



UNIWERSYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY Z ODDZIAŁEM MEDYCZNY
LABORATORYJNEJ
Zakład Chemii Leków
15-222 Białystok, ul. Mickiewicza 2D
Tel. (85) 748-57-06, FAX (85) 748-58-66
pal@amb.edu.pl

Prof. dr hab. n. farm. Jerzy Pałka

Białystok, 11.05.2015.

OCENA PRACY DOKTORSKIEJ

pt. „Proteomiczna i metabolomiczna analiza surowicy krwi i moczu w poszukiwaniu biomarkerów raka prostaty” wykonanej przez mgr Pawła Derezińskiego w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska stanowi kontynuację badań zespołu naukowego Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej nad metodologią analizy proteomicznej i metabolomicznej płynów ustrojowych w przebiegu różnych chorób. Przedmiotem badań objętych niniejszą rozprawą doktorską jest analiza proteomiczna i metabolomiczna surowicy krwi i moczu pacjentów z rakiem prostaty w celu poszukiwania markerów wczesnego wykrywania tej choroby, ewentualnie patomechanizmu tego procesu. Głównymi narzędziami badawczymi zastosowanymi przez Doktoranta są wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas oraz technika MALDI-TOF-MS. Ponadto Doktorant zastosował multiplexową analizę immunologiczną z zastosowaniem kulek magnetycznych metodą cytometrii przepływowowej, a także zaawansowaną analizę chemometryczną i statystyczną. Zastosowane techniki badawcze charakteryzują się wysoką czułością oraz wysokim potencjałem poznawczym dostarczając wielu parametrów analizowanych związków (dokładna masa, polarność, rozkład izotopowy, jony fragmentacyjne), które umożliwiają identyfikację szerokiego spektrum związków o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych. W swojej pracy Doktorant wykorzystuje nowe kompleksowe podejście do poszukiwania w surowicy krwi i w moczu charakterystycznych dla choroby związków, poprzez analizę białek, peptydów i aminokwasów. Ten rodzaj kompleksowego podejścia analitycznego (chemii analitycznej, multiplexowej analizy immunologicznej, analizy chemometrycznej) stanowi aktualnie najwyższy poziom rozwiązań technologicznych w celu uzyskania charakterystycznego obrazu próbki. Ogromny zbiór danych analitycznych poddawany jest analizie chemometrycznej i zaawansowanej wielowymiarowej analizie statystycznej w celu odzwierciedlenia relacji ilościowych i jakościowych pomiędzy związkami endogennymi i ich metabolitami oraz określenia aktualnego profilu metabolicznego zdrowia lub choroby. Zastosowana technologia badawcza wymaga użycia wielu nowoczesnych narzędzi obliczeniowych, specjalistycznych

programów oraz biegłej znajomości metod statystycznych i specjalistycznej wiedzy biochemicznej w celu uzyskania wiarygodnych wyników charakteryzujących określony stan fizjologiczny lub patologiczny.

Podjęcie przez Doktoranta niniejszego tematu badawczego uważam za uzasadnione i niezwykle ważne z punktu widzenia zarówno metodologicznego, poznawczego, diagnostycznego jak i patofizjologicznego. Doktorant wykorzystał doświadczenie zespołu badawczego Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej i innych badaczy z zakresu metodologii analizy proteomicznej i metabolomicznej oraz patobiochemii raka prostaty. Zagadnienia te stanowią przedmiot intensywnych badań. Świadczy o tym aktualna literatura dotycząca tych zagadnień, zamieszczona w piśmiennictwie rozprawy doktorskiej. Na jej podstawie Doktorant opracował syntetyczny wstęp i obszerną metodologię badań. Wiele miejsca poświęcił wprowadzeniu czytelnika w wiedzę o patogenezie, diagnostyce i terapii raka prostaty, analizie proteomicznej i metabolomicznej łącznie z metodologią przygotowania próbek, nowoczesnych strategiach badawczych z wykorzystaniem spektrometrii mas, metodologii identyfikacji aminokwasów, metabolitów i peptydów, walidacji metod, analizie danych łącznie z analizą statystyczną oraz interpretacji wyników badań w kontekście metabolicznych procesów biochemicznych. Doktorant zamieścił we Wstępie pracy syntetyczną ilustrację graficzną prezentowanych zagadnień. Pozwala to łatwiej zrozumieć czytelnikowi metodologię analizy proteomiczno-metabolomicznej i zastosowanych technologii badawczych, zwłaszcza metodę znakowania aminokwasów oraz multipleksową technikę immunofluorescencyjną Luminex/xMAP. Wstęp zawiera bogatą dokumentację omawianych zagadnień, które zostały poparte aktualnym piśmiennictwem. Literatura omawianych zagadnień została poprawnie dobrana tematycznie i w przeważającej części stanowi osiągnięcia ostatnich 10 lat w tej dziedzinie.

Na podstawie uzyskanych wyników badań surowicy i moczu pacjentów z rakiem prostaty Doktorant wykazał, że w przebiegu tej choroby następują znaczące zmiany ilościowe w obrębie co najmniej kilkunastu aminokwasów, w szczególności ilościowy wzrost stężenia sarkozyny, metylohistydyny, beta-alaniny i kwasu asparaginowego oraz obniżenie stężenia m.in. metioniny, glutaminy, argininy, leucyny, w surowicy krwi. W moczu natomiast charakterystyczne zmiany ilościowe zaobserwowano w przypadku 26 aminokwasów, w szczególności wzrost ilościowy tauryny i obniżenie ilości pozostałych 25 aminokwasów, zwłaszcza argininy i asparaginy. Spośród sporej grupy charakterystycznych aminokwasów, wyżej wymienione aminokwasy surowicy i moczu mogą stanowić potencjalne markery omawianej choroby.

Analiza profili peptydowych płynów biologicznych wykazała istotne statystycznie różnice w stężeniach 65 peptydów surowicy i 108 peptydów moczu w przypadku obecności raka prostaty. Doktorant wykazał istotne zmiany w profilach aminokwasowych i peptydowych raka prostaty skorelowane ze stopniem złośliwości histologicznej nowotworu i sugeruje dalsze poszukiwania specyficznych biomarkerów prognostycznych raka prostaty. W odniesieniu do białek Doktorant wykazał wysoki potencjał predykcyjny 10 ligandów lub

receptorów czynników wzrostowych, między innymi PDGF, SCF, FCF oraz receptorów VEGF1 i VEGF2, EGF.

Wiarygodność swoich badań Doktorant potwierdził szeregiem testów istotności statystycznej. Stosując wielowymiarową analizę statystyczną – analizę głównych składowych (PCA) oraz dyskryminacyjną analizę najmniejszych kwadratów (PLS-DA) Doktorant zbudował modele charakteryzujące się dużym potencjałem poznawczym i predykcyjnym. Poprawność i wiarygodność modeli dyskryminacyjnych Doktorant zweryfikował poprzez wykonanie testów permutacji, obliczenie czułości i swoistości modeli.

Treść pracy doktorskiej została przedstawiona w postaci 25 rycin i 30 tabel. Stanowią one obszerną dokumentację ogromu pracy doświadczalnej Doktoranta. Szczególną uwagę zwraca opanowanie nowoczesnego i innowacyjnego warsztatu badawczego, doświadczenie i profesjonalizm badawczy, które pozwoliły zapewnić wysoką jakość i rzetelność badań.

Na podstawie wyników obszernych badań Doktorant sformułował 12 wniosków podsumowujących. Odzwierciedlają one najistotniejsze elementy poznawcze pracy i wyznaczają dalsze kierunki badań nad selekcją biomarkerów raka prostaty.

Dyskusja zawiera konkluzje przedstawione w części doświadczalnej oraz doskonale interpretuje uzyskane wyniki badań na podstawie badań własnych i obszernej literatury przedmiotu. Pozwala to bardzo pozytywnie ocenić specjalistyczną wiedzę Doktoranta, umiejętność rozwiązywania problemów badawczych, korzystania z literatury stanowiącej przedmiot pracy oraz interpretacji wyników. Niemniej jednak niektóre zagadnienia mogą stanowić przedmiot dyskusji, na przykład:

Str. 76. Rozdział 4.8.2.

Doktorant informuje, że dane zostały poddane normalizacji w odniesieniu do próbek – tzw. „normalization by sum”. Dalej Autor stwierdza, że stężenia aminokwasów i peptydów w moczu zostały znormalizowane w odniesieniu do stężenia kreatyniny. Rodzi to pytanie czy jeden typ normalizacji nie wyklucza drugiego?

Str. 78. Rozdział 5. Wyniki

Uważam, że spis tabel powinien być umieszczony na końcu rozprawy. Nie wszystkie wymienione tabele dotyczą wyników.

Str. 115 Rycina 10.

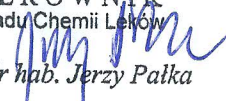
Powinna przedstawiać porównanie wyników pomiarów kreatyniny w 20 próbkach moczu otrzymanych przy wykorzystaniu opracowanej metody LC-MS/MS i laboratoryjnej metody kolorymetrycznej. Na wykresie pokazane są wyniki pomiarów **tylko jednej metody** i nie jest opisane z której, więc nie jest to porównanie wyników obu metod.

Str.122. Rycina 18.Rys.B. Model PLS-DA *dla aminokwasów w moczu* zawiera próbkę znacznie odstającą od zbioru danych. Dlaczego Autor zaliczył ją do zbioru? Może należało rozważyć usunięcie tej próbki ze zbioru danych?

Str. 126 Rycina 24.Rys B. Dlaczego w modelu PLS-DA *dla aminokwasów w moczu* składowa 2 wyjaśnia więcej zmienności (25,6%) niż składowa 1 (16,6%)?

Reasumując, uważam, że rozprawa doktorska mgr Pawła Derezińskiego jest pracą wartościową, poprawnie przygotowaną warsztatowo i wnosi nowe elementy poznawcze w zakresie proteomiki i metabolomiki raka prostaty.

Upoważnia mnie to do wystąpienia z wnioskiem do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie mgr Pawła Derezińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Zakładu Chemii Leków

prof. dr hab. Jerzy Pałka