



UNIwersytet MEDYCZNY  
w Białymstoku  
CENTRUM BADAŃ KLINICZNYCH  
15-276 Białystok, ul. M. Skłodowskiej-Curie 24a  
tel. 85 831 81 50

**dr hab. Michał Ciborowski**

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Centrum Badań Klinicznych

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Wojciecha Wojtowicza pt.: *„Badania metabolomiczne procesów nowotworzenia na układach modelowych oraz próbkach pochodzących od pacjentów”*

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Piotra Młynarza (prof. PWR)

z Zakładu Chemii Bioorganicznej Politechniki Wrocławskiej.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska dotyczy wykorzystania metabolomiki do poznania zmian biochemicznych zachodzących w organizmie w wyniku nowotworzenia oraz możliwości zastosowania jednego z komponentów biologii systemowej, metabolomiki, w diagnostyce nowotworów. Przeprowadzone badania dotyczyły nowotworów hematologicznych, tarczycy oraz piersi. Wśród najczęściej występujących nowotworów hematologicznych wyróżniamy ostrą białaczkę szpikową (AML), chłoniak nieziarniczy (nHL) i przewlekłą białaczkę limfatyczną (CLL), i właśnie te choroby były przedmiotem badań Doktoranta. Nowotwór tarczycy, również wybrany przez Doktoranta do badań, jest najczęściej występującym nowotworem endokrynnym, a jego diagnostyka wymaga wykonania biopsji cienkoigłowej guza i przeprowadzenia badań cytologicznych. Także w przypadku nowotworu piersi do postawienia ostatecznej diagnozy niezbędne jest pobranie materiału biologicznego w sposób inwazyjny, najczęściej przez biopsję, i przeprowadzenie badania histopatologicznego oraz cytologicznego.

Kluczowym elementem skuteczności leczenia chorób nowotworowych jest wczesna diagnostyka, w związku z czym poszukiwane są nowe metody i markery diagnostyczne. Duże nadzieje w tym aspekcie wiązane są z metabolomiką. Wielkoskalowe podejście do pomiaru związków drobnocząsteczkowych umożliwia wskazanie metabolitów, których stężenie zmieniło się w wyniku pojawienia się sytuacji patologicznej. Ich pomiar może być stosowany nie tylko do celów diagnostycznych, ale również do oceny stopnia zaawansowania choroby czy skuteczności podjętego leczenia. Ponadto, wskazanie zaburzonych szlaków metabolicznych może przyczynić

się do zaproponowania nowych celów terapeutycznych. Biorąc pod uwagę ciągle rosnącą w Polsce liczbę zachorowań na wybrane przez Doktoranta choroby nowotworowe oraz konieczność poszukiwania nowych metod do ich wczesnej i mniej inwazyjnej diagnostyki uważam podjęty temat badawczy za aktualny i istotny z punktu widzenia społecznego. Ponadto na uwagę zasługuje wybór przez Doktoranta nowoczesnego warsztatu badawczego, jakim są badania metabolomiczne. Wielkoskalowa analiza próbek biologicznych w połączeniu z zaawansowaną analizą bioinformatyczną to odpowiednie narzędzia do rozwiązania postawionego problemu badawczego.

Przedłożona mi do recenzji rozprawa liczy 179 stron maszynopisu i ma typowy układ. Po spisie treści Doktorant zamieścił wykaz skrótów, spis rysunków, wykaz tabel oraz wykaz używanych odczynników, a także wstęp teoretyczny i cel pracy. W dalszej części znajdują się streszczenie, metodologia badań, informacje medyczne o badanych pacjentach oraz cztery rozdziały poświęcone badanym zagadnieniom: choroby tarczycy, nowotwory hematologiczne oraz rak piersi (badania na pacjentkach oraz z wykorzystaniem hodowli komórkowych). Ostatnie części rozprawy to podsumowanie i wnioski przeprowadzonych badań, dorobek naukowy Doktoranta oraz bibliografia.

We wstępie teoretycznym obejmującym 23 strony Doktorant przedstawia „omiczne” komponenty biologii systemowej przedstawiając szerzej, co rozumiałe, metabolomikę. Opisane są różne podejścia do badania metabolomu (metody celowane i niecelowane), wykorzystywane techniki analityczne oraz strategie pracy z danymi wielkoskalowymi, a także metody statystyczne wykorzystywane w tego typu badaniach. Przy opisywaniu technik analitycznych podane są informacje wywołujące u czytelnika dezorientację. Na stronie 23 napisane jest: *„Spektroskopia NMR jednocześnie umożliwia pomiary w limicie detekcji i limicie kwantyfikacji, który jest niższy od wartości uzyskiwanych przez spektrometrię mas. Dodatkowo spektrometria mas umożliwia wysoką czułość i selektywność, która przydatna jest w analizie celowanej.”* Wobec powyższego, która z tych technik analitycznych jest bardziej czuła i charakteryzuje się niższymi limitami detekcji oraz oznaczalności? W części dotyczącej przygotowania widm  $^1\text{H}$  NMR do analizy metabolomicznej Doktorant opisuje różne programy do obróbki widm spektroskopowych NMR. Na uwagę zasługuje wskazówka Doktoranta, iż *„...istotne jest, aby pamiętać o tym, że nawet najlepsze algorytmy warto wizualnie zweryfikować przed rozpoczęciem dalszych analiz”*, co dowodzi jego skrupulatności, a także wiedzy w aspekcie możliwości i ograniczeń algorytmów do wstępnego opracowywania danych spektralnych.

W kolejnym rozdziale Doktorant formułuje jasny i zrozumiały cel pracy. Jest on podzielony na cel ogólny oraz cztery wypunktowane cele szczegółowe odpowiadające różnym aspektom przeprowadzonych badań. Również na cztery części podzielone jest streszczenie będące następną częścią rozprawy doktorskiej.

W części metodologicznej Doktorant opisuje przygotowanie materiału biologicznego do badań metabolomicznych, zastosowane techniki analityczne, przygotowanie widm do analiz, wstępne opracowanie danych, identyfikację metabolitów oraz wykorzystane metody do analizy statystycznej i analizy szlaków metabolicznych. W tej części pada niefortunne sformułowanie odnośnie pobierania od pacjentów materiału do badań: „Surowicę pobierano z żyły obwodowej...”. Jak rozumiem, z żyły pobierano krew pełną do próbek zawierających aktywny krzepnięcia, a następnie po zakończeniu wykrzepiania próbki odwirowano i tak uzyskaną surowicę przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  do czasu wykonania analiz. Brakuje opisu tego etapu badań z wyszczególnieniem rodzaju próbek oraz warunków i parametrów wirowania. Rodzaj próbek ma istotne znaczenie dla wiarygodności uzyskiwanych wyników. Ze względu na interakcję pomiędzy metabolitami a tworzywem z którego wykonane są próbki istotne jest, by wszystkie próbki były pobierane i przechowywane w takich samych próbkach. Ponadto we fragmentach, gdzie opisane jest wirowanie, jego prędkość wyrażona jest w ilości obrotów na minutę (RPM). Wartości te powinny być podane w postaci siły odśrodkowej wirowania  $g$ . W zależności od rodzaju wirówki, wartość RPM odpowiada innej wartości  $g$ . Niektóre opisy wymagają ujednolicenia. W kilku miejscach (np.: strony 45 i 47) użyta jest nazwa Akademia Medyczna we Wrocławiu, natomiast w innych Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, ta druga nazwa obowiązuje od 2012 roku. Dopiero na stronie 47 pojawia się nazwa producenta kuwet do badań NMR, chociaż już wcześniej opisane jest ich użycie do badań. Na tej samej stronie brakuje wartości temperatury w jakiej rozmrażano próbki moczu do badań NMR.

Następny rozdział stanowi zestaw tabel, w których zebrane są podstawowe informacje o badanych pacjentach oraz wyniki dostępnych badań biochemicznych. Moim zdaniem, zmiany wymaga obecny tytuł tego rozdziału, tj. „Informacje demograficzne i medyczne”. Wg encyklopedii PWN, demografia to dyscyplina naukowa, która bada zjawiska ludnościowe zmierzające do wykrycia prawidłowości, którym te zjawiska podlegają. Przedmiotem badań demografii jest populacja, tj. cała ludność zamieszkująca określoną jednostkę terytorialną. Tytuł „Charakterystyka badanych pacjentów” wydaje się bardziej pasować do zawartości tego rozdziału. Ponadto w tytułach niektórych tabel pada niefortunne określenie: „Podstawowe

*dane...pacjentów wykorzystywanych w badaniu*". Lepszym określeniem jest sformułowanie „...biorących udział w badaniu”. W tabelach brakuje również jednostek, w jakich wyrażone są zebrane dane.

Dalsze rozdziały rozprawy poświęcone są poszczególnym badaniom, tj.: badania wybranych chorób tarczycy, analiza nowotworów hematologicznych, badania przesiewowe nowotworów piersi oraz badania nad trójjemnym nowotworem piersi w połączeniu z analizą odpowiadającej temu nowotworowi linii komórkowej. Każdy z tych rozdziałów rozpoczyna się wprowadzeniem, następnie przedstawione są wyniki, a na końcu dyskusja uzyskanych wyników i podsumowanie. Uzyskane wyniki badań są w sposób przejrzysty i zrozumiały przedstawione w postaci 37 rysunków i 26 tabel. W dyskusji uzyskanych wyników Doktorant przedstawia ich własną interpretację odnosząc się także do rezultatów uzyskanych przez innych badaczy. W badaniu dotyczącym chorób tarczycy ciekawym rozwiązaniem było przeprowadzenie fuzji danych uzyskanych dla próbek surowicy i moczu. Było to możliwe dzięki pobraniu obu typów materiału biologicznego od jednego pacjenta. Takie podejście pozwoliło na poprawę jakości uzyskanych modeli wielowymiarowych podnosząc jednocześnie ich potencjał predykcyjny w porównaniu do modeli opartych jedynie na poszczególnych biofluidach. W rozdziale poświęconym nowotworom hematologicznym należy wyróżnić szczegółową dyskusję biochemiczną uzyskanych wyników. Doktorant przedstawia powiązania biochemiczne istotnych statystycznie metabolitów oraz odnosi się do ich roli w chorobach nowotworowych opisanych w innych doniesieniach naukowych. Ogromnym atutem badań przesiewowych nowotworu piersi jest liczba pacjentek, które wzięły udział w badaniu, tj. 322. Wyniki badań metabolomicznych uzyskane w tak dużej populacji mają dużą wartość kliniczną. W tej części badań Doktorant ponownie wykazał się wnikliwością zwracając uwagę na zależność pomiędzy stężeniem histydyny a wiekiem pacjentek, co mogło przyczynić się do zafałszowania uzyskanych rezultatów. Dodatkowe analizy statystyczne pozwoliły zweryfikować zależność pomiędzy stężeniem histydyny, wiekiem pacjentek, a menopauzą. Doktorant sugeruje, że poziom histydyny spada z wiekiem dopiero po przejściu menopauzy. W kolejnym rozdziale kontynuowana jest tematyka chorób nowotworowych piersi. Wyniki uzyskane z mediów hodowli komórek trójjemnego nowotworu piersi zostały zestawione z danymi z surowicy pacjentek chorujących na ten nowotwór. Łącznie 19 metabolitów pokrywało się w wynikach z surowicy i medium hodowlanego, a część obserwowanych zmian była widoczna tylko w jednym z badanych materiałów biologicznych. Doktorant zauważa, że badania na różnych poziomach skompilowania układu biologicznego mogą dostarczyć różnych informacji. Wyniki

badania metabolomiczne przedstawione w tym rozdziale, oprócz techniki  $^1\text{H}$  NMR, zostały również uzyskane przy zastosowaniu chromatografii cieczowej w połączeniu ze spektrometrią mas (LC-MS). Świadczy to o szerokich umiejętnościach analitycznych, jakie posiada Doktorant. Brakuje jednak bardziej szczegółowego przedstawienia wyników badań uzyskanych techniką LC-MS. Doktorant ograniczył się do przedstawienia dwóch rycin z modelami VIP-PLS-DA uzyskanymi dla danych z obu polaryzacji LC-MS. Na stronie 148 napisane jest: „*Wśród metabolitów, których identyfikację potwierdzono z wykorzystaniem obu technik analitycznych LC/MS oraz NMR, zaobserwowano, iż zidentyfikowane metabolity wykazują ten sam przebieg zmian niezależnie od techniki analitycznej.*” Brak jednak listy metabolitów, które zostały zidentyfikowane obydwojema technikami, z wyszczególnieniem czasu retencji i sposobu identyfikacji metabolitów wykrytych techniką LC-MS.

Uzyskane wyniki badań zostały podsumowane w rozdziale 10. W oddzielnych paragrafach Doktorant przedstawia własne wnioski wyciągnięte na podstawie uzyskanych wyników. Są one klarowne i w sposób rzeczowy odpowiadają na postawione cele pracy. Doktorant zauważa, że dzięki zastosowaniu szeregu metod statystycznych możliwe było wydobywanie istotnych informacji, które doprowadziły do poszerzenia wiedzy w zakresie zmian w związkach niskocząsteczkowych zachodzących w związku z pojawieniem się choroby nowotworowej.

W kolejnych rozdziałach zebrany jest dorobek naukowy Doktoranta, publikacje z rozprawy doktorskiej oraz pozostałe prace. Przedstawione osiągnięcia są znaczące, 5 publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej, jedna praca będąca w recenzji oraz jedna w przygotowaniu - we wszystkich tych pracach Doktorant jest pierwszym autorem. Ponadto współautorstwo w 7 kolejnych pracach (w tym 2 w recenzji) świadczy o dużym zaangażowaniu Doktoranta w działalność badawczą zespołu.

Cytowane piśmiennictwo obejmuje 228 pozycji. Są to w większości prace anglojęzyczne opublikowane w ostatnich latach. Piśmiennictwo podzielone jest na części odpowiadające rozdziałom z zastosowaniem oddzielnej numeracji, co czasami utrudnia czytelnikowi przeglądanie bibliografii.

Podsumowując uważam, iż rozprawa doktorska mgr inż. Wojciecha Wojtowicza opiera się na nowatorskich badaniach, które zostały dobrze zaplanowane i przeprowadzone. Uzyskane wyniki poszerzają naszą wiedzę odnośnie zmian w poziomie związków drobnocząsteczkowych wywołanych rozwojem chorób nowotworowych, co może również przyczynić się do opracowania metod do wczesnej diagnostyki nowotworów.

Z poziomu recenzenta nie mogę pominąć kilku błędów stylistycznych i tzw. „literówek”, które zauważyłem czytając tą pracę. Pragnę jednak podkreślić, że zarówno wymienione w recenzji uwagi jak i błędy edytorskie nie podważają wartości merytorycznej przeprowadzonych badań.

Biorąc pod uwagę całość rozprawy doktorskiej stwierdzam, iż spełnia ona warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 poz. 882 z późn. zm.). Wniosuję zatem do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej o przyjęcie niniejszej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr inż. Wojciecha Wojtowicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, ze względu na nowatorski charakter, dużą wartość merytoryczną oraz fakt, iż duża część przeprowadzonych badań została opublikowana w anglojęzycznych czasopismach z listy filadelfijskiej, zwracam się z prośbą do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy.

Białystok, dn. 13.03.2019 r.



dr hab. Michał Ciborowski