

prof. zw. dr hab. n. wet. Tadeusz Stefaniak

Wrocław 28.10.2019

Katedra Immunologii, Patofizjologii i Prewencji Weterynaryjnej

Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Agaty Marii Kokocińskiej-Kusiak

pt.: „**Identyfikacja zapachowych biomarkerów czerniaka w moczu myszy,
z zastosowaniem metod behawioralnych i analitycznych**”

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Tadeusza Jezierskiego w Zakładzie Zachowania się Zwierząt Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu.

Przesłanką do podjętych badań są odkrycia z ostatnich lat wskazujące, że niektóre nowotwory złośliwe powodują powstawanie i wydzielanie specyficznych substancji zapachowych, które mogą być identyfikowane węchowo przez zwierzęta już we wczesnych stadiach rozwoju procesu nowotworowego. Wiadomo także, że właśnie jak najwcześniejsze wykrycie nowotworu złośliwego daje największą szansę na całkowite usunięcie pierwotnej lokalizacji komórek zmienionych nowotworowo, co w większości przypadków pozwala na całkowity powrót pacjenta do zdrowia. Poszukiwanie metod wczesnej diagnostyki nowotworów takich jak czerniak, cechujących się szybkim rozwojem i powstawaniem przerzutów, jest więc wysoce uzasadnione. W omawianej pracy Autorka postanowiła spróbować wyjaśnić, jakie lotne związki organiczne i w którym stadium rozwoju nowotworu pojawiają się w moczu myszy i czy są wyczuwalne przez zmysł węchu zwierząt makrosmatycznych (myszy) oraz człowieka. Z dużym zainteresowaniem przeczytałem więc pracę podejmującą takie wyzwania.

Praca ma charakter interdyscyplinarny, ponieważ na modelu myszy przeprowadzono poszukiwanie metod pozwalających na wykrywanie osobników z eksperymentalnie wywołanym czerniakiem, na podstawie węchowej analizy moczu tych osobników i porównano je z metodami analizy laboratoryjnej lotnych związków organicznych w moczu od tych samych zwierząt. Dodatkowym elementem rozprawy jest ocena zdolności węchowych ludzi w wykrywaniu obecności czerniaka u myszy na podstawie oceny zapachowej ich moczu.

W liczącym 10 stron maszynopisu wstępie pracy Autorka przedstawiła aktualny stan wiedzy nt. pochodzenia uwalnianych przez zdrowy i chory organizm związków zapachowych. Zwróciła uwagę na wzrost zainteresowania analizą zapachu w kontekście

poszukiwania objawów choroby nowotworowej, gdzie obok metod chemiczno-analitycznych rosnącą uwagę przyciąga możliwość wykorzystania psów szkolonych do wykrywania określonych typów nowotworów. W tym zakresie Zespół kierowany przez promotora, prof. dr hab. Tadeusza Jezierskiego wnosi swój znaczący wkład. Ważną przesłanką do podjęcia badań porównawczych są liczne publikacje z ostatnich lat, m.in. z zastosowaniem GC-MS, które potwierdziły obecność ponad 100 różnych lotnych związków organicznych (LZO) pojawiających się m.in. w wydychanym powietrzu, które mogą być związane z procesem powstawania nowotworu.

Bardzo ciekawie przeprowadzona narracja opisująca obecny stan wiedzy nt. węchowego wykrywania nowotworów wskazuje, że u podłoża zdolności zwierząt do rozróżniania zapachu osobników zdrowych i cierpiących z powodu procesu nowotworowego może leżeć biologicznie uzasadniona tendencja do unikania jako partnerów osobników chorych, lub obarczonych genetycznie uwarunkowaną skłonnością do chorób. Zwrócono też uwagę, że pojawianie się zapachów towarzyszących chorobie może być następstwem procesów patologicznych obejmujących wytwarzanie nowych lotnych związków organicznych, nie występujących u osobników zdrowych lub zmiany w proporcji poszczególnych LZO, lub metabolitów pośrednich, zmian w zakresie MHC, w ich powstawaniu mogą też brać udział bakterie skórne. Istnieje szereg wątpliwości i sprzecznych opinii nt. ich pochodzenia w chorobach nowotworowych. Te substancje zapachowe mogą być wydalane z wydychanym powietrzem, moczem, potem, śliną, wydzieliną pochwową lub kałem.

Autorka zwróciła uwagę na rosnące znaczenie czerniaka i wysoką śmiertelność jaką powoduje. Opisała dotychczasowe odkrycia dotyczące charakteru substancji zapachowych wykorzystywanych we wczesnej diagnostyce tego nowotworu. Uznała na podstawie umiejętnie dobranej przeglądu literatury, że ten nowotwór może służyć jako model do badań rozwijających diagnostykę olfaktoryczną. Zwróciła uwagę na możliwość wykorzystania zwierząt do wykrywania charakterystycznych zmian zapachowych u chorych cierpiących na czerniaka. Opisała aktualny stan wiedzy nt. możliwości użycia zwierząt makrosomatycznych, jak psów, a także na potencjalne możliwości wykorzystania gryzoni. Zwróciła też uwagę na zdolność niektórych ludzi do rozróżniania zapachu moczu od myszy zdrowych i z czerniakiem.

Celem rozprawy doktorskiej mgr Kokocińskiej-Kusiak było zbadanie, czy myszy szczepu C57B1/6J są zdolne do rozróżniania zapachu moczu myszy w eksperymentalnie wywołanej wczesnej fazie rozwoju czerniaka linii B16F0 i w zaawansowanej fazie rozwoju tego nowotworu od moczu myszy zdrowych tego samego szczepu. Te wyniki miały zostać zweryfikowane przez analizy chemiczne próbek moczu myszy z wykorzystaniem

chromatografii gazowej ze spektrometrią mas. Dodatkowym celem rozprawy była ocena, czy człowiek, jako gatunek mikrosomatyczny jest w stanie różnicować w/w trzy grupy myszy na podstawie zmian zapachu moczu.

Aby osiągnąć powyższe cele zostały wykonane doświadczenia behawioralne na myszach i ludziach, a także odpowiednie analizy laboratoryjne mające potwierdzić lub wykluczyć prawdziwość założeń badawczych. Zostały one szczegółowo opisane w liczącym 21 stron rozdziale „Materiał i metodyka badań”. Na przeprowadzenie badań uzyskano odpowiednią zgodę Lokalnej Komisji Etycznej, a uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej.

Fazy rozwoju eksperymentalnie indukowanych guzów czerniaka zostały sklasyfikowane w skali wg Breslow i mocz myszy pobrano w początkowej (1) fazie rozwoju, w 2-3 dniu po iniekcji komórek nowotworowych w podszwę prawej kończyny miedniczej oraz między 15-20 dniem po inokulacji komórek nowotworowych (3-5 stadium rozwoju guza). Za kontrolę ujemną uznano próbki moczu zdrowych myszy, którym podano w iniekcji PBS. Warto w tym miejscu podkreślić, że wykonanie pobrania próbek moczu i przechowanie ich do momentu podjęcia badań olfaktorycznych u myszy i ludzi, a także do analiz składu chemicznego tych próbek od osobników z odpowiednich grup wymagało dużej skrupulatności i precyzji.

U myszy badano zdolność do spontanicznej preferencji zapachu w testach prowadzonych w polu otwartym oraz w labiryncie Y. W następnym etapie prowadzono trening myszy do rozróżniania zapachu nowotworu w 1 i 3-5 stadium rozwoju.

Metodyka badania wyboru myszy w polu otwartym a także wyboru jednej lub dwóch ścieżek zapachowych w labiryncie Y oraz karania w labiryncie Y wydaje się przeprowadzona prawidłowo. Pewne wątpliwości budzi jednak interpretacja sposobu nagradzania myszy wybierających drogę do moczu myszy z czerniakiem w labiryncie Y. Zastanawiam się, czy umieszczenie smakołyku w bezpośredniej bliskości pożądaney próbki moczu samo w sobie nie powodowało preferencji myszy w podejmowaniu decyzji o wyborze korytarza. Dopiero w ostatniej fazie treningu nagroda lub kara następowały dopiero po dokonaniu przez myszy albo wyboru próbki moczu od myszy z czerniakiem, albo moczu myszy zdrowych.

Ważnym elementem oceny skuteczności treningu myszy była testy przeprowadzone na myszach wcześniej trenowanych, w których sprawdzono zdolność myszy do identyfikacji moczu od myszy we wczesnym lub zaawansowanym stadium czerniaka w labiryncie Y, w których nagroda pojawiała się po wyborze odpowiedniej próbki.

Badania zdolności ludzi do wykrywania zapachu moczu myszy z czerniakiem przeprowadzono na 20 ochotnikach obu płci, i najpierw zadaniem osób było rozróżnianie

kilku różnych zapachów, a następnie po sprawdzeniu zapachu moczu myszy z czerniakiem ochotnicy mieli za zadanie identyfikację próbek moczu myszy z czerniakiem.

Analizy chemiczne obecności lotnych związków organicznych (LZO) w próbkach moczu w celu wykrycia zróżnicowania ich obecności w moczu myszy zdrowych, a także we wczesnej i zaawansowanej fazie rozwoju czerniaka wykonano w Pracowni Peptydów Zakładu Chemii Organicznej i Technologii Chemicznej, Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Analizy wykonano z wykorzystaniem chromatografii gazowej i spektrometrii mas (GC-MS). Identyfikowano piki chromatograficzne obecne tylko u myszy z czerniakiem, a także takie, których wielkość była znacznie wyższa lub niższa u myszy z czerniakiem w porównaniu do moczu zdrowych myszy. Zaproszenie do współpracy uczonych z innej jednostki naukowej wskazuje na umiejętność Doktorantki i Jej Promotora do nawiązywania współpracy i namówienia członków innego zespołu naukowego do podjęcia badań uzupełniających główny kierunek badań.

Wyniki badań zostały przejrzysto przedstawione na 20 stronach tekstu bogato ilustrowanego wykresami zawierającymi także wartości odchylenia standardowego i informację o statystycznej istotności (lub braku) różnic, a w części dotyczącej chemicznej identyfikacji LZO użyto też rozbudowanych tabel dokumentujących wyniki dotyczące licznych LZO.

W testach spontanicznej preferencji zarówno w polu otwartym, jak i w labiryncie Y nie stwierdzono istotnych różnic w rozpoznawaniu moczu myszy z czerniakiem i zdrowych. Występowały też różnice zależne od płci i kolejności powtórzeń prób stwierdzających preferencję spontanicznego wyboru próbek moczu od myszy zdrowych lub z czerniakiem w czasie latencji podczas testów. Z kolei po kolejnych fazach treningu wykrywanie próbek moczu myszy z czerniakiem różniło się wysoce istotnie statystycznie od moczu myszy zdrowych. Okazało się, że myszy po treningu prawie dwukrotnie częściej (względne ryzyko) wskazywały próbki od osobników z czerniakiem w porównaniu do próbek od osobników przed treningiem, a prawdopodobieństwo wskazania zapachu charakterystycznego dla moczu myszy z nowotworem było znacznie większe niż przez przypadek.

Mam tutaj uwagę, w drugim akapicie na stronie „...*prawdopodobieństwo wskazania zapachu raka po treningu było znacznie większe niż przez przypadek (Rys.16. $P < 0,001$).*” Chcę zwrócić uwagę, że czerniak nie jest rakiem, bardziej stosowne byłoby nazwanie go nowotworem, użyto też dużego skrótu myślowego, bo wytrenowane myszy wykrywały przecież charakterystyczny zapach moczu pochodzącego od myszy z czerniakiem. Ciekawą różnicą między płciami okazało się to, że samce wykazywały wydłużony czas latencji przy

podejściu do próbek moczu myszy z czerniakiem w początkowej, a samice w końcowej fazie treningu.

Badanie zdolności ludzi do wykrywania moczu myszy z czerniakiem w teście Odor Discrimination/Memory Test wykazały znaczne zróżnicowanie indywidualne i brak statystycznie istotnych różnic między płciami w tym zakresie.

W analizach chromatograficznych wykazano m.in., że kilkakrotnie niższa, niż u zdrowych osobników zawartość n-heksanu w moczu pozwala przyjąć spadek tego parametru jako charakterystyczny dla myszy z czerniakiem. Warto byłoby jednak sprawdzić, czy nie dochodzi do takich zmian w procesach nowotworowych innego rodzaju lub w stanach zapalnych. Uważam, że sposób przedstawienia wielu różnych parametrów w formie liniowej (ryciny 17-19) jest złym pomysłem, niesłusznie sugerującym dynamiczne powiązania między różnymi metabolitami. Odpowiednie byłoby przedstawienie tych wyników na wykresie słupkowym.

W komórkach czerniaka użytych do inokulacji wykryto 19 lotnych związków organicznych, podczas gdy w próbkach moczu było ich 88. Tylko część z nich wykazywała różnice w stężeniu między moczem myszy zdrowych i chorych, na 6 związków, które wykazywały znaczące różnice stężenia w zależności od stanu zdrowia myszy zwrócono szczególną uwagę. Zarówno u myszy krótko po inokulacji komórek czerniaka, jak i w zaawansowanym stadium jego rozwoju pojawiał się aceton, a nie wykrywano go w moczu osobników zdrowych. Wydaje się jednak, że jego obecność może wynikać z negatywnego bilansu energii u zwierząt z procesem nowotworowym, czyli niekoniecznie będzie to parametr swoisty dla diagnostyki czerniaka. Krótko po inokulacji pojawiał się też 1-metyl-6,7-dioksabicyklo[3.2.1.]oktan, ale zanikał w późniejszym stadium rozwoju guza. Nieco mniej atrakcyjny wydaje się wzrost stężenia nitrometanu, które wzrastało wprost proporcjonalnie do rozwoju guza.

Metodą chromatografii potwierdzono bardzo spektakularne różnice polegające na spadku stężenia w moczu myszy z wczesnym lub zaawansowanym stadium czerniaka w porównaniu do myszy zdrowych wykazały dwa związki (chlorek metylenu i n-heksan). Dla n-heksanu udało się zaproponować wartości graniczne, które w badanym materiale wskazywały na to, że mocz pochodził od osobnika zdrowego, jeśli pole powierzchni pików dla tego związku przekraczało 9 000 000, a także gdy zmniejszało się poniżej 3 500 000 ze 100% pewnością można było stwierdzić, że osobnik od którego pobrano mocz jest w przedklinicznym stadium czerniaka.

W ciekawie prowadzonej Dyskusji Autorka omówiła uzyskane wyniki odnosząc się do danych literaturowych, które wskazują, że tematyka doświadczenia jest dość rzadko podejmowana na innych modelach nowotworów. Podkreśliła m.in., że spodziewane unikanie

zapachu wydzielanego przez zwierzęta chore przez osobniki zdrowe nie znalazło potwierdzenia w analizowanym przypadku czerniaka u myszy. Zaproponowała też wyjaśnienie, że ponieważ że mocz pochodził od samców (o czym zdecydowano aby uniknąć wpływu zmian hormonalnych związanych z cyklem płciowym samic), samce eksplorujące labirynt uznawały, że jest to nowy zapach potencjalnego konkurenta, dlatego „bezpieczniejszy” był wybór chorego osobnika, który zapewne będzie słabszym konkurentem niż osobnik zdrowy.

Cennym elementem rozprawy było przeprowadzenie badań nad zdolnością do odróżniania na podstawie zapachu moczu od myszy zdrowych i z czerniakiem przez człowieka. Co prawda stwierdzono znaczne zróżnicowanie tych zdolności, ale przynajmniej niektóre kobiety okazały się bezbłędne w wykrywaniu zwierząt chorych. Są to pionierskie odkrycia, które zasługują na kontynuację i być może wykorzystanie w praktyce wczesnej diagnostyki tego nowotworu u ludzi.

Omawiając wyniki analiz chromatograficznych Autorka wskazała, jako pierwsza, że markerem zapachowym rozwoju czerniaka, może być zmniejszająca się zawartość n-heksanu i chlorku metylenu w moczu. Powodem odmiennego zapachu moczu myszy z czerniakiem, w tym w bardzo wczesnych stadiach, może być również pojawienie się acetonu, 1-metyl-6,7-dioksabicyklo[3.2.1.]oktanu oraz nitrometanu, a także brak octanu etylu, cyklopentanu metylu oraz cykloheksanu, które są charakterystyczne dla osobników zdrowych. Autorka zgadza się z danymi literaturowymi, w których obniżanie się zawartości niektórych LZO w trakcie choroby nowotworowej może być związane z oddziaływaniem guza nowotworowego na metabolizm organizmu i odwrotnie pojawianie się LZO u zwierząt chorych a nieobecnych u osobników zdrowych może być jest efektem syntezy przez komórki guza, lub powstawania jako produktów jego rozpadu. Wykryte przez Autorkę charakterystyczne dla czerniaka LZO różniły się zarówno składem, jak i tendencjami zmian od proponowanych przez inne zespoły prowadzące podobne badania u zwierząt i ludzi.

Badania Autorki wykazały też, że chromatograficzna analiza zmian stężenia pojedynczych LZO obecnych w moczu może być wystarczająca dla potwierdzenia/wykluczenia procesu rozwoju czerniaka, co jest pewną nowością na tle danych literaturowych poszukujących raczej kompleksowych sposobów diagnozowania opartych na jednoczesnej analizie wielu parametrów.

Cztery Wnioski sformułowane przez Autorkę można uznać za trafne, potwierdzają możliwość wytrenowania myszy do wykrywania na podstawie zapachu moczu osobników z rozwijającymi się komórkami czerniaka, potwierdzają zdolność niektórych ludzi do podobnej identyfikacji. Podkreślają, że właśnie możliwość wczesnego rozpoznania obecności czerniaka (po 2-3 dniach od doświadczalnej inokulacji) pozwala mieć nadzieję na rozwinięcie wczesnej

diagnostyki tego nowotworu. Jedyne ostatni wniosek wydaje mi się nieco zbyt śmiały, ponieważ brak danych, jak wyselekcjonowane w chromatografii LZO zachowują się w innych procesach nowotworowych i patologiach nienowotworowych. Z pewnością dotychczasowe wyniki zasługują jednak na kontynuację i dalsze wyjaśnianie powstających wątpliwości.

Autorka recenzowanej rozprawy doktorskiej wykazała się umiejętnością sprecyzowania założeń badawczych, dobrania warsztatu badawczego, pozwalającego na wielostronną analizę i weryfikację tez badawczych. Na podstawie uzyskanych wyników doszła do ciekawych wniosków, które umiejętnie uzasadniła. Mam nadzieję, że wyniki uzyskane dzięki interdyscyplinarnej analizie zostaną wkrótce opublikowane w renomowanym czasopiśmie. Stanowią ważny przyczynek w doskonaleniu metod wczesnej diagnostyki czerniaka, jednego z nowotworów najtrudniejszych w zapobieganiu i leczeniu.

W związku z powyższym, powołując się na art.179 ust 1. ustawy Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1669) stwierdzam, że przedłożona rozprawa doktorska spełnia wymogi określone artykułem 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki.

