

## **Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Szymona Plewy pt. „Metabolomika celowana w analizie złożonych matryc biologicznych”**

Przedstawiona mi do recenzji praca została wykonana w Katedrze Chemii Nieorganicznej i Analitycznej pod kierunkiem prof. dr hab. Zenona Kokota i w zespole, który posiada duże doświadczenie w analizie metabolomicznej.

Licząca 105 stron praca rozpoczyna się od wykazu skrótów, sylwetki Doktoranta i informacji o formie rozprawy, która poprzedza kolejną część pracy czyli kopie publikacji wraz z opisem udziału Doktoranta. Wyniki badań ujęte w ocenianej rozprawie doktorskiej zostały udokumentowane czterema publikacjami w międzynarodowych czasopismach z zakresu nauk biomedycznych. Łączny współczynnik oddziaływania *Impact Factor* dla wszystkich prac wynosi 9,752 a liczba punktów MNiSW 100. Ponadto Doktorant prezentował wyniki badań zawartych w pracy doktorskiej na 6 konferencjach. Elementem łączącym wszystkie publikacje jest stosowana metodologia a mianowicie metabolomika celowana. Z deklaracji doktoranta oraz oświadczeń współautorów publikacji wynika jednoznacznie, że mgr Szymon Plewa brał aktywny udział we wszystkich etapach badań od ich zaplanowania, poprzez wykonanie części doświadczalnej i opracowanie wyników, po dyskusję i napisanie manuskryptów prac.

Rozdział czwarty, zatytułowany „Część teoretyczna” stanowi wprowadzenie czytelnika w tematykę badawczą, a rozdział piąty przedstawia cele pracy. Najczęściej stosowane strategie badawcze w metabolomice to rejestracja tzw. profilu metabolicznego (*metabolic profile*), metabolicznego odcisku palca (*metabolic fingerprint*), metabolicznego odcisku stopy (*metabolic footprint*) oraz metabolomika celowana (*targeted metabolomics*). Właśnie ostatnia z wymienionych strategii stanowi temat ocenianej pracy. Jest to metoda stosowana w oznaczaniu jednego, kilku lub szeregu metabolitów wymagająca precyzyjnej identyfikacji oraz ich pomiaru ilościowego. Jest to technika analitycznie bardzo wymagająca.

Jako główny, a zarazem ogólny cel pracy Autor wskazuje zastosowanie metabolomiki celowanej w analizie zróżnicowanych matryc biologicznych. W celach szczegółowych można wyróżnić dwie kategorie, a mianowicie cele czysto analityczne,

jak zaproponowanie i wdrożenie odpowiednich metod oznaczania stężeń wybranych metabolitów w różnych matrycach i pochodzących od różnych grup pacjentów oraz ambitny cel „diagnostyczny” czyli wykorzystanie uzyskanych wyników i danych klinicznych do próby interpretacji zmian w metabolomie i podłoża molekularnego procesu nowotworzenia. Warto zaznaczyć, że odpowiednie, zwalidowane, pozwalające uzyskać rzetelne wyniki procedury analityczne są jednym z warunków koniecznych skutecznej realizacji celów „diagnostycznych”.

W mojej opinii nieco mylące, w tym rozdziale, jest wskazanie „etapów badań” odpowiadających w rzeczywistości tematyce chronologicznie ułożonych publikacji.

Ze względu na obecność w temacie rozprawy kwestii „złożonych matryc biologicznych” oczekiwałabym raczej połączenia w jeden wątek badawczy publikacji I i IV ze względu na wspólną matrycę (surowicę krwi) i grupę badaną, którą stanowiły kobiety z nowotworem jajnika, guzem łagodnym jajnika oraz grupa kontrolna. Z kolei w publikacji II wykorzystano inną matrycę (mocz) i badania dotyczą innej grupy pacjentów (mężczyzn, u których zdiagnozowano raka lub łagodny przerost gruczołu krokowego). Natomiast w pracy wskazanej jako III etap badań, Doktorant porównuje wyniki analizy metabolomicznej dwóch rodzajów matrycy biologicznej: surowicy krwi oraz płynu mózgowo-rdzeniowego, przy czym materiał badany pochodzi od osób zdrowych.

W kolejnym rozdziale pracy przedstawione zostały przedmiot badań i zastosowana metodyka. W metodologii badań metabolomicznych można wyróżnić trzy etapy, które zasadniczo nie odbiegają od standardowego podejścia w każdym postępowaniu analitycznym, a mianowicie przygotowanie próbki, wykonanie oznaczenia oraz analizę otrzymanych wyników, w tym analizę bioinformatyczną, statystyczną czy chemometryczną. Etap wykonania oznaczenia/analizy często wymaga zastosowania technik wysokorozdzielczych umożliwiających selektywne oznaczenia metabolitów o odpowiednio niskich stężeniach. Doktorant szczegółowo opisuje zastosowaną metodykę przygotowania próbek, natomiast tylko pobieżnie wspomina o analizie statystycznej. Zamiast informacji, że wykonano ją w konkretnym programie (w odniesieniu do publikacji I i II) bardziej wartościowe byłoby wskazanie jakich metod i do jakiego celu użyto.

Rozdział 7 rozprawy zawiera krótki komentarz do każdej z przedstawionych wcześniej publikacji, akcentujący najważniejsze rezultaty przeprowadzonych badań a kolejny rozdział jest podsumowaniem wszystkich publikacji. W pracy zamieszczono także Streszczenie (w j. polskim i angielskim) oraz spis cytowanego piśmiennictwa oraz uchwały komisji bioetycznych zawierające zgodę na wykonanie badań.

Większość wyników przedstawionych przez Doktoranta oceniam bardzo wysoko, mam jednak kilka uwag do samego sposobu podsumowania, które rozmywa znaczenie uzyskanych osiągnięć. Doktorant sformułował aż 12 wniosków, z czego już pierwszy wnioskiem nie jest, a raczej ogólnym i dość oczywistym stwierdzeniem. Natomiast do osiągnięć i wniosków (zamiast wniosku 1) włączyłabym opracowanie (we współpracy z lekarzami) standardów procedur zbiórki surowicy krwi i płynu mózgowo-rdzeniowego do analiz metabolomicznych oraz skuteczne zastosowanie identycznej procedury przygotowania próbki do dwóch różnych matryc i wykonania oznaczeń w jednym cyklu analitycznym. Konsekwencją podziału pracy ze względu na chronologię włączonych publikacji jest też podobne, „sztywne” przedstawienie wniosków. Jak zaznaczyłam wcześniej, praca I i IV ma cechy wspólne i wydaje mi się, że połączenie w jedną grupę wniosków 2, 3, 4 oraz 10, 11 i 12 a szczególnie wniosku 2 i 12 oraz 4, 10 i 11 poprawiłoby wrażenie, a jednocześnie poszerzyło perspektywę. Na pozytywne podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorant potrafi ostrożnie i krytycznie podejść do uzyskanych wyników i ich oceny statystycznej, wskazując także ograniczenia zastosowanych strategii analitycznych.

Z obowiązku recenzenta chciałabym wskazać zagadnienia do dyskusji w trakcie obrony:

- w publikacji II zostały wykorzystane dwie techniki FIA-MS/MS oraz LC-MS/MS. Zabrakło mi w opisie wyraźnego wskazania powodów zastosowania obu tych metod. Cennym uzupełnieniem było także podsumowanie zalet i wad takiego podejścia.
- w publikacji I, gdzie zostały wykorzystane wielowymiarowe metody klasyfikacyjne PLS-DA i DFA (str. 20) znalazła się informacja o stosowanym tzw. preprocessingu danych ( m. in. autoskalowaniu i logarytmowaniu) w celu „to deal with non-normal distribution...”. Chciałabym, żeby Doktorant skomentował potrzebę (lub brak) sprawdzania rozkładu zmiennej i „radzenia sobie” z brakiem rozkładu normalnego w tego typu metodach,
- w pracy II na wykresie pudełkowym przedstawiono wartości średniej, odchylenia i błędu standardowego dla porównywanych grup, a jakie cechy zmiennej są reprezentowane na wykresach typu pudełkowego (box-plot) w pracy I (Fig. 1 i Fig. 2) i pracy IV,
- do żadnej z publikacji nie załączono materiałów dodatkowych (*Supplementary materials*) co utrudnia interpretację wyników. Na usprawiedliwienie Doktoranta dodam, że brakujące pliki zostały doślane,

- w pracy znalazłam nieliczne literówki i niezręczności językowe, jak: „analizy **jednozmianowe**” (str. 70) czy też żargon analityczny: „oznaczonych... w surowicach” zamiast w próbkach surowicy (str. 77).

Z wnikliwej lektury rozprawy i niezależnie od kilku uwag krytycznych wynika, że Doktorant dokonał trafnego wyboru tematyki badawczej, osiągnął założone cele a efekty badań przedstawił zgodnie z obowiązującymi standardami akademickimi. Ponadto, doktorant dobrze opanował warsztat naukowy z zakresu analizy metabolomicznej i jest przygotowany do samodzielnego planowania i realizowania badań, co potwierdzają: jego całkowity dorobek publikacyjny (13 prac, IF = 29,216, 300 pkt MNiSW), kierowanie dwoma projektami badań własnych i udział jako wykonawca w trzech projektach finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki oraz ukończenie studiów podyplomowych z zakresu badań klinicznych i biomedycznych badań naukowych.

Biorąc powyższe przesłanki pod uwagę stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymogi ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz.U. Nr 65 poz. 595, z późniejszymi zmianami) i wnoszę o dopuszczenie mgr Szymona Plewy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie uważam, że opublikowany dorobek naukowy Doktoranta zasługuje na wyróżnienie, którego uzasadnienie zawarłam w stosownym wniosku do Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, dołączonym do recenzji.