



UNIwersytet Medyczny w Białymstoku
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny
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, 25.04.2017.

OCENA PRACY DOKTORSKIEJ

pt. „Zastosowanie nowoczesnych strategii metabolomicznych i proteomicznych w charakterystyce raka płuca” wykonanej przez mgr Agnieszkę Klupczyńską w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Treść niniejszej pracy doktorskiej wpisuje się w problematykę naukowo-badawczą Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej UM w Poznaniu, dotyczącą wykorzystania wysoko zaawansowanych technologicznie narzędzi chemii analitycznej do analizy proteomicznej i metabolomicznej płynów ustrojowych w celu diagnostyki różnych chorób. Przedmiotem badań objętych niniejszą rozprawą doktorską jest analiza proteomiczna i metabolomiczna surowicy krwi pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca, w celu poszukiwania markerów wczesnego wykrywania tej choroby, a także oceny patomechanizmu procesu chorobowego.

Rozprawę doktorską mgr Agnieszki Klupczyńskiej stanowi **6 prac** opublikowanych w czasopiśmie o łącznym **IF~16,5**. Do realizacji celu badawczego Doktorantka użyła wysokosprawnej lub ultra-wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z różnymi odmianami spektrometrii mas (HPLC-QqQ-MS/MS, UHPLC-Orbitrap-MS, MALDI-TOF-MS), a także zaawansowaną analizę chemometryczną i statystyczną. Ponadto, do analizy białek pro-angiogennych Doktorantka zastosowała multipleksową analizę immunologiczną z zastosowaniem kulek magnetycznych i detekcją przy użyciu cytometrii przepływową. Zastosowane techniki badawcze charakteryzujące się wysoką czułością, dostarczyły wielu parametrów analizowanych związków, które umożliwiły identyfikację szerokiego spektrum metabolitów, aminokwasów i białek o potencjalnym znaczeniu diagnostycznym. Metody badawcze zostały poddane walidacji, a wyniki badań porównawczych posłużyły do zbudowania modeli dyskryminacyjnych. W swojej pracy Doktorantka zastosowała kompleksową analizę surowicy krwi (narzędzia chemii analitycznej, multipleksowa analiza immunologiczna, analiza chemometryczna), które stanowią aktualnie najwyższy poziom rozwiązań technologicznych w celu uzyskania charakterystycznego obrazu próbki. Obszerny zbiór danych analitycznych został poddany analizie chemometrycznej i zaawansowanej wielowymiarowej analizie statystycznej w celu odzwierciedlenia relacji ilościowych i jakościowych pomiędzy związkami endogennymi i ich metabolitami. Wyniki tych badań pozwoliły określić profil metaboliczny zdrowia lub choroby.

Z powyższych względów, podjęcie przez Doktorantkę niniejszego tematu badawczego uważam za uzasadnione i ważne z punktu widzenia zarówno metodologicznego, poznawczego, diagnostycznego jak i patofizjologicznego. Doktorantka wykorzystwała doświadczenie zespołu badawczego Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej oraz wielu innych badaczy z zakresu proteomiki i metabolomiki chorób nowotworowych z uwzględnieniem dostępnej wiedzy o niedrobnokomórkowym raku płuc. Jakkolwiek metabolomika raka stanowi przedmiot intensywnych badań nad poszukiwaniem markerów tych chorób, to jednak niewiele doniesień dotyczy badań nad niedrobnokomórkowym rakiem płuca. Niemniej jednak na podstawie dostępnej literatury dotyczącej niedrobnokomórkowego raka płuc Doktorantka opracowała zwięzły wstęp i przedstawiła cel pracy oraz logistykę metodologii badań. We „Wstępie” pracy, a także w cyklu prac stanowiących rozprawę doktorską wiele miejsca poświęciła wprowadzeniu czytelnika w wiedzę o patogenezie, diagnostyce i klasyfikacji niedrobnokomórkowego raka płuc, a także analizie proteomicznej i metabolomicznej, walidacji metod, analizie danych łącznie z analizą statystyczną oraz interpretacji wyników badań w kontekście metabolicznych procesów biochemicznych.

Na podstawie uzyskanych wyników badań surowicy pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca Doktorantka wykazała, że w przebiegu tej choroby następują znaczące zmiany ilościowe w obrębie co najmniej ośmiu wolnych aminokwasów, w szczególności ilościowy wzrost stężenia kwasu asparaginowego i jego amidu, cytruliny, histydyny, fenyloalaniny i β -alaniny. Szczególnie interesująca jest konfrontacja tych wyników z podobnymi analizami wykonanymi w populacji azjatyckiej. Doktorantka wykazała, że niezależnie od pochodzenia etnicznego i wpływów środowiskowych, wspólną cechą niedrobnokomórkowego raka płuc jest podwyższenie stężenia fenyloalaniny i obniżenie stężenia ornityny w surowicy krwi. W badaniach tych zastosowano innowacyjną metodologię pozwalającą na oznaczenie 42 aminokwasów i ich pochodnych. Opracowano ponadto metodologię jednoczesnej oceny 6 kwasów organicznych. Szczególnie interesująca jest obserwacja obniżenia stężenia 5-oksoproliny w surowicy pacjentów z rakiem płuca.

Analiza profili peptydowych w surowicy tych pacjentów wykazała istotne statystycznie różnice w stężeniach 10 peptydów i 4 białek. W odniesieniu do białek Doktorantka wykazała wysoki potencjał predykcyjny 10 ligandów lub receptorów czynników wzrostowych, między innymi PDGF, HGF i osteopontyny.

Wiarygodność swoich badań Doktorantka potwierdziła szeregiem testów istotności statystycznej. Stosując wielowymiarową analizę statystyczną głównych składowych (PCA) oraz dyskryminacyjną (PLS-DA) Doktorantka zbudowała modele charakteryzujące się dużym potencjałem poznawczym i predykcyjnym. Poprawność i wiarygodność modeli dyskryminacyjnych Doktorantka zweryfikowała poprzez ich walidację, potwierdzając czułość i swoistość metody kwalifikacyjnej.

Treść pracy doktorskiej zawarta w 6 pracach stanowi obszerną dokumentację ogromu pracy doświadczalnej i koncepcyjnej Doktorantki. 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 Doktorantka sformułowała 14 wniosków podsumowujących. Odzwierciedlają one najistotniejsze elementy poznawcze pracy. Dyskusja zawiera konkluzje przedstawione w części doświadczalnej oraz poprawnie interpretuje

uzyskane wyniki badań na podstawie literatury przedmiotu. Pozwala to pozytywnie ocenić specjalistyczną wiedzę Doktorantki, umiejętność rozwiązywania problemów badawczych, korzystania z literatury stanowiącej przedmiot pracy oraz interpretacji wyników. Z obowiązku recenzenta zwrócę jedynie uwagę na drobne nieścisłości:

Str. 2, akapit 2. Autorka wymienia elektroforezę kapilarną jako technikę separacyjną odwołując się do Ryc. 1, tymczasem nie jest ona umieszczona na rycinie.

Str. 4, ostatni akapit. Autorka niezbyt precyzyjnie sformułowała zdanie, że w analizie celowanej i niecelowanej wykorzystuje się inne platformy analityczne, tymczasem w obu przypadkach wykorzystuje się te same techniki analityczne, a różnice polegają na innym przygotowaniu prób biologicznych i ukierunkowaniu detekcji na określony zbiór związków.

Str. 5, Autorka sugeruje, że analiza metabolomiczna, targetowa, służy ilościowej ocenie metabolitów, podczas gdy może ona posługiwać się również zmianami relatywnymi wyrażonymi np. w procentach.

Str. 17, Rycina 5 przedstawiająca zastosowanie badań metabolomicznych wymaga korekty bowiem sugeruje, że identyfikacja biomarkerów służy walidacji, podczas gdy służy diagnostyce.

Lektura niniejszej pracy nasuwa również refleksję nad doskonaleniem multidyscyplinarnego charakteru analiz metabolomiczno-proteomicznych, które wymagają pogłębionych, specjalistycznych analiz biochemicznych. Wyniki badań Doktorantki posiadają bowiem ogromną wartość nie tylko diagnostyczną, ale również poznawczą. Wykazany przez Doktorantkę wzrost stężenia wielu aminokwasów w surowicy krwi pacjentów z rakiem płuca sugeruje nasilenie degradacji białek i wykorzystanie powstałych aminokwasów w procesie glukoneogenezy w celu uzupełnienia niedoborów energetycznych towarzyszących metabolizmowi tkanki nowotworowej. Szczególnie cenna jest obserwacja wzrostu stężenia fenyloalaniny, która ulega przemianie w fumaran, zasilając upośledzony brakiem substratów cykl Krebsa. Wykazane przez Doktorantkę obniżenie stężenia cytruliny w cyklu mocznikowym upośledza syntezę arginino-bursztynianu, który łączy cykl mocznikowy z cyklem Krebsa, który przez to staje się mniej wydajny w sensie intensywności obrotu i dostarczania substratów energetycznych do łańcucha oddechowego. Wykazany u pacjentów z rakiem płuca wzrost stężenia karnityny nasilającej transport kwasów tłuszczowych potwierdza potrzebę wykorzystania tych związków jako substratu energetycznego w warunkach niedoboru energii. Wzrost ilości niektórych czynników wzrostowych może być następstwem nasilenia glikolizy beztlenowej w tkance nowotworowej. Tego typu analiza biochemiczna może stanowić wartość dodaną w interpretacji wyników analiz metaboliczno-proteomicznych.

Reasumując, uważam, że rozprawa doktorska mgr Agnieszki Klupczyńskiej jest pracą wartościową, poprawnie przygotowaną warsztatowo i wnosi nowe elementy poznawcze w zakresie proteomiki i metabolomiki niedrobnokomórkowego raka płuc.

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

KIEROWNIK
Zakładu Chemii Leków

prof. dr hab. Jerzy Raika