



Politechnika Łódzka, Wydział Chemiczny
Instytut Chemii Ogólnej i Ekologicznej
90-924 Łódź, ul. Żeromskiego 116
tel. +48 42 631-30-91, fax +48 42 631-31-28

Prof. dr hab. inż. Joanna Kałużna-Czaplińska

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Patrycji Mojsak zatytułowanej

„Wykorzystanie chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas do poszukiwania metabolitów związanych z mikrobiomem jelitowym, wskazujących na ryzyko rozwoju cukrzycy typu 2”

wykonanej w Laboratorium Metabolomiki, Centrum Badań Klinicznych,

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Promotorem pracy doktorskiej jest

Prof. dr hab. n. med. Michał Ciborowski

Ocena wyboru tematyki badawczej

Obecnie w celu lepszego zrozumienia wpływu różnych czynników na występowanie wielu chorób, szczególnie tych związanych z zaburzeniami metabolicznymi prowadzi się badania z zakresu metabolomiki i lipidomiki. Zapewniają one nowe możliwości nie tylko poznania choroby, ale także opracowania skutecznych interwencji terapeutycznych. Profilowanie metaboliczne może być obiecującym narzędziem służącym do oceny zmian patologicznych oraz do wczesnego diagnozowania i prognozowania rozwoju choroby. Ponadto, badania profilowe w połączeniu z wielowymiarową analizą statystyczną dają szersze spojrzenie na stan zdrowia pacjenta. Profilowanie różnych płynów ustrojowych lub tkanek odzwierciedla także złożone interakcje białek, genów oraz środowiska wewnętrznego i zewnętrznego organizmu. Zastosowanie nowoczesnych i czułych metod analitycznych wykorzystywanych do oznaczania potencjalnych markerów u chorych pacjentów lub zagrożonych rozwojem choroby stanowi potężne narzędzie do identyfikowania zaburzonych szlaków metabolicznych oraz wykrywania nowych markerów do wczesnego diagnozowania, monitorowania i oceny progresji choroby.

Tematyka podjęta w rozprawie doktorskiej przez mgr Patrycję Mojsak dotycząca identyfikacji wybranych metabolitów w płynach ustrojowych z wykorzystaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS) w celu poszukiwania potencjalnych markerów prognostycznych i diagnostycznych cukrzycy typu 2 jest interesująca i dobrze wpisuje się w aktualne trendy badawcze. Ponadto, wykorzystanie techniki analitycznej, w tym wypadku GC-MS w badaniach metabolomicznych jest dużym wyzwaniem z punktu widzenia zakresu prac analitycznych, ale może stać się także alternatywą dla konwencjonalnych analiz biochemicznych.

Ocena formalna i merytoryczna rozprawy

Recenzowana praca mgr Patrycji Mojsak jest przykładem rozprawy doktorskiej w nowej formie. Stanowi ją spójny tematycznie zbiór 3 artykułów naukowych, które zostały opatrzone stosownym opisem. Ponadto, zostały dołączone jako załączniki zgody Komisji Bioetycznej. Na elementy tego opisu składają się: wstęp, opis przeprowadzonych badań wraz z uzasadnieniem podjętych działań i literaturą. Całość stanowi 74 strony. Cytowana literatura obejmuje 180 zagranicznych pozycji naukowych. W dysertacji, w części omówienie prac wchodzących w skład rozprawy został sprecyzowany główny cel i zakres prowadzonych badań. Choć w moim odczuciu ta część powinna znaleźć się jako osobny, wydzielony odpowiednio element rozprawy. Ponadto, w przedstawionym do recenzji materiale, znalazły się: informacje dotyczące innych publikacji naukowych Doktorantki, w liczbie 14, trzy publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej (jako załączniki) oraz oświadczenia współautorów. Te ostatnie potwierdzają niepodważalny wkład mgr Patrycji Mojsak w badania. Pragnę zauważyć, że Doktorantka jest pierwszym współautorem we wszystkich 3 pracach naukowych składających się na dysertację. Wykaz dorobku naukowego Doktorantki w mojej opinii jest dobry. Wskazuje na Jej zaangażowanie w pracę naukową i przemyślane dobieranie czasopism naukowych, pod kątem prezentowanych wyników badań. Wszystkie prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały już opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych i były wcześniej poddane analizie przez niezależnych recenzentów i ocenione przez nich pozytywnie. Dlatego wartość merytoryczna publikacji nie podlega dyskusji i dalszej ocenie. W załączonym wykazie są artykuły, które ukazały się w takich czasopismach naukowych jak: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (Elsevier), *Current Issues in Molecular Biology* (MDPI), *Frontiers in Molecular Biosciences*. Sumaryczny współczynnik oddziaływania (*Impact Factor* – IF) tych prac wynosi 13,024 zgodnie z rokiem ich opublikowania, co daje wysoki, średni IF około 4,341. Wystąpienia konferencyjne (14 konferencji) potwierdzają także dobrą naukową aktywność mgr Patrycji Mojsak. W przeznaczonym do recenzji materiale nie zostały zamieszczone informacje o doświadczeniu zawodowym Doktorantki, na które najczęściej składają się staże naukowe i praktyka laboratoryjna.

Wstęp, opis wyników, ich dyskusja, wnioski dotyczące otrzymanych rezultatów z powołaniem się na odpowiednie odnośniki literaturowe oraz podsumowanie nie budzą zasadniczo moich wątpliwości. W części Wstęp Doktorantka w przystępny sposób omówiła zagadnienia dotyczące cukrzycy typu 2 i stanu przedcukrzycowego oraz zaburzenia związane z mikrobiomem jelitowym i ich powiązanie z potencjalnym wystąpieniem choroby. Z dużym zainteresowaniem czytałam informacje zawarte w rozprawie na temat roli jaką mogą odgrywać probiotyki w leczeniu i zapobieganiu cukrzycy typu 2. Ponadto, zostały scharakteryzowane i szczegółowo opisane zaburzenia związane z mikrobiomem jelitowym. Ważnym, poruszonym w rozprawie zagadnieniem są metabolity związane z florą jelitową występujące w próbkach biologicznych, często na bardzo niskich poziomach stężeń. W tej części zabrakło mi jednak krytycznych informacji na temat oznaczania metabolitów w moczu, materiale biologicznym, uznawanym za nieinwazyjny materiał do badań.

Cel badań został sformułowany czytelnie. Dotyczył poszukiwania nowych metabolitów związanych z mikroflorą jelitową, które mogą być potencjalnymi wskaźnikami ryzyka wystąpienia cukrzycy typu 2. Chcę podkreślić, że realizacja założonego celu głównego i poszczególnych zadań badawczych, które Doktorantka nazwała celami pośrednimi, ze szczególnym uwzględnieniem etapu przygotowania próbek do analiz końcowych z wykorzystaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas wymagały od Doktorantki dużego eksperymentalnego wkładu pracy. W części rozprawy dotyczącej opisu prowadzonych eksperymentów, szczególną uwagę zwrócono na:

- opracowanie odpowiednich procedur analitycznych, które umożliwią oznaczenia metabolitów w surowicy/osoczu z zastosowaniem chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrem mas,
- zastosowanie techniki GC-MS do oceny zmian w profilach metabolicznych osocza u osób z genotypem ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2.

Opracowanie materiału doświadczanego przez mgr Patrycję Mojsak wskazuje na dobre opanowanie przez Nią planowania eksperymentów poprzedzających końcowe oznaczenie analitów w materiale biologicznym.

Za najbardziej wartościowe w przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej uważam:

1. opracowanie nowych procedur analitycznych umożliwiających oznaczenie metabolitów związanych z florą jelitową, od momentu pobierania próbki, przez etap przygotowania próbek surowicy i osocza z uwzględnieniem etapów ekstrakcji i przekształcania analitów w bardziej lotne pochodne,
2. ocenę opracowanej metody pod kątem stabilności, powtarzalności i odtwarzalności pomiarów,
3. wykorzystanie chromatografii gazowej łączonej ze spektrometrią mas z zaawansowanymi podejściami bioinformatycznymi w celu poszukiwania potencjalnych wskaźników stanu przedcukrzycowego i cukrzycy typu 2.

Ważnym elementem rozprawy doktorskiej jest także potencjalny charakter aplikacyjny opracowanych metod analitycznych do wskazania zmian np. w profilu

metabolitów osocza u osób z genotypem ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2 w genie PROX1.

Uwagi

Recenzent oprócz podkreślenia wielu walorów i zalet dysertacji ma także obowiązek wskazania pewnych błędów, uwag i postawienia pytań, co poniżej przedstawiłam. Praca mgr Patrycji Mojsak jest przygotowana starannie, tabele, rysunki, schematy i znajdujące się opisy są dość czytelne, choć zdarzają się błędy. Na przykład, Rycina 3 została częściowo obcięta. Błędnie zostało użyte sformułowanie „oba Agilent Technologies” na str. 45. Doradzam także unikanie stosowania zwrotów typu „powszechnie wiadomo” (str. 63).

Zaprezentowane wyniki badań w nowej formie rozprawy podobają mi się, choć mam zastrzeżenia co do części doświadczalnej pracy, części analitycznej. W moim odczuciu mogłaby ona być napisana bardziej starannie z zachowaniem poprawnego języka chemicznego. Ponadto, panuje niekonsekwencja jeśli chodzi o stosowane jednostki stężeń (np. str. 43), powinny być ujednoczone. Opisy programów temperaturowych są tak przedstawione, że właściwie można się tylko domyślać o co Autorce chodzi (np. str. 55). Opisy przygotowania próbek są omówione także mało starannie, z użyciem żargonu językowego (np. „zmierzone metabolity”, str. 35).

Budzą moją wątpliwość podpisy pod Tabelką 4 i 6, gdzie informacje są zapisane skrótami MDMs z RSD (str. 51 i str. 54). Pojawia się także zwrot „przetestowano 4 programy MeOX...” (str. 52), trudno się domyśleć o co chodzi, proszę o wyjaśnienie. Błędny jest podpis pod Tabelą 7, ponieważ zawartość tabeli i opis pod nią są niezgodne. Rycina 16 (str. 60), brak konsekwencji w numeracji związków (metabolitów) zamieszczonych na chromatogramie.

Wśród innych niedociągnięć w pracy, uwag dyskusyjnych i merytorycznych trzeba wymienić:

- W całym tekście skróty są stosowane nagminnie, panuje w ich zapisach niekonsekwencja, co nie ułatwia czytania pracy. Wykaz skrótów na początku rozprawy jest niekompletny (np. brak wyjaśnienia skrótu WHR (tabela 3, str. 41), HMDB, (str. 29) i jeszcze innych skrótów baz danych zamieszczonych na str. 35). Część ich jest wyjaśniana w tekście, a część podana tylko na początku w wykazie, rodzi się zatem pytanie według jakiego klucza dokonano tego podziału?,
- Część związków w tej samej linii pisana jest za pomocą pełnego nazewnictwa, inna skrótem, (np. nazwy aminokwasów str. 23), pojawiają się też skróty np. „ilości Fruc” (str. 69),
- Skróć RI w wykazie powinien być przetłumaczony jako współczynnik retencji a nie wskaźnik retencji, to drugie tłumaczenie nie jest raczej stosowane przez analityków,
- Skróć IR jest niewyjaśniony, a jak sądzę chodzi w tym wypadku o insulinooporność, choć zapis IR może oznaczać też zupełnie coś innego (np. IR (ang. infrared)),

- Błędne jest stosowanie zwrotów „techniki rozdziału” (np. str. 31, 32) i „ rozdział chromatograficzny”, używamy pojęć techniki separacyjnej, bądź techniki rozdzielania i odpowiednio rozdzielanie,
- Dobrze jest także stosować zwrot zbadanie różnic w poziomach stężeń metabolitów , a nie jak jest np. na str. 46 „zbadanie różnic w poziomie metabolitów”,
- Co to jest pomiar związku ? Proszę o wyjaśnienie (str. 31),
- Co to jest „własna biblioteka”, chyba widm, choć nie jest to napisane (str. 45),
- Co jest Pani największym osiągnięciem (nowością) w optymalizacji metody?
- Co rozumie Pani przez „użyteczność rozpuszczalników” (str.32),
- Czy Rycina 2 została samodzielnie zaproponowana przez Doktorantkę na bazie dostępnej literatury?
- Jakie są wady, zalety, ograniczenia stosowania techniki GC-MS w Pani badaniach? W niewielkim stopniu jest to omówione w pracy, np. na str. 31.,
- Jakie preparaty komercyjnie dostępne zawierające probiotyki mogłyby być Pani zdaniem zastosowane w prewencji cukrzycy?

Podsumowanie recenzji

Stwierdzam, że mgr Patrycja Mojsak wykazała się wiedzą w aktualnej i ważnej tematyce będącej przedmiotem rozprawy doktorskiej. Wskazane w recenzji błędy i uwagi nie umniejszają wartości dysertacji.

Praca spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (aktualne odniesienie do aktu prawnego - tekst jednolity: DzU z 2022 r. poz. 574 z późn. zm.).

Wniosek końcowy

Podsumowując, recenzowana rozprawa mgr Patrycji Mojsak zatytułowana „Wykorzystanie chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas do poszukiwania metabolitów związanych z mikrobiomem jelitowym, wskazujących na ryzyko rozwoju cukrzycy typu 2 ” spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim, zatem wnoszę do Wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Joanna Kałużna-Czaplińska

Łódź, 8 września 2023 roku