

Lublin, 29.12.2019 r.

Dr hab. Iwona Janczarek prof. uczelni  
Katedra Hodowli i Użytkowania Koni  
Wydział Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

#### OCENA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Agaty Marii Kokocińskiej-Kusiak

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

wykonana na zlecenie Rady Naukowej Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu z dn. 03.12.2019 r.

Wszelkie badania służące metodom diagnostycznym i terapeutycznym w onkologii należy uznać za szczególnie ważne. Choroby nowotworowe zaliczane są do tzw. chorób cywilizacyjnych, które w coraz większym stopniu dotyczą zarówno ludzi jak i zwierząt. Niestety, mimo poszukiwania coraz bardziej innowacyjnych metod ich wykrywania i leczenia, mogą nadal kończyć się nawrotem lub śmiercią. Rokowanie jest tym korzystniejsze, im rozpoznanie jest wcześniejsze. Potrzebna jest zatem jak najlepsza diagnostyka. Niestety, dotychczasowe metody rozpoznawania nowotworów złośliwych we wstępnych stadiach rozwojowych są ciągle niedoskonałe, a dokładny wynik uzyskuje się tylko na drodze badań histopatologicznych wykonywanych często w zaawansowanych procesach chorobowych. Szczególnie ważną rolę odgrywają zatem badania przesiewowe pozwalające na wykrycie wczesnych stadiów raka lub stadiów przedrakowych. Z wielu niezależnych powodów, naukowcy koncentrują się na metodach prowadzenia tego typu badań. Przede wszystkim dają one szansę na wyleczenie lub znaczące wydłużenie życia pacjentów. Metody te pozwalają również na wybór najskuteczniejszej terapii po wskazaniu wyniku pozytywnego. Jednakże, mimo tych zalet, bywają one często nieprecyzyjne dając wynik fałszywie pozytywny lub negatywny. Błędy zarzuca się np. kosztochłonnym technikom obrazowania tkanek lub narządów. W związku z tymi problemami, poszukuje się metod alternatywnych, które będą relatywnie tanie, mało lub nawet zupełnie nieinwazyjne, a ponadto ogólnie dostępne. Dużą wagę przypisuje się w tym miejscu wciąż kontrowersyjnej analizie zapachu towarzyszącego rozwojowi schorzenia. Choć od dawna testowane są zarówno analityczne metody chemiczne, jak i zmysł psów, to jednak zagadnienie to wciąż można nazwać nowatorskim i wciąż nie w pełni wykorzystywanym podczas wykrywania przedklinicznych stadiów choroby nowotworowej.

Wskazując na powyższe względy stwierdzam, że podjęcie przez Panią mgr inż. Agatę Marię Kokocińską-Kusiak badań zmierzających do pogłębienia wiedzy z zakresu identyfikacji zapachowej biomarkerów czerniaka w moczu myszy jest w pełni zasadne. Ponadto, Autorka podjęła się opisanie tego zagadnienia poprzez wykorzystanie dwóch metod, czyli behawioralnych i analitycznych, co prowadzi do uszczegółowienia uzyskanych wyników. Ważne jest również, że aplikacyjny charakter tych badań nie podlega wątpliwościom, gdyż toruje drogę do opracowania nowatorskiej metodyki badań przesiewowych w onkologii.

Z tytułu recenzowania niniejszej rozprawy podkreślam, że wszystkie działania przeprowadzone przez Panią mgr Agatę Marię Kokocińską-Kusiak wskazują na Jej dobre przygotowanie do podjęcia badań. Cel rozprawy został sformułowany po dogłębnych przemyśleniach, które zaprezentowano w trzech odrębnych hipotezach, wśród których najbardziej obiecująca zakłada możliwość wycucia zmian zapachu moczu związanych z powstaniem czerniaka zarówno przez myszy jako zwierzęta makrosomatyczne jak i człowieka jako gatunek mikrosomatyczny. Ważne jest również, że Autorka założyła możliwość pojawiania się zmian zapachu moczu w przedklinicznym stadium choroby. Wyszczególnienie zadań badawczych pozwoliło natomiast na uporządkowanie działań podjętych w celu potwierdzenia lub obalenia hipotez badawczych.

Wielowątkowość przeprowadzonych badań wskazuje na wystarczające opanowanie warsztatu badawczego, prawidłowe przeprowadzenie prac metodycznych, a także dociekliwość naukową, pomysłowość i olbrzymie zaangażowanie w problem badawczy.

Przedłożona do recenzji praca doktorska zawiera się w 76 stronach maszynopisu podzielonego na osiem głównych rozdziałów, w obrębie których zastało zamieszczonych 10 tabel, 21 rysunków i rycin oraz 10 fotografii. Pozytywnie oceniam podział poszczególnych rozdziałów na podrozdziały, gdyż ułatwia on zrozumienie pracy. Rozdziały są uszeregowane w systematyczne ciągi myślowe, począwszy od rozdziału zawierającego cel pracy, hipotezy i zadania badawcze, a skończywszy na wnioskach końcowych. Ogólnie strona redakcyjna pracy nie budzi większych zastrzeżeń, aczkolwiek zdarzają się niekiedy małe błędy, głównie literowe. Można było uniknąć występujących kilkakrotnie niejasności i skrótów myślowych, które pojawiły się zwłaszcza w rozdziałach zawierających przegląd piśmiennictwa i metodykę. Poniżej przedstawiam szczegółową charakterystykę poszczególnych rozdziałów pracy.

Wprowadzenie: zostało zawarte na nieco ponad dwóch stronach tekstu, które w wystarczający sposób wprowadzają do tematu pracy, a zasygnalizowanie celu pracy, które znajduje się w ostatnim akapicie pozwala czytelnikowi na koncentrowanie uwagi podczas studiowania wskazanego przez Autorkę piśmiennictwa pod kątem konkretnych zagadnień.

Drobnym mankamentem ocenianego przeze mnie rozdziału jest mała liczba cytowanych prac w pierwszych akapitach. Niekiedy również miejsce wstawiania cytatu budzi wątpliwości, co do treści, których faktycznie dotyczy.

Przegląd piśmiennictwa: obejmuje on niespełna dziewięć stron maszynopisu. Składa się z czterech podrozdziałów, z czego w jednym z nich znajdują się dwa podtytuły. Pierwszy podrozdział Autorka poświęciła charakterystyce lotnych związków organicznych (LZO) charakterystycznych dla organizmu zdrowego i chorego. Autorka omówiła czynniki determinujące profil zapachowy człowieka. Podkreśliła również, że zastosowanie chromatografii gazowej z spektrometrią mas pozwoliło co prawda na wyizolowanie licznych LZO odróżniających ludzi zdrowych od chorych na raka, ale nie pozwoliło na znalezienie konkretnego markera nowotworu. Zastosowanie i zmiany w LZO w diagnostyce innych chorób okazało się również niejednoznaczne. Drugi podrozdział został poświęcony wykorzystaniu analizy zapachów w diagnostyce klinicznej. Pani mgr inż. Agata Maria Kokocińska-Kusiak wymieniła w nim najważniejsze metody tego typu badań. Niestety, informacje w nim zawarte mogłyby być omówione w znacznie szerszym zakresie. Wydaje mi się, że dobrym rozwiązaniem byłoby również połączenie dwóch pierwszych podrozdziałów w jedną całość.

Kolejny podrozdział charakteryzuje czerniaka jako model nowotworu do badań olfaktorycznych. Autorka wyjaśniła w nim proces tworzenia tego typu nowotworu, jego usytuowanie oraz sposób diagnozowania. Wskazała również na obecny stan wiedzy z zakresu stosowania LZO w badaniu przesiewowym czerniaka. Ostatni podrozdział obejmuje natomiast zagadnienie niekonwencjonalnych metod wykrywania chorób drogą detekcji przez zwierzęta. Pierwszy podtytuł Autorka poświęciła psom jako gatunkowi najczęściej wykorzystywanemu do tego typu działań. Przeważająca część informacji dotyczy węchowej metody wykrywania czerniaka przez psy. Ten fragment tekstu, jak również kolejny podtytuł dotyczący gryzoni stał się dobrym wprowadzeniem do tematu recenzowanej przeze mnie rozprawy. Szkoda, że zagadnienia te zostały przedstawione dość pobieżnie. Druga część tego podtytułu nie zawiera żadnych cytowań będąc zatem własnym rozważaniem Autorki. Uważam również, że dwa ostatnie akapity niepotrzebnie znalazły się w 'Przeglądzie piśmiennictwa'. Informacje w nich zawarte mogły być zasygnalizowane w pierwszej hipotezie badawczej i zadaniu badawczym nr 2, a następnie wykorzystane w rozdziale 'Dyskusja'.

Z pozycji recenzenta uważam, że informacje zamieszczone w 'Przeglądzie piśmiennictwa' mogłyby być przedstawione w formie bardziej obszernej. Ponadto mile widziane byłyby chociaż podstawowe wzmianki nt. behawioru myszy domowej, a zwłaszcza znaczenia węchu w kształtowaniu określonych form zachowania się tego gatunku oraz

informacje nt. uczenia się poprzez warunkowanie instrumentalne. Zamieszczenie tych rozdziałów kierowałoby czytelnika na najważniejsze aspekty części badawczej pracy. Wydaje się również, że część szczegółowych charakterystyk badań i wyników innych autorów, które zamieszczono w „Dyskusji” można byłoby przenieść do rozdziału „Przegląd piśmiennictwa”. Warto również usystematyzować sposób cytowania. Niekiedy cytowania znajdują się po pierwszym zdaniu, niekiedy na końcu akapitu, niekiedy ta sama praca jest cytowana w następujących po sobie zdaniach w tym samym akapicie, niektóre akapity w ogóle nie mają cytowań (np. str. 7).

Cel, hipotezy i zadania badawcze pracy: Cel pracy został sformułowany na bazie trzech prawidłowo postawionych hipotez. W kolejnej części tego rozdziału przedstawione zostały trzy precyzyjnie scharakteryzowane zadania badawcze dotyczące: olfaktorycznego badania behawioralnego z wykorzystaniem mysiego zmysłu węchu, a w tym osobniczych preferencji w wyborze zapachu moczu pochodzącego od zdrowych i chorych na czerniaka osobników, jak również możliwości wytrenowania myszy poprzez warunkowanie instrumentalne w celu odróżniania nie tylko moczu osobników zdrowych i chorych, ale też umiejętności wskazywania moczu osobników chorych w stadium przedklinicznym i klinicznym. Zadania te można uznać za niezmiernie ważne w obszarze badań onkologicznych. Ważne i nowatorskie jest również zadanie drugie polegające na badaniu olfaktorycznym z wykorzystaniem ludzkiego zmysłu węchu. Badania te można uznać za pionierskie i w pełni zasadne na drodze poznania indywidualnych możliwości zmysłu węchu człowieka w identyfikacji specyficznych zapachów związanych z toczącym się procesem chorobowym w organizmie.

Ostatnie zadanie polegało na identyfikacji LZO odpowiedzialnych za zmianę zapachu moczu myszy chorej na czerniaka w stosunku do zapachu moczu myszy zdrowej. Działanie to można również uznać za bardzo ważne nie tylko z powodu możliwości potwierdzenia wyników badań behawioralnych, ale również w związku z możliwością wykrycia markerów odpowiedzialnych za daną zmianę nowotworową. Podsumowując, konstrukcja tego rozdziału zasługuje na pochwałę, gdyż w znacznym stopniu porządkuje pracę, nakierowując czytelnika na wiodącą problematykę badawczą.

Materiał i metody: Rozdział ten został zawarty na 21 stronach. Materiał badawczy stanowiło łącznie 106 myszy niealbinotycznych szczep C57B1/6J podzielny na dwie grupy badawcze o liczebności 40 samców (I grupa) oraz 35 samców i 31 samic (II grupa). Uważam, że jest to wystarczająca stawka zwierząt do przeprowadzenia badań zaplanowanych przez Autorkę rozprawy. Stwierdzam również, że materiał badawczy został dobrany i omówiony w sposób właściwy. Następnie Autorka scharakteryzowała etapy kolekcjonowania próbek moczu,

a zaraz potem przestawiła czytelny schemat procedur eksperymentalnych. Kolejność tych treści powinna być odwrotna. W następnych podrozdziałach zostały podane wyczerpujące informacje nt. hodowli i inokulacji komórek czerniaka B16F0. Podano również sposób monitorowania wzrostu guzów na podstawie czasu pojawienia się pierwszych symptomów i skali wzrostu wg Breslova z modyfikacją własną w zakresie długości i szerokości nowotworu. Istotne z punktu widzenia poznawczego jest nie tylko wykonanie dodatkowych pomiarów guza ale i zamieszczenie ich fotografii w pięciu stadiach rozwojowych. W kolejnym kroku Autorka zaprezentowała sposób zbierania, przechowywania i terminów pobierania trzech grup próbek (wcześniej określone jako etapy – str. 17 – jest to niepotrzebny w tym miejscu, powtarzający się później fragment pracy).

Rozdział dotyczący metodyki badań, Autorka rozpoczęła od omówienia sposobu oswojania myszy. Uważam, że ze względu na zastosowane następnie procedury doświadczalne, czynności wówczas wykonywane powinny być przedstawione w sposób bardziej szczegółowy. Określenie „oswojone w znacznym stopniu” (str. 24) jest zbyt potoczne. Następnie scharakteryzowano dwa eksperymenty, z których pierwszy służył określeniu spontanicznych preferencji olfaktorycznych myszy C57B1/6J w otwartym polu i labiryncie Y. Testy te zostały wybrane i scharakteryzowane w sposób odpowiedni. Celem dodatkowych wyjaśnień, Autorka zamieściła również schematy testów i fotografie wskazujące na sposób wykonania badań. W eksperymencie 2 omówiony został trening behawioralny na innych myszach niż w eksperymencie 1, co było spowodowane zbyt długą przerwą między eksperymentami. Szkoda, że przeprowadzenie badań na tych samych myszach nie było możliwe. Nie byłoby również potrzeby ponownego przeprowadzania zminimalizowanej wersji testu spontanicznej preferencji w labiryncie Y.

W przejrzysto opracowanym podtytule dotyczącym metody treningu myszy potrzebne jest jednak wyjaśnienie dotyczące wyboru wskazanego kryterium przejścia myszy do następnej fazy doświadczenia. Dobrym rozwiązaniem jest natomiast graficzne przedstawienie kolejnych faz doświadczenia. Losowość rozmieszczania próbek moczu w strefach wążania wymaga wyjaśnienia. W omówieniu testów rozróżniania przez wytrenowane myszy próbek moczu od dawców z widocznym guzem i bez widocznego guza pada stwierdzenie, że każdą mysz testowano sześciokrotnie. Wyjaśnienia wymaga wybór miejsca usytuowania próbki podczas powtórzeń oraz procedura przemijania labiryntu.

W kolejnym podrozdziale Pani Magister omówiła metodykę testów olfaktorycznych z wykorzystaniem ludzkiego zmysłu węchu. Prawidłowym działaniem było przeprowadzenie dwóch wstępnych testów wykluczających hiposomię. Przebieg dwutestowego eksperymentu z

moczem myszy został również omówiony prawidłowo, jednakże wyjaśnienia wymaga decyzja o wyborze składu szeregu zapachowego.

Reasumując recenzję tej części rozdziału, warto podkreślić duży wkład pracy Doktorantki w zaplanowanie i przeprowadzenie eksperymentów.

Kolejnym działaniem metodycznym były analizy chemiczne lotnych związków organicznych w próbkach moczu myszy zdrowych i z czerniakiem. Metodyka badań chromatograficznych ze spektrometrią mas została przedstawiona w sposób przejrzysty i szczegółowy.

Analiza statystyczna wyników nie budzi również moich zastrzeżeń. Wszystkie metody zostały dobrane w sposób adekwatny do założeń pracy i prowadzonych badań. Podczas analizy lotnych związków organicznych, dobrym rozwiązaniem było również procentowe zestawienie powierzchni pod pikami LZO dla próbek moczu od myszy zdrowych, po inokulacji komórek czerniaka i myszy z guzem.

Wyniki: Podrozdziały w rozdziale 'Wyniki' stanowią logiczną kontynuację metod badawczych, co znacznie ułatwia czytanie rozprawy. W pierwszym podrozdziale Autorka zawarła wyniki uzyskane na drodze przeprowadzenia testów behawioralnych. Zamieszczone w tym miejscu ryciny zostały najczęściej scharakteryzowane w sposób wystarczająco przejrzysty. Pierwsze trzy z nich dotyczą wyników z zakresu testu spontanicznej preferencji. Autorka pokazała głównie rezultaty, w przypadku których wystąpiły istotne różnice. Szkoda, że oznaczenia istotności różnic nie są ujednolicone. Ich interpretacja byłaby wówczas łatwiejsza. Ponadto, przedstawienie ryciny bez istotnych różnic, w momencie, gdy podane jest wcześniej w tekście, że ryciny obejmują tylko wyniki statystycznie istotne, jest zbędne, a wskazanych przez Autorkę „tendencji” (rys. 10) nie warto omawiać. Wyniki Eksperymentu 2 przedstawiono natomiast na czterech rycinach. Oznaczenie różnic między średnimi jest znów mało czytelne. Ponadto, omówienie ryc. 12 zawiera prawdopodobnie błąd. Sugeruję oddzielne omówienie ryc. 14 i 15, gdyż przedstawione na nich wyniki są zupełnie rozbieżne, przez co wspólny opis słowny może być mylący. W wyjaśnieniach opisujących ryciny brakuje również informacji, czy wyniki z próbek 2-6 przed treningiem uśredniono „z założenia”, czy też z powodu braku istotnych różnic między średnimi. Poza tym, legenda dotycząca sposobu oznaczania różnic między średnimi zawiera błędy (rys. 11, 13, 14, 15).

W kolejnej części rozdziału przedstawiono prawdopodobieństwo wyboru próbki moczu z 'czerniakiem'. Ta część wyników została dobrze opracowana. Nie budzi ona moich zastrzeżeń.

Następny podrozdział dotyka testu z wykorzystaniem ludzkiego zmysłu węchu. Wyniki dotyczące tego zagadnienia Doktorantka ograniczyła jedynie do charakterystyki słownej. Na

początku omówiła dwa testy sprawdzające sprawność zmysłu powonienia uczestników doświadczenia. Następnie wypunktowała najważniejsze rezultaty z testów właściwych.

Ostatni, najbardziej obszerny rozdział zawiera się na 12 stronach, obejmując osiem tabel i pięć rycin. Autorka zaprezentowała zarówno wykaz wszystkich zidentyfikowanych LZO, jak również LZO z zawiesiny komórek czerniaka B16F0. W kolejnej tabeli zostały zamieszczone LZO charakterystyczne dla osobników chorych, z uwzględnieniem różnych stadiów choroby i osobników zdrowych. Autorka zwróciła uwagę na dwa związki charakterystyczne dla osobników zdrowych oraz dwa dla osobników chorych, w tym jeden tylko dla fazy po inokulacji, ale przed rozwojem guza. W dalszej części zamieszczone zostały wyniki szczegółowe dotyczące 18 LZO występujących u wszystkich myszy i wykazujących największe różnice między próbkami osobników zdrowych, po inokulacji i z guzem. W wyniku tej analizy udało się wyodrębnić dwa LZO, tj. chlorek metylenu i n-Heksan, które w zasadniczym stopniu odróżniały osobniki zdrowe od osobników z komórkami czerniaka w różnym stadium. Nie wytypowano natomiast związków odróżniających próbki moczu osobników po inokulacji od próbek osobników z guzem. Wyniki te przedstawione zostały w sposób nienaganny stanowiąc bardzo wartościową część rozdziału.

Ciekawe i metodycznie uzasadnione było również stworzenie rankingu zawartości n-Heksanu wśród 33 osobników, co pozwoliło na określenie wartości granicznej tego związku dla osobników w 100% zdrowych i osobników w 100% w przedklinicznym stadium nowotworu. Tę część pracy uważam za bardzo wartościową pod względem merytorycznym.

Odrębny podrozdział został poświęcony analizie składowych głównych PCA. Wyniki z tego zakresu zostały zamieszczone na dwóch rycinach. Autorka rozprawy wskazała na trzy LZO, których wysoka zawartość występowała u osobników zdrowych. Podsumowując, wyniki zostały opracowane w sposób rzetelny i równocześnie wystarczający do sfinalizowania zaplanowanych zadań badawczych.

Dyskusja: tekst tego rozdziału został zawarty na niespełna 11 stronach. W jej ramach wyniki własne zostały celnie zinterpretowane w świetle dostępnych badań innych autorów. Najszersza i najlepiej poprowadzona część dyskusji dotyczy lotnych związków organicznych. Uważam ponadto, że część tekstu dotycząca wyjaśnienia podjętych w ramach dysertacji badań związanych z warunkowaniem instrumentalnym myszy mogłaby zostać dobrze wkomponowana w rozdziały: 'Wstęp' i 'Przegląd piśmiennictwa' lub też informacje te powinny się znaleźć jako potwierdzenie lub zaprzeczenie wyników własnych, które byłyby wówczas bardziej wyeksponowane. Fragment 'Dyskusji', który został poświęcony możliwości

wykrywania zapachu czerniaka przez ludzi częściowo jest powtórzeniem charakterystyki wyników z tego zakresu, co jest zbędne.

Wnioski: W następnym rozdziale rozprawy zostały zamieszczone cztery krótkie i dobrze sformułowane stwierdzenia i wnioski, które odpowiadają celowi pracy i hipotezom postawionym w dysertacji.

Spis piśmiennictwa: Spis piśmiennictwa zawiera 113 prawidłowo dobranych i trafnie zacytowanych pozycji piśmiennictwa, z czego 97% są to pozycje angielskojęzyczne. Wśród wszystkich zestawień 104 pozycje, czyli 92% stanowią oryginalne prace naukowo-badawcze. Warty podkreślenia jest fakt, że 49 pozycji (43%) zostało opublikowanych od 2010 roku. Cytowania w tekście pracy mają pełne pokrycie w pozycjach ujętych w spisie piśmiennictwa. W jednym przypadku brakuje oznaczenia literowego w cytowanej pracy (rozdział 'Dyskusja' str. 61, Philips i wsp., 2007).

Podsumowując pragnę podkreślić, że poczynione uwagi, spostrzeżenia i sugestie mają najczęściej charakter komentarza lub dyskusji, w żadnej mierze nie dyskredytując merytorycznej wartości przedstawionej do oceny dysertacji, a podane są jedynie w trosce o charakter, zakres i jak najwyższy poziom prowadzonych badań. Podkreślam zatem, że Pani mgr inż. Agata Maria Kokocińska-Kusiak podczas prowadzenia badań, a następnie w trakcie opracowywania rozprawy doktorskiej wykazała odpowiedni poziom przygotowania do prowadzenia działalności naukowo - badawczej.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska rozwiązuje postawiony problem naukowy, wnosi istotne elementy do nauki, jak również spełnia wszystkie warunki określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789), a zatem może być podstawą do nadania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo (według klasyfikacji dziedzin i dyscyplin wskazanej w art 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce). W związku z powyższym, przedstawiam Radzie Naukowej Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Agaty Marii Kokocińskiej-Kusiak do dalszych etapów postępowania mającego na celu nadanie stopnia naukowego doktora.

  
Dr hab. Iwona Janczarek prof. uczelni