



**GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY**

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

Dr hab. Piotr Kowalski, prof. nadzw. GUMed

Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej

Al. Gen. Hallera 107, 80-416 GDAŃSK

e-mail: [piotr.kowalski@gumed.edu.pl](mailto:piotr.kowalski@gumed.edu.pl)

tel. 58-349-12-36

Gdańsk, 16-05-2019

## RECENZJA

### rozprawy doktorskiej mgr Szymona Plewy

nt. „**Metabolomika celowana w analizie złożonych matryc biologicznych**”,

wykonanej w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Promotor pracy doktorskiej: Prof. dr hab. Zenon J. Kokot. Promotor pomocniczy pracy doktorskiej: Dr n. farm. Paweł Dereziński.

Wybrany przez Doktoranta temat stanowi duże wyzwanie zarówno dla Autora, promotora głównego i pomocniczego a o wyzwaniu dla recenzenta już nie wspomnę. Jako „poligon doświadczalny” swoich badań Doktorant wybrał płyny biologiczne (próbki krwi, moczu, płynu mózgowo-rdzeniowego), które słusznie potraktował jako pewnego rodzaju odzwierciedlenie metabolomu (próbki krwi w szczególnym odniesieniu do endogennych metabolitów, natomiast próbki moczu do końcowych produktów szlaków metabolicznych i procesów przemiany ksenobiotyków).

Jak podają dane literaturowe, pod koniec drugiego dziesięciolecia XXI w. z próbek biologicznych wyodrębnić można już ponad tysiąc różnego rodzaju metabolitów o budowie aminokwasów, peptydów, nukleozydów czy związków drobnocząsteczkowych, jak katecholo- czy indoloaminy. Ich zróżnicowane poziomy w płynach fizjologicznych umożliwiają uzyskanie szeregu cennych informacji na temat ogólnego stanu zdrowia pacjenta. Od połowy ubiegłego stulecia nieustannie rozwijane są badania, mające na celu identyfikację i oznaczenie metabolitów, których stężenia lub stosunki stężeń pomiędzy nimi odzwierciedlać mogą procesy patologiczne zachodzące w organizmie. Wraz z rozwojem metod przygotowania prób biologicznych do analizy (m.in. izolacji, różnych technik ekstrakcji, liofilizacji) możliwe stało się selektywne wyodrębnianie i zateżanie markerów z próbek biologicznych. Natomiast rozwój nowoczesnych technik separacyjnych (chromatograficznych i elektroforetycznych) wraz technikami detekcji opartymi głównie na spektrometrii mas umożliwił oznaczanie biomarkerów z zadawalającą precyzją, dokładnością w stosunkowo krótkim czasie.

Współczesna medycyna pozwala na wykrycie choroby nowotworowej na wielu etapach jej rozwoju, zaczynając od zmian w metabolizmie a kończąc na objawach klinicznych, powiązanych z nieprawidłowym funkcjonowaniem narządów. Metody diagnostyczne mają na celu stwierdzenie zmian patologicznych i w miarę precyzyjne zbadanie cech nowotworu poprzez techniki obrazowe (RTG, USG, TK, MR), diagnostykę histo- i cytopatologiczną oraz badania laboratoryjne płynów fizjologicznych (morfologia i biomarkery). Metabolity są produktami, bądź półproduktami wielu cykli biochemicznych o naturze anabolicznej lub katabolicznej, które zachodzą w żywych organizmach a ich stężenia zależą od stopnia aktywności poszczególnych enzymów oraz działających na nie efektorów. Stąd można wytłumaczyć zainteresowanie Doktoranta podjętą przez Niego tematyką oznaczania metabolitów, których poziomy ulegają zmianom w zależności od stanów fizjologicznych czy patologicznych organizmu.

## Ocena merytoryczna pracy

Z uwagi na stosunkowo ubogą literaturę dotyczącą badań metabolomicznych w zupełności uzasadniona jest celowość podjętej przez Autora rozprawy tej tematyki. Doktorant zawarł w swej pracy główne informacje dotyczące optymalizacji procedur postępowania związanych ze zbieraniem i gromadzeniem materiału biologicznego, pochodzącego od pacjentów pod kątem przeprowadzenia analiz metabolomicznych. W ramach przeprowadzonych badań naukowych Autor wykorzystał najnowsze metody analityczne, które umożliwiły oznaczenie szerokich grup metabolitów w różnych matrycach biologicznych. Z uwagi na konieczność analizy szerokiego spektrum analitów zróżnicowanych pod względem właściwości fizykochemicznych wybraną przez Doktoranta techniką była chromatografia cieczowa w połączeniu ze spektrometrią mas. Jako główne narzędzie badawcze Autor wytypował tandemowy spektrometr mas z analizatorem typu potrójny kwadrupol, który pozwala na prowadzenie celowanych analiz metabolomicznych i oznaczanie szerokich paneli metabolitów, zróżnicowanych pod względem chemicznym.

Najbardziej cennym elementem pracy jest zaproponowanie modeli zmian w szlakach metabolicznych, spowodowanych pojawieniem się komórek nowotworowych (metabolizm histydyny, tryptofanu, argininy i proliny oraz metabolizm alaniny, kwasu asparaginowego i glutaminy). Dokonanie tego było możliwe dzięki przeprowadzeniu integracji uzyskanych danych metabolomicznych z danymi uzyskanymi z literaturowych oraz internetowych baz danych, dostępnemu oprogramowaniu i narzędzi służących do opracowania danych online. Warto podkreślić holistyczne podjęcie Doktoranta w stosunku do analizowanych próbek, na które składa się kompilacja uzyskanych wyników i opracowania danych metabolomicznych z potencjalnym podłożem molekularnym oraz z danymi klinicznymi pacjentów co stanowić może nieocenione źródło informacji na temat rozwoju choroby czy oceny stopnia jej zahamowania. Co więcej, wyniki i wnioski zaprezentowane w przedstawionej do oceny rozprawie przyczynić się mogą do pełniejszego poznania zmian zachodzących w metabolomie człowieka i procesów natury patofizjologicznej, które przebiegają głównie podczas kancerogenezy.

Jednym z osiągnięć Doktoranta jest analiza 42 aminokwasów w próbkach surowicy krwi o objętości 40  $\mu\text{L}$  w czasie poniżej 18 minut przy użyciu aparatury LC-MS/MS. Z kolei opracowanie nowatorskiej metody oznaczania 10 wybranych kwasów organicznych pozwoliło na pogłębienie wiedzy na temat metabolizmu składników próbek moczu pacjentów z nowotworem złośliwym prostaty i łagodnym przerostem gruczołu krokowego. Celowana analiza dość szerokiego spektrum metabolitów (histydyny, cytruliny oraz metabolitów natury lipidowej) w surowicy krwi pacjentek pozwoliła Doktorantowi zaproponować nowatorski wieloczynnikowy panel diagnostyczny zaangażowany w procesy mające związek z obecnością komórek nowotworowych jajnika.

Dokonany przez Autora wybór kwasów organicznych jako kolejnych związków do ilościowej analizy został podyktowany wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi potencjalnej roli pojedynczych związków z tej grupy w onkogenezie oraz hipotezą Otto Warburga dotyczącą przekierowania metabolicznego komórek nowotworowych do metabolizowania glukozy do mleczanu, która nie została jeszcze w pełni wyjaśniona. Istotnym argumentem potwierdzającym zasadność podjęcia badań był także brak skutecznych biomarkerów nowotworu złośliwego prostaty. Analizy statystyczne wykonane przez Doktoranta wykazały obniżenie stężenia kwasu 3-hydroksyzymasłowego w obrębie pacjentów z nowotworem złośliwym prostaty.

Wdrożenie metody celowanej analizy szerokiej grupy 188 małącząsteczkowych metabolitów (acylokarnityny (40), aminokwasy (21) i aminy biogenne (21), glicerofosfolipidy (90), w tym 14 lizofosfatydylocholin 76 fosfatydylocholin oraz sfingolipidy (15), sumy heksoz) w próbkach surowicy krwi i płynu mózgowo-rdzeniowego pochodzących od pacjentek z nowotworem jajnika, guzem łagodnym jajnika i odpowiednio dopasowanej grupy kontrolnej pozwoliło Autorowi na wytypowanie metabolitów różnicujących grupy pacjentek i zaproponowanie potencjalnego mechanizmu obserwowanych zmian związanych z obecnością guza złośliwego, a także wytypowanie szlaków metabolicznych potencjalnie związanych z obecnością nowotworu w obrębie jajnika.

Autor rozprawy przeprowadził również pierwsze porównawcze badanie szerokiego panelu metabolitów oznaczanych zarówno w próbkach płynu mózgowo-rdzeniowego (57 metabolitów), jak i w surowicy krwi (148 związków), u grup pacjentów, co posłużyć może jako wartości odniesienia do podjęcia interpretacji zmian obserwowanych w różnych stanach patologicznych organizmu.

Bardzo cennym elementem dysertacji, zaprezentowanym jeszcze w części teoretycznej, jest opis platform, technik oraz stosowanych w badaniach metabolomicznych podejść analitycznych. Godnym uwagi jest Tabela 1 przedstawiająca podsumowanie zalet i wad podstawowych matryc biologicznych wykorzystywanych w analizach metabolomicznych, którą Autor stworzył jako opracowanie własne.

Rezultatem badań Autora i oryginalnym Jego osiągnięciem było:

- wdrożenie kilku nowoczesnych metod analizy stężeń wybranych metabolitów w różnych matrycach biologicznych;
- zaproponowanie odpowiednich metod analitycznych do pomiaru stężeń metabolitów w próbkach pochodzących od pacjentów z różnymi typami nowotworów i dopasowanych grup kontrolnych;
- interpretacja zaobserwowanych zmian w metabolomie na podstawie danych bioanalitycznych i danych klinicznych pacjentów.

Zastosowanie podejścia celowanego pozwoliło Doktorantowi na wyznaczenie stężeń badanych związków, a to z kolei na próbę interpretacji podłoża molekularnego procesu nowotworzenia, wytypowanie istotnych statystycznie różnic między badanymi grupami pacjentów i ocenę potencjału diagnostycznego wybranych metabolitów.

#### Ocena metodologiczna pracy

Badania stanowiące temat rozprawy doktorskiej Autor przeprowadził w oparciu o nowoczesną platformę analityczną wykorzystującą chromatografię cieczową sprzężoną z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) oraz strategię analityczno-bioinformatyczną, które zostały dostosowane do specyfiki każdej z badanych matryc i do zastosowanych metod analitycznych. Zaproponowane podejście oparte na metabolomicie celowanej pozwoliło uzyskać wyniki ilościowe – w postaci stężenia konkretnych metabolitów. Dzięki powiązaniu uzyskanych wyników z danymi klinicznymi na temat analizowanych grup pacjentów możliwa była próba wyjaśnienia zaobserwowanych zmian w metabolomie w kontekście patomechanizmu onkogenezy. Uzyskane przez Niego wyniki mogą być przydatne w spersonalizowanej diagnostyce i terapii pacjentów.

Rozprawa doktorska mgr Szymona Plewy została przedstawiona w układzie „zebrane publikacje plus załączony do nich komentarz”. Praktycznie zawiera ona wszystkie elementy, które cechuje bardzo dobrze przygotowana i napisana rozprawa doktorska. Składają się na nią 92 numerowane strony, wykaz skrótów, artykuły naukowe stanowiące integralną część rozprawy, co jest zgodnie z przepisami opublikowanymi w Dz. U. z 2011 r. Nr 84 poz.455, art. 13 ust.2, tworzące zbiór spójnych tematycznie czterech publikacji, które zostały opublikowane w prestiżowych czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania (IF). W skład rozprawy wchodzi część opisową, zawierającą komentarz w tym 3 rysunki i jedna tabela. Co najważniejsze, do pracy jest dołączony również rozdział przybliżający sylwetkę doktoranta. Praca zawiera także oświadczenia współautorów opublikowanych manuskryptów, określające wkład, rodzaj zadań i zakres prac wykonanych przez współautorów. Oświadczenia te świadczą o wiodącej roli Doktoranta w powstawaniu publikacji. Kopie orzeczeń (uchwał) lokalnej Komisji Bioetycznej dołączone na koniec rozprawy stanowią dopełnienie szeroko zakrojonych prac badawczych podjętych przez Doktoranta.

Piśmiennictwo (78 pozycji) jest dobrze dobrane, zawiera (za wyjątkiem jednej) wszystkie pozycje literaturowe opublikowane w ostatnich kilkunastu latach w języku angielskim, co świadczy że Doktorant sprawnie posługuje się tym językiem.

Struktura dysertacji jest poprawna, trafność doboru metod i narzędzi badawczych, jak również umiejętność ich zastosowania w badaniach naukowych nie budzą zastrzeżeń. Z obowiązku recenzenckiego przytaczam swoje drobne uwagi:

Str. 62 „w badaniach metabolomicznych wstępne przygotowanie obejmuje zwykle strącanie białek oraz różnego typu ekstrakcje, w tym ekstrakcję do fazy stałej (SPE) i ekstrakcję typu ciecz-ciecz (LLE)” - warto rozszerzyć zakres przygotowania próbek w przedstawionym opisie o techniki mikroekstrakcyjne typu: mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME) oraz dyspersyjna ekstrakcja typu ciecz-ciecz (DLLME), których popularność rośnie z uwagi na ograniczenie objętości próbek płynów ustrojowych.

Niektóre ze stwierdzeń zawartych w komentarzu używane są w żargonie laboratoryjnym:

Str. 80 „użyteczne w **skryningu kobiet** z nowotworem złośliwym jajnika (...)” lub str. 81 „panel diagnostyczny, użyteczny w **skryningu raka jajnika**” – co na to organizacje feministyczne? Raczej mówimy zwykle o skryningu próbek.

Wymienione powyżej drobne mniej trafione sformułowania nie są w stanie w jakikolwiek sposób obniżyć wysokiej oceny pracy doktorskiej autorstwa mgr Szymona Plewy.

#### Ocena dorobku

Doktorant jest absolwentem (z roku 2015) Uniwersytetu Medycznego im Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, gdzie na Wydziale Farmaceutycznym po ukończeniu studiów na kierunku farmacja swą karierę związał z Katedrą i Zakładem Chemii Nieorganicznej i Analitycznej. Ponadto, w czerwcu 2017 roku mgr Szymon Plewa ukończył Studium Podyplomowe Badań Klinicznych i Biomedycznych Badań Naukowych na Wydziale Lekarskim II tegoż Uniwersytetu. Podczas pracy na Uczelni Doktorant intensywnie rozwijał wiedzę i umiejętności w ramach cyku szkoleń i kursów takich jak „Statistica kurs podstawowy” oraz „Zastosowania statystyki i Statistica w opracowywaniu wyników badań medycznych – metody zaawansowane”, a także szkoleń z zakresu obsługi spektrometru mas 4000 QTRAP (LC-ESI-QqQ-MS/MS) oraz obsługi sprzętu i oprogramowania do przechowywania próbek biologicznych (biorepozytorium).

W trakcie swojej pracy Doktorant był wykonawcą w trzech grantach badawczych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki:

1. „Proteomiczno-metabolomiczna strategia poszukiwania biomarkerów chorób nowotworowych układu płciowego z wykorzystaniem metod spektrometrii mas” (kierownik projektu: Prof. dr hab. Zenon J. Kokot);
2. „Charakterystyka wybranych produktów pszczelich w oparciu o techniki omiczne”. (kierownik projektu: dr hab. Jan Franciszek Matysiak);
3. „Wpływ długotrwałej adaptacji do intensywnego treningu szybkościowo-siłowego i wytrzymałościowego na stężenie wolnych aminokwasów w osoczu w spoczynku, podczas stopniowanego wysiłku i w okresie restytucji powysiłkowej.” (kierownik projektu: dr hab. Krzysztof Kusy).

Ponadto w okresie tym Doktorant pełnił rolę kierownika dwóch projektów uczelnianych.

Dotychczasowa działalność badawcza Doktoranta została uhonorowana przyznaniem dwukrotnie Nagrody Zespołowej Naukowej Rektora Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu za osiągnięcia uzyskane w 2016 r. oraz 2017 r. a także przyznaniem stypendium doktorskiego dla pracowników Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w 2018 r.

Aktualny, całkowity dorobek naukowy Doktoranta stanowi 12 publikacji i 1 monografia (w tym 10 prac z IF) o sumarycznym współczynniku oddziaływania **IF = 29,216** i liczbą punktów MNiSW = 300.

Doktorant jest również współautorem 17 prac przedstawionych na krajowych i zagranicznych zjazdach bądź konferencjach naukowych.

Łączna wartość artykułów wchodzących w skład dysertacji, opublikowanych w latach 2017-2019 wynosi **IF = 9,752**. Nie mam zastrzeżeń dotyczących zarówno samej rozprawy, jak i merytorycznej strony zebranych publikacji, przedstawionych do oceny, jako rozprawa doktorska. Załączone prace zostały przecież już wcześniej gruntownie ocenione przed opublikowaniem przed odpowiednich recenzentów, będących specjalistami w tematyce. Zostały bowiem przyjęte do druku w czasopiśmie o wysokiej randze naukowej.

Podsumowując chciałbym zaznaczyć, że koncepcja pracy jest zasadna i obiecująca w aspekcie rozwoju kolejnych zadań w tej tematyce. Wyniki badań są logiczne i dobrze udokumentowane. Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej wykazały, że odpowiednia interpretacja złożonych zależności, płynących z integracji danych z różnych obszarów nauk „omicznych”, stanowi istotnie wyzwanie dla współczesnych badaczy, jednak wykorzystując metabolomikę celowaną jest możliwa analiza setek związków w jednym cyklu analitycznym.

Opublikowane i załączone prace, współautorstwa Doktoranta, są ściśle powiązane z tematyką rozprawy. Z uwagi na fakt, iż praca ta stanowi wartościowe opracowanie zarówno z poznawczego, jak i praktycznego punktu widzenia, stwierdzam, że w pełni odpowiada ona warunkom formalnym i merytorycznym stawianym rozprawom doktorskim, zawartym w ustawie z dnia 14 marca 2003r. – *O stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* (Dziennik Ustaw RP nr 65, poz. 595 z dnia 16 kwietnia 2003r.) i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu o dopuszczenie mgr Szymona Plewy do kolejnych etapów przewodu doktorskiego. Co więcej, biorąc pod uwagę wysoki poziom badań i szereg elementów nowości naukowej wnioskuję o jej wyróżnienie (w załączeniu).

Dr hab. Piotr Kowalski, prof. nadzw.

PROFESOR NADZWYCZAJNY  
KATEDRY I ZAKŁADU CHEMII FARMACEUTYCZNEJ  
  
dr hab. n. farm. Piotr Kowalski, prof. nadzw. GUMed