



Gdańsk, 2017-01-18

## Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr farm. JOANNY HAJDUK zatytułowanej

*„Optymalizacja strategii proteomicznych w analizie materiału biologicznego w oparciu o  
technikę MALDI TOF/TOF MS”*

Dynamiczny rozwój cywilizacji, prowadzi do pojawiania się nowych, często trudnych wyzwań w medycynie. Do tych wyzwań należą odkrywane nowe czynniki chorobotwórcze, zjawiska wykształcania się leko- a szczególnie antybiotykoodporności, ciągle wysokie poziomy zachorowalności i umieralności na choroby nowotworowe. Także takie jednostki chorobowe jak cukrzyca kobiet ciężarnych, której etiologia nie jest w pełni poznana, stanowi poważny problem stojący przed badaczami.

Koncepcja badań systemowych zakłada, że skala i złożoność stosowanych narzędzi i rozwiązań powinna ściśle odpowiadać zakresowi i stopniu skomplikowania postawionego problemu badawczego. Procesy biologiczne to jeden z najciekawszych, najbardziej skomplikowanych i przez to najbardziej wymagających obiektów badawczych. Dlatego w badaniach nad dynamicznymi systemami biologicznymi niezbędna wydaje się zmiana zainteresowań z poszczególnych przedmiotów na związki między wieloma przedmiotami oraz

z pojedynczych parametrów na zintegrowane zespoły wielu parametrów lepiej opisujące rzeczywisty stan organizmu. W praktyce, oznacza to holistyczne podejście do procesów biologicznych i rządzących nimi reguł. Proteomika i metabolomika stanowią narzędzia wykorzystywane we współczesnej bioanalizie do rozwiązywania problemów opartych o koncepcję badań systemowych. To też stało się przedmiotem badań niniejszej pracy doktorskiej p mgr farm Joanny Hajduk.

Oceniana praca doktorska wykonana pod kierunkiem prof. dr. hab. Zenona Kokota w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu jest doskonałym przykładem kompleksowego podejścia do badań złożonych procesów bioanalitycznych. Praca stanowi kontynuację prowadzonych w Katedrze badań oraz wpisuje się w dorobek dokonań Zespołu związanych z technikami spektrometrii mas i zaawansowanej bioanalitiky. Rezultaty badań ujęte w ocenianej pracy, zostały udokumentowane pięcioma publikacjami współautorstwa Doktorantki, w tym czterema w renomowanych czasopismach anglojęzycznych takich jak, *Clinica Chimica Acta*, *International Journal of Molecular Sciences*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* i *Journal of Medical Sciences*. Łączny współczynnik oddziaływania (tzw. *Impact Factor*) dla wyżej wymienionych prac wynosi ok. 12. Doktorantka jest pierwszym autorem w czterech z powyżej wymienionych prac. W swoim dorobku publikacyjnym p. mgr Hajduk ma jeszcze trzy inne prac opublikowane w indeksowanych czasopismach a sumaryczna wartość współczynnika IF wynosi ponad 22 (punkty MNiSW, 250). Jest to wynik bardzo dobry i ciągle dość rzadki wśród kandydatów do stopnia doktorskiego. Mgr Hajduk jest także współautorką licznych komunikatów plakatowych (w sumie 9) i wystąpień ustnych (2) na krajowych i międzynarodowych sympozjach specjalistycznych. Przedstawiona dysertacja potwierdza wysoką wiedzę i umiejętności kandydatki do stopnia naukowego doktora nauk farmaceutycznych.

Praca doktorska mgr Joanny Hajduk jest bardzo wartościowa, zawiera wiele innowacyjnych osiągnięć i cennych oryginalnych wniosków. Maszynopis pracy jest obszerny i obejmuje ponad 140 stron, w tym załączonych jest pięć oryginalnych wersji publikacji oraz oświadczenia autorów. Część teoretyczna opisana we wstępie zawiera sporo informacji ogólnych z zakresu strategii proteomicznych stosowanych w bioanalizie, przygotowania materiału biologicznego do analiz proteomicznych z zastosowaniem techniki spektrometrii mas oraz zastosowania spektrometrii mas MALDI-TOF w chemii klinicznej. Opisana została także, w formie tabelarycznej, szczegółowa charakterystyka wybranych próbek biologicznych (tkanek zwierzęcych i roślinnych, krwi, moczu, śliny, itp.). Wspomniany wyżej rozdział pracy, sposobem i szczegółowością opisu, budzi uznanie dla Autorki, która wykazała się doskonałą wiedzą i znajomością przedmiotu opisywanych zagadnień. Cel główny pracy jak również etapowe cele naukowe zostały prawidłowo i jasno zdefiniowane.

Dyskusja uzyskanych wyników, napisane szczegółowo i rzetelnie, została rozdzielona na poszczególne etapy badawcze i tak, bardzo dokładnie opisano takie aspekty pracy eksperymentalnej jak profilowanie białkowo-peptydowe osocza krwi kobiet ze zdiagnozowaną cukrzycą ciężarnych, kombinatoryczną bibliotekę heksapeptydów i strategię *shotgun* w analizie jadu pszczelego oraz strategię *bottom-up* w analizie płynu mózgowo-rdzeniowego z krwotokiem podpajęczynówkowym. Wymieniony zakres działań eksperymentalnych podjętych w pracy doktorskiej mgr Joanny Hajduk jest bardzo obszerny i zasługuje na docenienie. Na piśmiennictwo trafnie dobrane i umieszczone w pracy składają się 150 pozycje, z czego zdecydowana większość to publikacje, które ukazały się po 2000 roku.

Doktorantka w toku prowadzonych badań uzyskała wyniki pozwalające na zaproponowanie następujących wniosków: 1) sposób przygotowania próbki ma istotne znaczenie w proteomicznej analizie profilowania białkowo-peptydowego. Widma MS, uzyskane w wyniku analizy osocza krwi kobiet z cukrzycą ciężarnych, przygotowane w oparciu o ekstrakcję do fazy stałej typu ZipTip charakteryzuje niski współczynnik

zmienności, zarówno dla analiz wykonywanych w ciągu tego samego dnia jak i pomiędzy dniami (< 6.50%). Ponadto, tak uzyskane widma charakteryzowały się najwyższymi wartościami poprawnej klasyfikacji oraz czułości. 2) Wykorzystania metod logiki rozmytej do interpretacji widm MS pochodzących z grup o niewielkiej liczbie próbek od kobiet z cukrzycą ciężarnych, pozwoliło na wytypowanie peptydów klasyfikując badane grupy z wyższą czułością i swoistością, w porównaniu z szeroko wykorzystywaną analizą dyskryminacyjną lub innymi komercyjnie dostępnymi rozwiązaniami. 3) Połączenie danych proteomicznych i metabolomicznych w charakterystyce cukrzycy ciężarnych pozwoliło otrzymać model (zbudowany z trzech peptydów oraz metabolitów: etanoloaminy, L-cytruliny, asparaginy) o najwyższej mocy dyskryminującej, w porównaniu do modeli zbudowanych wyłącznie z samych danych proteomicznych lub metabolomicznych. 4) Zastosowanie CPLL, jako metody przygotowania próbki oraz łączonych technik spektrometrii mas w analizie proteomicznej pozwala uzyskać nowe informacje ilościowe i jakościowe na temat proteomu jadu pszczelego. 5) W porównaniu z analizą próbki pierwotnej jadu pszczelego zastosowanie metody frakcjonowania jadu pszczelego w oparciu o CPLL pozwoliła zidentyfikować dodatkowo 75 białek w przy użyciu techniki nanoLC- MALDI MS oraz 79 białek w oparciu o technikę nanoLC-ESI MS. 6) Zidentyfikowano 5 nowych białek o potencjalnym działaniu toksycznym, wykazujących wysoką homologię do białek toksycznych innych gatunków z rzędu Hymenoptera. 7) Wykazano zmiany zachodzące w układzie nerwowym podczas krwotoku podpajęczynówkowego w oparciu o identyfikację białek w płynie mózgowo-rdzeniowym z zastosowaniem strategii bottom-up. 8) Zastosowanie metody ogniskowania izoelektrycznego, w celu rozdzielania złożonych mieszanin białkowych, umożliwia zwiększenie ilości identyfikowanych białek i peptydów, oraz na skuteczne zagęszczenie analizowanej matrycy. Najwyższe stężenie białek stwierdzono w środkowych frakcjach, natomiast ich stopniowe rozcieńczanie zauważono w kierunku frakcji skrajnych

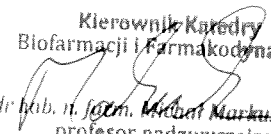
Praca doktorska mgr Joanny Hajduk jest bardzo wartościowa pod względem treści merytorycznych i ma niewątpliwe walory poznawcze. Trudno jest znaleźć słabe strony

recenzowanej dysertacji czy wymienić jej uchybienia. Niejako z obowiązku recenzenckiego, po lekturze dysertacji nasunęły mi się następujące pytania.

Czy w trakcie badań metabolomicznych korzystano z próbek kontroli jakości (*quality control*, QC), co jest standardem w oznaczeniach metabolomicznych? Czy metody były w jakiś inny sposób walidowane czy weryfikowane pod kątem występowania zmienności analitycznej? Można mieć pewne zastrzeżenia, co do liczby przebadanych próbek (pacjentek) w badaniach i wyciąganych na ich podstawie wniosków. W badaniach nad pacjentkami w ciąży ze zdiagnozowaną cukrzycą opierano się na 18 chorych i 13 kontrolnych przypadkach. Jest to bardzo mała grupa badanych, która w pewnym stopniu utrudnia wnioskowanie na podstawie uzyskanych wyników. W pracy nie uniknięto też pewnych kolokwializmów i nieścisłości terminologicznych jak ‘rozdział’ zamiast poprawnego ‘rozdzielenia’ (str. 95).

Powyższe komentarze i pytania, nie wpływają na wartość merytoryczną pracy, którą oceniam bardzo wysoko. Praca doktorska mgr Joanny Hajduk ma wyraźne aspekty oryginalności naukowej. Jest połączeniem wiedzy i umiejętności z zakresu chemii analitycznej a konkretnie spektrometrii mas z aplikacyjnym nastawieniem na metodykę badań bioanalitycznych. Autorka wykazała się opanowaniem różnorodnych technik i procedur, wymagających specjalistycznego oprzyrządowania.

Biorąc powyższe pod uwagę oraz fakt spełnienia wymagań ustawowych wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie mgr Joanny Hajduk do publicznej obrony tez przedstawionych w dysertacji. Jednocześnie, mając na uwadze, odzwierciedlający uzyskane wyniki, przedstawiony dorobek publikacyjny Doktorantki, na który składa się w sumie 5 publikacji o łącznej wartości współczynnika oddziaływania  $IF = 12$  (w tym cztery prace, w których mgr Hajduk jest pierwszym Autorem), składam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Kierownik Katedry  
Biofarmacji i Farmakodynamiki  
  
dr hab. n. jez. Med. Marcin Markuszewski  
profesor nadzwyczajny