bardziej kompleksowym do złożonych i zazębiających się nawzajem procesów stanowiących o istocie życia i o jego wynaturzeniach, jakimi są m.in. nowotwory. Co oczywiste, jest to zadanie niezwykle ambitne, zależne od wielu czynników (jak chociażby adekwatny rozwój informatyki), i dlatego dzisiaj jeszcze dalekie od sukcesu. Możemy bowiem zasadnie podejrzewać, że nawet gdy rozszyfrujemy wszystkie z osobna odchylenia genetyczne i poznamy wszystkie możliwe zaburzenia szlaków metabolicznych, to i tak wredna istota złośliwych nowotworów mózgu pozostanie nadal ulotna, zmienna i nieuchwytna. A wszystko dlatego, że ucieka jeszcze o poziom poznawczy głębiej, a mianowicie w sferę relacji. Tak jak w materii nieożywionej każda cząstka elementarna jest tylko i wyłącznie wypadkową relacji z wszystkimi pozostałymi cząstkami w całym wszechświecie, tak i w glejaku mózgu jego powstanie, stan aktualny i dalszy rozwój są wyznaczone wzajemną i wysoce w czasie zmienną relacją wszystkich chwilowych stanów metabolicznych i ich genetycznych determinantów. Jeżeli jednak kiedykolwiek uda się nam te dynamiczne relacje opanować, to już niewielki tylko krok zostanie do poznania samej najgłębszej istoty życia, która przypuszczalnie też opiera się na tej samej zasadzie relatywności. Ale chodzi właśnie o tę niewielką różnicę: żebyśmy umieli ją wyznaczyć i byli w stanie tak ingerować, aby nie zniszczyć życia zdrowego mózgu, a doprowadzić do zaniku nowotworu, lub (co najlepiej!) zapobiec jego powstaniu.

Wprawdzie to nie habilitacja, przy której ocenia się całość dorobku naukowego, ale nie można w podsumowaniu recenzji pominąć ogromnego już dorobku mgr Bogusiewicz, wyrażającego się liczbą 14 publikacji o łącznym IF ponad 60 i kilkadziesiątoma wygłoszonymi referatami na konferencjach naukowych. Zresztą, również miałem okazję wysłuchać kilku tych doniesień na konferencjach neurochirurgicznych, więc mogę osobiście poświadczyć ogromną kompetencję Doktorantki w dziedzinie, którą się zajmuje.

Ogólnie oceniam pracę jako stojącą na wybitnie wysokim poziomie: bardzo ambitną i niezwykle aktualną, wysoce oryginalną, zdecydowanie profesjonalnie zaprojektowaną i wykonaną, a przy tym już opublikowaną w bardzo wysoko notowanych czasopismach naukowych. Stwierdzam, że praca doktorska Pani Joanny Bogusiewicz odpowiada wymogom, stawianym pracom na stopień doktora nauk medycznych i wnoszę do Rady Dyscypliny „Nauki

Medyczne” Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy wniosek o dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Co jest w przypadku tak wysoko ocenianego opracowania oczywiste, zgłaszam też wniosek o jego wyróżnienie stosowną nagrodą i dodaję przy tym, że byłoby ogromną niesprawiedliwością, gdyby Autorka miała takiej nagrody nie otrzymać.

Białystok, 22 05 2023 r.


Prof. dr hab. Zenon Mariak