



UNIwersYTET GDAŃSKI

dr hab., prof. UG

Sylwia Rodziewicz-Motowidło

Wydział Chemii

Uniwersytet Gdański



Gdańsk, 12.03.2019 r.

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Wojciecha Wojtowicza

**pt. „Badania metabolomiczne procesów nowotworzenia na układach modelowych oraz próbkach pochodzących od pacjentów”**

**wykonanej w Zakładzie Chemii Bioorganicznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej**

**(promotor: dr hab. Piotr Młynarz, prof. PWr)**

Tematyka dysertacji opiera się na zastosowaniu metabolomiki, jako narzędzia diagnostycznego w wykrywaniu różnego typu nowotworów. Wraz z postępującym rozwojem technologicznym i coraz większą wiedzą na temat biologii nowotworów, diagnostyka onkologiczna zyskuje jako nowe narzędzia służące do szybkiego, bezpiecznego i skutecznego wykrywania nowotworów. Zadaniem diagnostyki onkologicznej jest sprawdzenie, czy w ogóle mamy do czynienia z chorobą nowotworową, a jeśli tak, to jaki jest stopień zaawansowania schorzenia. Skuteczna diagnostyka onkologiczna wymaga zastosowania szeregu dostępnych metod. Wykorzystuje się w niej metody obrazowe, morfologiczne, morfometryczne, biochemiczne, cytogenetyczne i molekularne. Pomimo ogromnego postępu technologicznego w zakresie diagnostyki raka, fundamentalną rolę w procesie rozpoznawania stanów patologicznych nadal odgrywa prawidłowa diagnoza oparta na wiedzy i doświadczeniu lekarzy. Niezbędna jest również ścisła współpraca wszystkich specjalistów zaangażowanych w proces początkowo diagnostyczny, a następnie leczniczy. Daje to pewność wykorzystania wszystkich dostępnych narzędzi w celu osiągnięcia ostatecznego celu, czyli wyleczenia pacjenta. Wśród dostępnych metod, choć jeszcze niezbyt powszechnych, znajduje się również metabolomika. Jest to nieinwazyjne narzędzie diagnostyczne, które wraz z proteomiką, transkryptomiką i genomiką zajmuje się badaniem złożonych oddziaływań jakie zachodzą w układach biologicznych. Skorelowane wyniki badań pochodzących z tych wszystkich dziedzin nauki (tzw. „-omiki”) stanowią pełny obraz procesów zachodzących u osób cierpiących na nowotwory. Metabolomika zajmuje się badaniem i analizą metabolitów (pierwotnych i wtórnych) w komórkach i w tkankach żywych organizmów do których należą niskocząsteczkowe związki, pochodne aminokwasów, lipidów, węglowodanów, nukleotydów czy hormonów. Zastosowanie metabolomiki w odniesieniu do organizmu ludzkiego stwarza możliwości znalezienia biomarkerów stanów chorobowych. Badania prowadzone przez mgr inż. Wojciecha Wojtowicza dotyczą zagadnień badania profilu metabolomicznego w płynach ustrojowych ludzi chorych na różnego typu nowotwory oraz mediach hodowlanych komórek nowotworowych.

Podjęta przez Doktoranta tematyka pracy doktorskiej jest bardzo aktualna zarówno w aspekcie problematyki badawczej (badanie profili metabolomicznych płynów ustrojowych chorych na nowotwory) a także w aspekcie wyboru i opracowania nowoczesnego narzędzia badawczego (metabolomika). Wszystkie prace badawcze zostały

wykonane w grupie dr hab. Piotra Młynarza, prof. PWR na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej. Dr hab. Piotr Młynarz od wielu lat prowadzi badania nad określaniem profili metabolicznych w kontekście zastosowań ich w diagnostyce medycznej.

Rozprawa doktorska obejmuje 179 stron maszynopisu i podzielona jest na 8 głównych rozdziałów (tj. wstęp teoretyczny, cel pracy, streszczenie, metodologia, informacje demograficzne i medyczne, część eksperymentalna rozbita na cztery rozdziały, podsumowanie i wnioski oraz literatura). Rozdziały te poprzedza wykaz używanych skrótów oraz spis rysunków i tabel. Na końcu pracy doktorskiej znajduje się spis piśmiennictwa, który obejmuje 228 pozycji literaturowych. W pracy umieszczono kilkanaście tabel, rysunków i schematów, które znacznie ułatwiły zrozumienie przedstawionych wyników. Praca ma układ typowy dla prac z zakresu chemii.

W pierwszym rozdziale, zatytułowanym WSTĘP TEORETYCZNY, Doktorant w sposób zwięzły wprowadził czytelnika w tematykę tzw. biologii systemowej. Rozdział ten zawiera opis dotyczący zastosowania metabolomiki w kontekście innych nauk „-omicznych”. Opis ten jest napisany w sposób bardzo przejrzysty i w tym miejscu zachęcam Doktoranta do napisania polskojęzycznego artykułu na temat metabolomiki, co z pewnością posłużyłoby młodym adeptom nauki jako materiał szkoleniowy. Następnie Doktorant scharakteryzował bardzo krótko podstawy teoretyczne techniki NMR oraz opisał zastosowanie tej techniki do badań metabolomicznych. W rozdziale tym dowiadujemy się na przykład, że oprócz „odcisków palców”, które znamy ze spektroskopii, w metabolomice pojawiają się również „odciski stopy”. Na uwagę zasługuje w mojej opinii opis przetwarzania danych NMR, lektura tego fragmentu pokazuje jak bardzo, na końcowy wynik badania wpłynąć może wiele czynności pośrednich (np. korekcja fazy, linii bazowej czy sygnałów rezonansowych widm NMR). Doktorant nieco szerzej omówił we wstępie stosowane w metabolomice metody matematyczne a mianowicie jedno- i wielowymiarową analizę danych, w tym analizę składowych głównych PCA, analizę dyskryminacyjną z użyciem metody PLS-DA oraz OPLS oraz selekcję zmiennych w modelach PLS. Uważam, że umiejętność właściwej analizy danych pozwala na krytyczną ocenę uzyskanych wyników. Zauważyć należy, że analiza danych metabolomicznych, pochodzących z widm NMR jest szczególnie trudna ze względu na obszerną ilość danych i zmiennych, które są wynikiem różnorodności materiału biologicznego.

Po wstępie teoretycznym Doktorant, przedstawił główny cel badawczy swojej pracy, który polegał na **określeniu możliwości diagnostycznych metod metabolomicznych oraz wyznaczeniu ścieżek metabolicznych, których funkcjonowanie jest zaburzone poprzez procesy nowotworowe**. Postawiony sobie cel badawczy postanowił zrealizować poprzez wykonanie analizy metabolomicznej płynów ustrojowych pacjentów chorych na wybrane choroby tarczycy (guz tarczycy nie będący tkanką nowotworową, gruczolak pęcherzykowy tarczycy oraz nowotwór tarczycy), nowotwory hematologiczne i nowotwory piersi, w oparciu o widma  $^1\text{H}$  NMR. Dodatkowo Doktorant postanowił sprawdzić jakie są różnice i podobieństwa w profilu metabolicznym pomiędzy płynami ustrojowymi pacjentów chorych na nowotwór a medium hodowlanym, pochodzącym z hodowli nowotworowej linii komórkowej.

Po przedstawieniu celu badawczego, w rozdziale zatytułowanym METODOLOGIA Doktorant opisał wykorzystywane przez siebie techniki eksperymentalne tj.: hodowla komórkowa, przygotowanie próbek surowicy i moczu, wykonanie eksperymentów NMR, przygotowanie i analiza widm, korekta sygnałów  $^1\text{H}$  NMR oraz ich normalizacja a także jedno- i wielowymiarowa analiza danych metabolicznych. Na podstawie tego opisu można z całą pewnością stwierdzić, iż zdobył On warsztat badawczy w zakresie: przygotowania materiału biologicznego do badań metabolomicznych, rejestracji widm  $^1\text{H}$  NMR oraz przetwarzania i statystycznej analizy danych.

Kolejny rozdział, zatytułowany INFORMACJE DEMOGRAFICZNE I MEDYCZNE, zawiera zestaw tabel w których umieszczone zostały dane pacjentów, którzy wyrazili zgodę na badanie ich płynów ustrojowych. Dane zawarte w tabelach zostały wykorzystane przez Doktoranta podczas dyskusji i analizy uzyskanych danych metabolicznych. Uważam jednak, że nie powinny one stanowić integralnej części pracy doktorskiej mgr inż. Wojtowicza, gdyż nie wynikają z bezpośredniej pracy badawczej Doktoranta. Ten fragment pracy w mojej opinii powinien stanowić jedynie załącznik do pracy.

W kolejnych czterech rozdziałach rozprawy doktorskiej mgr inż. Wojtowicza przedstawione zostały wyniki jego prac. Rozdziały te zostały podzielone według analizowanego materiału badawczego. I tak w pierwszym z nich przedstawione zostały wyniki badań metabolicznych wykonanych dla płynów ustrojowych pacjentów cierpiących na wybrane choroby tarczycy. Uzyskane wyniki pozwoliły na opracowanie modeli, które mogą być zastosowane do diagnostyki pacjentów z gruczolakami pęcherzykowym tarczycy. Natomiast obliczone modele, które miały służyć różnieniu poszczególnych jednostek chorobowych tarczycy nie sprawdziły się. Doktorant wytłumaczył to faktem występowania podobnego profilu metabolicznego płynów ustrojowych u osób posiadających zmiany w gruczole tarczycy oraz lokalnym charakterem zmian patologicznych. W kolejnym rozdziale przedstawione zostały wyniki z analizy metabolicznej płynów ustrojowych pacjentów cierpiących na nowotwory hematologiczne. Uzyskane wyniki dały podstawę do zrozumienia metabolicznych zmian biochemicznych zachodzących w wybranych nowotworach hematologicznych. Oprócz tego, opracowane wyniki umożliwiają również klasyfikację nowotworów hematologicznych w oparciu o różnice w ich składzie biochemicznym. W trzecim podrozdziale opisane zostały wyniki analiz metabolicznych płynów ustrojowych pacjentów z nowotworem piersi. Przeprowadzone przez mgr Wojciecha Wojtowicza badania pozwoliły na stwierdzenie, iż metabolomika może być skutecznym narzędziem diagnostycznym do prowadzenia badań przesiewowych nowotworu piersi. Dodatkowo, niezależnie od rodzaju nowotworu piersi Doktorantowi udało się wyznaczyć zestaw czterech metabolitów, umożliwiających różnienie poszczególnych stadiów nowotworu piersi (I oraz II). W ostatnim z czterech podrozdziałów mgr inż. Wojtowicz porównał profile metaboliczne płynu ustrojowego osób chorych na nowotwór piersi z medium hodowlanym zbieranym podczas hodowli linii komórkowej raka piersi MDA-MB-468. Uzyskane wyniki pokazały, że profil metaboliczny obu płynów różni się, co wynika z faktu iż płyny ustrojowe zawierają metabolity całego organizmu powstające w odpowiedzi na zachodzące procesy nowotworowe.

W kolejnym rozdziale, zatytułowanym PODSUMOWANIE Doktorant przedstawił najważniejsze wyniki swojej dysertacji. Do najważniejszych osiągnięć pracy stanowiących jednocześnie element nowości naukowej zaliczam pokazanie możliwości zastosowania metabolomiki do badań diagnostycznych wybranych chorób nowotworowych oraz pokazanie różnic w profilu metabolicznym płynów ustrojowych pochodzących od jednego pacjenta.

Uważam, że część doświadczalna pracy doktorskiej została dobrze zaplanowana a prezentacja i omówienie wyników są przeprowadzone poprawnie. Poniżej, z obowiązku recenzenta, wymieniłam najważniejsze pytania oraz drobne uwagi dotyczące dysertacji:

- (1) Proszę o wyjaśnienie danych umieszczonych w Tabeli 5.
- (2) W pracy znalazłam informację, iż surowicę pobierano na czczo od uczestników badania. Czy rzeczywiście pobierano od pacjentów surowicę czy może krew? Jeśli krew to w jaki sposób pozyskiwana była surowica?
- (3) Czy w badaniach nad nowotworami piersi pacjentami były kobiety czy również mężczyźni, bo z opisu trudno to ocenić?
- (4) W podsumowaniu brakuje mi jednoznacznej informacji na temat konkretnych metabolitów które mogą stanowić marker w nowotworach tarczycy, nowotworach hematologicznych czy w nowotworach piersi.

- (5) Czy według Doktoranta technika diagnostyczna oparta na metabolomice wykorzystującej widma NMR ma przyszłość, biorąc pod uwagę fakt, że przygotowanie i analiza danych jest bardzo trudna i wymagająca dużego doświadczenia?
- (6) W pracy doktorskiej znajdują się liczne błędy stylistyczne, które miejscami utrudniały zrozumienie tekstu. W tym względzie zabrakło konsekwencji i staranności na etapie redakcji ostatecznej wersji maszynopisu. Jako przykład podam jedynie kilka z nich: (a) str. 21: „w literaturze możliwe jest natknięcie się na różne definicje tych samych podejść do eksperymentów metabolomicznych”; (b) str. 27: „Jednakże istotne jest, aby pamiętać o tym, że nawet najlepsze algorytmy warto wizualnie zweryfikować przed rozpoczęciem dalszych analiz”. Jest to bardzo cenna uwaga, gdyż podobnie jak Doktorant uważam, że warto wizualnie weryfikować wszystko i wszystkich; (c) str. 41: „zarówno mocz jak i surowica zawierają informacje...”; (d) str. 44: „Każda wyznaczona godzina była wykonana w tryplikatach”. Proszę o wyjaśnienie tej myśli, gdyż pomimo wielkiej wyobraźni nie byłam w stanie zrozumieć tego zdania.
- (7) Uważam, że wykaz skrótów i wykaz odczynników znajdujący się na początku rozprawy nie powinien być rozdzielony dziewięciostronicowym wykazem rysunków i tabel.
- (8) Na osobny komentarz zasługuje również rozdział zatytułowany BIBLIOGRAFIA. Nie rozumiem dlaczego każdy podrozdział dysertacji ma osobno numerowaną literaturę? Dodatkowo, literatura nie jest cytowana w jednolity sposób. W tym względzie również zabrakło Doktorantowi konsekwencji i staranności.

Przytoczone uwagi krytyczne nie mają istotnego charakteru i nie podważają w żadnej mierze wysokiej wartości rozprawy i mojej bardzo pozytywnej jej oceny. Reasumując, uważam, że cele pracy zostały w pełni zrealizowane. Rozprawa doktorska mgr inż. Wojciecha Wojtowicza to bogaty, solidny i wartościowy materiał doświadczalny. Kandydat wykazał się ponadto znajomością nowatorskiej, w skali krajowej, techniki metabolomicznej i udowodnił jej zastosowanie jako narzędzie w diagnostyce medycznej. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż uzyskane wyniki badań opublikowane zostały w czasopiśmie o wysokiej randze naukowej tj. *Oncotarget*, *Metabolomics* czy *Scientific Reports*. Na opublikowany dorobek mgr inż. Wojciecha Wojtowicza łącznie składa się 5 artykułów opublikowanych w czasopiśmie indeksowanym w JCR oraz 2 artykuły będące w trakcie recenzji.

Podsumowując, stwierdzam, iż przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska w pełni odpowiada wymogom stawianym pracom doktorskim (Ustawa z dnia 14 marca 2003 r., Dz.U.03.65.595 wraz z późniejszymi zmianami (Dz. U. z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620 i Nr 182, poz. 1228 oraz z 2011 r. Nr 84, poz. 455)). W tym odniesieniu wnoszę do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie mgr inż. Wojciecha Wojtowicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,

Sybilina Rodziewicz-Motowidło