



Prof. dr hab. Maciej Stobiecki

Poznań 12.03.2017

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Roś-Mazurczak
pt. „Analiza lipidomu surowicy i wykorzystanie spektrometrii mas w diagnostyce
chorób nowotworowych”, wykonanej w Centrum Badań Translacyjnych i Biologii
Molekularnej Nowotworów, Centrum Onkologii Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curi,
Oddział w Gliwicach**

Charakterystyka tematyki badawczej

W ostatnim dwudziestoleciu dzięki rozwojowi technik spektrometrii mas i opracowaniu odpowiednich strategii analitycznych nastąpił szybki rozwój podejść wykorzystujących metody profilowania biopolimerów (kwasy nukleinowych oraz białka) oraz różnych klas metabolitów pierwotnych i wtórnych przy zastosowaniu powyższej metody fizykochemicznej.

Celem przeprowadzonych analiz było określenie możliwości identyfikacji biomarkerów stanów chorobowych w procesach nowotworzenia. Drugi rozwiązywany problem dotyczył przewidywania skuteczności prowadzonych metodami farmakologicznymi/chemicznymi lub wykorzystujących naświetlania promieniowaniem jonizującym terapii leczniczych.

Całościowe podejście do procesów chorobowych z wykorzystaniem danych uzyskiwanych na różnych poziomach molekularnych (transkryptom/proteom/metabolom) w kolejnych etapach przebiegu różnych schorzeń pozwoli na lepsze definiowanie mechanizmów przebiegu chorób zgodnie z teorią biologii systemów. Tak sformułowane podejścia badawcze wymagają stosowania odpowiednich, wysokoprzepustowych metod analitycznych

pozwalających na badanie dużych ilości próbek (metody wysokoprzepustowe) z odpowiednią czułością i powtarzalnością oraz wykorzystania właściwych metod obliczeń statystycznych oraz podejść bioinformatycznych umożliwiających korzystanie z istniejących baz danych zawierających informacje na temat przebiegu procesów transkrypcji, syntezy białek oraz przebiegu szlaków metabolicznych, co pozwoli na ostateczną interpretację zebranych dużych ilości danych. Takie holistyczne podejście zgodne z teorią biologii systemów może pozwolić na precyzyjne określenie mechanizmów przebiegu różnych chorób w organizmie człowieka, a także na optymalizację procesów leczenia wielu chorób.

Ze względu na olbrzymi zakres zagadnień badawczych na różnych poziomach molekularnych związany z diagnozowaniem i leczeniem stanów rakowych oraz obecny stan wiedzy w tej tematyce Doktorantka podczas przygotowania rozprawy doktorskiej zajęła się sprawdzeniem możliwości wykorzystania podejścia bazującego na profilowaniu metabolitów, ze szczególnym uwzględnieniem lipidów. Podczas przygotowywania rozprawy doktorskiej kandydatka skoncentrowała się na sprawdzeniu możliwości wykorzystania technik spektrometrii mas: Maldi ToF i EI/GC/MS do profilowania lipidów i metabolitów pierwotnych i wtórnych w próbkach osocza krwi pacjentów chorych na raka płuc, lub poddawanych chemo- lub radioterapii w chorobach raka prostaty lub głowy i szyi. Dla każdej grupy osób chorych i poddawanych terapii dobrana była odpowiednio liczna grupa osób stanowiących kontrolę. Godnym podkreślenia jest fakt, że we wszystkich grupach badawczych Pani Roś-Mazurczyk dysponowała wiarygodnymi liczbami obiektów badawczych umożliwiającymi statystyczną obróbkę uzyskanych wyników profilowania metodami spektrometrii mas.

Ocena rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska została napisana w tradycyjnym układzie na 117 stronach. W jej skład wchodzi streszczenia w języku polskim i angielskim. Po nich oraz spisie zamieszczonych skrótów, w kolejnej części został sformułowany zwięźle Cel Pracy.

Pierwszym rozdziałem jest Wstęp, w tej części został opisany stan wiedzy na temat uprawianej problematyki badawczej zarówno od strony biologicznej oraz analitycznej, jak i medycznej. Autorka zdefiniowała i skomentowała podstawowe pojęcia na których oparte zostały jej badania, to znaczy teorii biologii systemów oraz metabolomiki, a także krótko opisała metody analityczne stosowane przez nią podczas przygotowywania pracy. W odczuciu oceniającego rozdziały poświęcone zagadnieniom analitycznym nie zostały opisane w sposób wystarczająco wyczerpujący. Również nie poświęciła kandydatka zbyt dużo uwagi

na przedstawienie zagadnień związanych z możliwościami przeprowadzenia obliczeń statystycznych wykorzystywanych podczas opracowania wyników analiz profilowania metabolitów oraz celowanej analizy lipidów, a także możliwej do przeprowadzenia analizy bioinformatycznej. Część wstępu literaturowego poświęcona została zagadnieniom medycznym, opisowi wybranych do badań nowotworów oraz oddziaływania promieniowania jonizującego na organizm osób poddawanych leczeniu metodami chemio- i radioterapii.

Kolejny rozdział stanowi część doświadczalna w której przedstawiono metodykę prowadzonych prac analitycznych, szczególnie przygotowanie próbek surowicy do izolacji lipidów i metabolitów oraz procedura ich ekstrakcja i prowadzenie analiz metodami Maldi ToF i GC/MS. Według oceniającego w części poświęconej opisowi przeprowadzonych doświadczeń poświęcono zbyt mało miejsca opisowi problematyki obliczeń statystycznych i analizie bioinformatycznej.

W rozdziale trzecim i czwartym zostały przedstawione uzyskane wyniki analiz profilowania metabolitów oraz lipidów oraz ich interpretacja wraz z dyskusją. Podczas omówienia wyników profilowania lipidów metodami Maldi ToF nie została poruszona w odpowiedni szczegółowy sposób kwestia przebiegu procesu jonizacji lipidów, szczególnie problem związany ze skutecznością protonowania cząsteczek (jony $[M+H]^+$) poszczególnych klas lipidów w analizowanym materiale w procesie jonizacji Maldi, w zależności od ich budowy.

W mojej ocenie nie została przeprowadzona dogłębnie ocena wykonanych analiz ze względu na możliwości wykorzystywania wyników profilowania metabolitów i lipidów pod kątem występowania biomarkerów chorób nowotworowych (rak płuca) jak i wskaźników oceny przebiegu chemo- i radioterapii oraz rokowań skuteczności i prawidłowości jej przebiegu w przypadku raka prostaty i nowotworów regionu głowy i szyi. Szczególnie brakuje informacji o zidentyfikowanych metabolitach przy wykorzystaniu metody GC/MS, w tym przypadku nie zostały podane również informacje o stosowaniu standardów wewnętrznych podczas analiz.

W czasie czytania rozprawy doktorskiej natrafiłem na szereg sformułowań nie niosących żadnych informacji lub dotyczące stosowania niezbyt szczęśliwych sformułowań nomenklaturowych. Na przykład:

1. „Profilowanie molekularne” jest pojęciem nigdzie nie zdefiniowanym/określonym w pracy.

2. W pracy podano informację o wykorzystaniu jednej, określonej metody ekstrakcji lipidów, nie została przeprowadzona walidacja skuteczności ekstrakcji lipidów.
3. Autorka pracy nie podała w części eksperymentalnej w jaki sposób określono indeksy retencji poszczególnych analitów podczas analiz GC/MS.
4. Opis spektrometru masowego Maldi ToF w części eksperymentalnej pracy jest zbyt ogólny, szereg dodatkowych danych jest potrzebnych do oceny warunków pracy przyrządu w czasie wykonywania analiz. Najpoważniejszym brakiem jest brak informacji o rozdzielczości uzyskiwanej w analizatorze spektrometru podczas wykonywanych analiz. W przypadku systemu GC/MS wykorzystywanego do podczas profilowania metabolitów opis parametrów aparaturowych jest bardziej kompletny.
5. W całej pracy podczas omawiania zarejestrowanych widm masowych jest mowa o pikach, a nie jonach (brak informacji jakiego typu jony $[M+H]^+$ lub fragmentacyjne podczas procesu jonizacji ESI) były identyfikowane po zarejestrowaniu przy określonych wartościach m/z .
6. W tabeli 3.2-2 zamieszczono informacje o zidentyfikowanych związkach, pewne wątpliwości oceniającego wzbudza niska liczba rozpoznanych związków, a także brak informacji w jaki sposób były modyfikowane kolejne identyfikowane substancje (liczba podstawionych grup trimetylosililowych). Ponadto, brakuje informacji o zidentyfikowanych związkach, których stężenia w próbkach nie ulegały zmianom.

W pracy znajdują się liczne błędy maszynowe i literówki, które powinny zostać poprawione przed dalszym wykorzystaniem zebranych danych.

Należy jednak podkreślić, że oceniana praca jest pionierską w skali polskiej próbą wykorzystania danych zebranych na poziomie metabolitów oraz lipidów izolowanych z osocza krwi do porównania i oceny stanów chorobowych w przypadku dużych populacji osób chorych na nowotwory. Uzyskane wyniki wysokoprzepustowych analiz wykonanych przy wykorzystaniu różnych technik spektrometrii mas, przystosowanymi do analizy skomplikowanych mieszanin stanowią bazę wyjściową możliwą do wykorzystania w celu poszukiwania biomarkerów stanów chorobowych podczas kontynuacji badań klinicznych. Podsumowując należy stwierdzić, że rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Roś jest oryginalnym osiągnięciem Autorki. Ma walory zarówno poznawcze, jak i potencjalnie

aplikacyjne. Opracowany przez Doktorantkę podczas przygotowania pracy model badawczy powinien być podstawą do dalszych działań w kierunku poznania metabolomu i lipidomu.

Niezależnie od wielu uwag krytycznych dotyczących przedstawionych wyników wykorzystania spektrometrii mas do analizy surowicy krwi metodą profilowania ma ona zalety głównie jako metoda przesiewowa. Pozwala na bezpośrednią analizę złożonej mieszaniny bez konieczności frakcjonowania. W wypadku analizowania frakcji lipidów podejście z wykorzystaniem techniki Maldi ToF charakteryzuje się wysoką czułością i tolerancją na zanieczyszczenia obecne w próbce pod warunkiem wykluczenia ich wpływu na proces krystalizacji matrycy oraz posiadanie odpowiednich informacji doświadczalnych na temat wydajności wzbudzania poszczególnych klas lipidów. Nie bez znaczenia jest też fakt, że wiele próbek może być analizowanych w krótkim czasie w standardowych warunkach.

Wszystkie elementy prac badawczych zawarte w opiniowanej rozprawie powodują, że takie ujęcie problematyki diagnostyki biomedycznej należy uznać za aktualną i ważną tak dla profilowania surowicy krwi na poziomie metabolitów/lipidów, jak również z punktu widzenia biologii nowotworów.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji praca wnosi poważny wkład w poznanie zagadnień związanych z możliwościami analitycznego wykorzystania technik spektrometrii mas (GC/MS oraz Maldi ToF/ToF) w badaniach zmian w profilach metabolitów oraz lipidów obecnych w osoczu krwi osób chorych na kilka rodzajów nowotworów (nowotwór płuc, prostaty i regionu głowy i szyi), a także możliwości prognozowania skuteczności leczenia po zastosowaniu metod chemo- i radioterapii. Zauważone podczas czytania rozprawy doktorskiej dość liczne nieścisłości oraz błędy nie mają szczególnie istotnego znaczenia dla oceny merytorycznej wartości pracy.

Wnioskuje więc o przyjęcie rozprawy doktorskiej przez Wysoką Radę Naukową Centrum Onkologii Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie oraz dopuszczenie autorki, mgr Małgorzaty Roś-Mazurczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Maciej Stobiecki

