



Gdański Uniwersytet Medyczny
KATEDRA I ZAKŁAD
CHEMII FARMACEUTYCZNEJ

Medical University of Gdańsk
DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL
CHEMISTRY

tel. (48) (58) 349 31 35 fax: (48) (58) 349 31 30
ul. Gen. J. Hallera 107, PL 80-416 Gdańsk

Gdańsk, 2015-05-14

RECENZJA

rozprawy doktorskiej pana mgr. Pawła DEREZIŃSKIEGO

pt.:

**Proteomiczna i metabolomiczna analiza surowicy krwi i moczu w poszukiwaniu
biomarkerów raka prostaty**

wykonanej w

Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej

Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

pod kierunkiem

prof. dr. hab. Zenona J. Kokota

Przewidywanie odpowiedzi pacjenta chorego na raka prostaty i oszacowanie ewentualnego nawrotu choroby wiążą się z decyzjami dotyczącymi użycia odpowiednich, dopasowanych do sytuacji, strategii terapeutycznych. Ze względu jednak na istniejące nieliczne i dodatkowo pojedynczo rozpatrywane biomarkery (jak PSA w przypadku raka prostaty), precyzyjne przewidywanie odpowiedzi na leczenie, progresji i nawrotu choroby jest wciąż niezmiernie trudne. Znalezienie nowych, pojedynczych substancji, które mogą służyć jako biomarkery danej choroby, pomimo wielu potencjalnych pozytywnych przykładów, wydają się ciągle trudne do zastosowania w realnej praktyce. Rozważanie całych zestawów substancji biomarkerowych (tzw. profili biomarkerowych) może być więc przy tym rozpatrywane jako potencjalna szansa na przełom. Projektowanie innowacyjnych systemów bioanalitycznych jest obecnie znakiem czasu w szeroko pojętej analityce biomedycznej. Nowoczesną alternatywą w diagnostyce molekularnej są obecnie także zintegrowane studia

nad możliwie szerokim spektrum analitów poparte zaawansowaną analizą statystyczną i chemometryczną. Uwzględnione są przy tym złożone mechanizmy przetwarzania danych opierając się na analitycznej integracji informacji biomedycznej w celu zapobiegania, diagnozowania i leczenia chorób. Dlatego też obecnie (czego przykładem jest również przedłożona rozprawa doktorska), ogólna strategia bioanalityczna zakłada identyfikację profili biomarkerów wykrywanych z użyciem nowych platform badawczych dostarczanych m.in. poprzez takie nowe podejścia jak proteomika i metabolomika.

Niezależnie od charakteru prowadzonych badań bioanalitycznych, istotną rolę odgrywają odpowiednie nowe techniki analityczne i nowe techniki przetwarzania danych. I w tym też kontekście należy rozpatrywać program badawczy wywodzący się ze szkoły naukowej Pana prof. dr. hab. Zenona Kokota, realizowany właśnie przez Pana mgr. Pawła Derezińskiego. Problematyka, której podjął się Doktorant należy do bardziej złożonych, zarówno z punktu widzenia bezpośredniego opanowania warsztatu eksperymentalnego, jak i warsztatu dotyczącego przetwarzania uzyskanych danych. Należy też pamiętać o konkurencji międzynarodowej, ponieważ rozpatrywana, atrakcyjna poznawczo tematyka stanowi przedmiot studiów krajowych i międzynarodowych laboratoriów badawczych. Dlatego też, na wyróżnienie zasługuje udana próba wyciągnięcia konstruktywnych wniosków na podstawie przedstawionych wyników pracy wraz ze znalezieniem stosownego kompromisu interpretacyjnego. Słowa uznania należą się Promotorowi i Doktorantowi za konsekwentną realizację trafnie sformułowanego tematu rozprawy.

Całość rozprawy doktorskiej liczy 195 stron maszynopisu, bogato dokumentowanej rycinami (w liczbie 25), tabelami (w liczbie 30) i pozycjami literaturowymi (w liczbie 208). W przypadku piśmiennictwa zdecydowana większość pozycji pochodzi z XXI wieku, włączając najnowsze publikacje oryginalne i monografie książkowe. Układ pracy składa się typowo z części teoretycznej, celu pracy, części doświadczonej, wyników badań i dyskusji oraz wniosków. Ze względu na układ, niniejsze opracowanie jest jak najbardziej odpowiednie. Chociaż, z drugiej strony, biorąc pod uwagę aspekt przejrzystości i łatwości śledzenia opisywanych wyników w tekście, miałbym pewne wątpliwości dotyczące szczególnego zgrupowania Tabel 7-30 na stronach 82-108, a następnie Rycin 6-25 na stronach 112-127. Przedstawione rozważania w części teoretycznej to przede wszystkim ogólna charakterystyka zagadnienia raka prostaty oraz opis podstaw proteomiki i metabolomiki, ze szczególnym uwzględnieniem nowoczesnych technik analitycznych

używanych w tych podejściach. W jednym z podrozdziałów, Autor poświęca dużo uwagi przedstawieniu wręcz możliwości wykorzystania proteomiki i metabolomiki w badaniach raka prostaty. W sposób szczególnie czytelny zilustrowano (na Rycinie 2) przepływ informacji w biologii systemowej z uwzględnieniem tzw. technik „omicznych”. Generalnie należy stwierdzić, że ta część rozprawy jest napisana w sposób przejrzysty i nie budzący zastrzeżeń merytorycznych. Wybór i wstępne uzasadnienie tematu rozprawy przedstawiono w rozdziale dotyczącym celu pracy. Być może jest to opis nieco zbyt długi i niepotrzebnie włącza cytowania prac już opublikowanych innych autorów. Szczegółowy schemat prowadzonych badań przedstawiony na Rycinie 3 rekompensuje jednak wątpliwości pojawiające się w samym opisie celu pracy. W części doświadczalnej Doktorant opisał właściwie procedurę rekrutacji pacjentów do badań, zastosowane techniki pomiarowe, metodykę i warunki przeprowadzonych doświadczeń. W tym miejscu należy podkreślić trafność zarówno wyboru użytych technik analitycznych, jak i narzędzi obliczeniowych, dzięki którym, według mojej opinii, wytyczony przez Promotora i Doktoranta cel został ostatecznie osiągnięty. Za najważniejsze wnioski, które przedstawił Doktorant w rozprawie, i które są bezpośrednim efektem przeprowadzonych analiz, uznać należy:

- 1) opracowanie metody jednoczesnego oznaczania 43 związków należących do grupy aminokwasów w surowicy i moczu osób zdrowych i chorych na raka prostaty przy użyciu zaawansowanej metodologii opartej na technice LC-MS/MS,
- 2) zastosowanie nowej metody oznaczania złożonych profili aminokwasowych rozpatrywanych jako potencjalny biomarker raka prostaty wraz z analizą statystyczną uzyskanych wyników,
- 3) opracowanie procedury analitycznej umożliwiającej określenie obecności profili peptydowych różnicujących osoby zdrowe i chore na raka prostaty,
- 4) przeprowadzenie zaawansowanej analizy statystycznej pozwalającej na porównanie grup pacjentów w zależności od stopnia złośliwości histologicznej raka prostaty,
- 5) przeprowadzenie analizy technikami separacji magnetycznej i cytometrii przepływowej uzupełniającej eksplorację białek mogących mieć potencjalną wartość podczas dalszych badań nad nowatorską diagnostyką raka prostaty.

Na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej potwierdzono, że obecność raka prostaty może wywoływać zmiany w surowicy i moczu na poziomie molekularnym, i że


może istnieć korelacja pomiędzy stanem biologicznym pacjenta a jego statusem proteomicznym i metabolomicznym.

Jak w każdej recenzowanej pracy doszukać się można pewnych niejasności, które można poddać dyskusji. Wywiązując się z powierzonego obowiązku recenzenta mam w związku z tym kilka, następujących zapytań.

- 1) Czy w procesie walidacji metody analitycznej oznaczania aminokwasów uwzględniono próbę oszacowania odporności (niewrażliwości, ang. *robustness*) oraz elastyczności (ang. *ruggedness*) opracowanej metody (str. 57)?
- 2) Z ilu pomiarów wyliczono średnią dla oznaczonych stężeń aminokwasów przedstawionych w Tabeli 9 i 10?
- 3) Rozpatrując przeprowadzone, jednozmiennne analizy statystyczne (str. 140) odnoszące się do oznaczeń aminokwasów, peptydów i białek nie wskazano, jaki rodzaj testu (parametryczny, nieparametryczny) był użyty do danej analizy. Chociaż testy te poprawnie przedstawiono w opisie części doświadczalnej na str. 75.
- 4) Jakie były przesłanki merytoryczne użycia analizy PLS-DA podczas porównania stężeń aminokwasów w grupie osób zdrowych i chorych oraz ostatecznie, co było szczególnie ciekawe, w zależności od stopnia złośliwości histologicznej?
- 5) Czy podczas analizy PLS-DA próbowano uwzględnić dodatkowo także dane kliniczne pacjentów, chociażby masę ciała, wiek, płeć (str. 142)?
- 6) W przebiegu badań wykonano także analizę klasyfikacyjną korzystając z algorytmu genetycznego. Uzyskana w wyniku tej analizy zdolność rozpoznawania pacjentów jest najwyższa w porównaniu do dwóch pozostałych, testowanych technik i przekracza 90%. Bardziej pogłębiona analiza interpretacyjna wydaje się w tym przypadku niezwykle kusząca i mogłaby prawdopodobnie wnieść dodatkową, nową informację. Jakie nowe informacje, przy bardziej szczegółowej analizie, mogą być uzyskane posługując się tym narzędziem? I jakie aspekty metodologiczne wyróżniające algorytm genetyczny mogą świadczyć o tym, że akurat ta technika jest najbardziej perspektywiczna w kontekście przeprowadzanych studiów?

Praca doktorska swoją tematyką i zakresem materiału badawczego zasługuje na uwagę. Została ona właściwie zaprojektowana, a następnie wykonana. Odzwierciedla ona przy tym duży wkład pracy doświadczalnej oraz podczas zbierania i opracowania danych

pomiarowych. Wyniki i wnioski zostały dobrze opisane, dowodząc również dobrego przygotowania teoretycznego i laboratoryjnego Doktoranta. Biorąc powyższe pod uwagę nie mam wątpliwości, że spełnione są wymogi formalne, aby Rada Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu mogła podjąć uchwałę o dopuszczeniu Pana mgr. Pawła Derezińskiego do ostatniego etapu postępowania kwalifikacyjnego, czyli publicznej obrony.


K I E R O W N I K
Katedry i Zakładu
Chemii Farmaceutycznej
prof. dr hab. Tomasz Bączek