



dr hab. Małgorzata Szultka-Młyńska, prof. UMK
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Wydział Chemii
ul. Gagarina 7
87-100 Toruń



RPL/5595/2023
Data: 2023-07-17
UMB

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Patrycji Mojsak

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

wykonanej na Wydziale Lekarskim z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku pod kierunkiem Promotora Pana prof. dra hab. n. med. Michała Ciborowskiego

Zgodnie z definicją Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) oraz American Diabetes Association (ADA) cukrzycę określa się jako grupę schorzeń metabolicznych o zróżnicowanej etiologii, charakteryzujących się występowaniem hiperglikemii, wynikającej z upośledzenia wydzielania lub nieprawidłowego działania insuliny, bądź też współwystępowaniem obu tych zjawisk. Cukrzyca typu 2 jest najbardziej powszechną chorobą przemiany materii, dlatego też uznaje się ją za chorobę cywilizacyjną. Należy do grupy chorób metabolicznych. Zdefiniowanie zespołu metabolicznego oraz jasnych kryteriów jego rozpoznawania posiada istotne praktyczne znaczenie. Pozwala bowiem na wczesną identyfikację osób zagrożonych wystąpieniem cukrzycy typu 2 poprzez wprowadzenie skutecznego leczenia. Ma to szczególne znaczenie w przypadku wymienionych chorób, ponieważ stanowią one główną przyczynę przedwczesnych zgonów wśród ludności europejskiej. Jak się szacuje, na cukrzycę oraz z powodu jej powikłań w ciągu roku w Europie umiera ok. 200 tysięcy chorych, co sprawia że zapobieganie i leczenie zespołu metabolicznego oraz jego poszczególnych składowych stanowi poważne wyzwanie współczesnej medycyny. Wśród czynników ryzyka zespołu metabolicznego na szczególną uwagę zasługuje podwyższony poziom glukozy charakterystyczny dla cukrzycy typu 2, której rozpowszechnienie w krajach o wysokim poziomie rozwoju cywilizacyjnego osiąga skalę epidemii. W przypadku cukrzycy typu 2 problem stanowi zmniejszona wrażliwość tkanek na



insulinę połączona z występowaniem zaburzeń funkcji wydzielniczej komórek β trzustki. Stanowi ona około 90% wszystkich przypadków cukrzycy. Ten typ cukrzycy może przez wiele lat przebiegać w sposób utajony, nie dając jakichkolwiek objawów. Zbyt późno zdiagnozowana lub błędnie kontrolowana prowadzi do wystąpienia wielu niebezpiecznych powikłań, związanych z uszkodzeniem licznych narządów, a także skróceniem długości życia. Dlatego postuluje się podejmowanie badań przesiewowych, prowadzonych w kierunku tego schorzenia, szczególnie u osób z grupy zwiększonego ryzyka, którymi w cukrzycy typu 2 są przede wszystkim osoby starsze. Od pewnego czasu niepokojącym zjawiskiem jest obniżanie się granicy wieku, w którym rozpoznaje się tę chorobę. Przyczynę takiego stanu rzeczy naukowcy upatrują w czynnikach środowiskowych, wśród których największą rolę odgrywa wysokoenergetyczna dieta połączona z brakiem aktywności fizycznej. W patogenezie cukrzycy typu 2 znamioną rolę zatem odgrywać będą czynniki genetyczne oraz środowiskowe.

Jednak według ostatnich doniesień dość znaczącą rolę w etiologii tych schorzeń odgrywa również mikroflora jelitowa. To, że mikroflora jelitowa może wpływać na masę ciała, wrażliwość na insulinę czy też metabolizm cukrów i lipidów, doprowadziło do wysunięcia hipotezy, że zmiany w jej obrębie mogą się przyczyniać do patogenezy otyłości i cukrzycy. Mikrobiota jelitowa to obecnie jeden z najbardziej rozwijających się tematów badawczych. Naukowców szczególnie interesuje możliwość modyfikacji mikroorganizmów jelitowych w celu leczenia lub prewencji wielu dolegliwości, w tym otyłości i pozostałych chorób cywilizacyjnych.

Stąd też, niewątpliwie ważnym aspektem jest opracowanie innowacyjnych rozwiązań, po to aby zapobiegać wyżej opisanym schorzeniom. Praca doktorska Pani mgr Patrycji Mojsak dotyczy opracowania wyselekcjonowanych procedur analitycznych oraz modeli chemometrycznych celem oznaczenia i identyfikacji metabolitów związanych z florą jelitową wskazujących na ryzyko powstania bądź rozwoju cukrzycy. Nadrzędnym celem badań Doktorantki był wkład w rozwój skutecznej profilaktyki, jak i terapii cukrzycy typu 2. Rozprawa ma charakter zbioru 3 powiązanych tematycznie artykułów naukowych (publikacji z listy JCR). Wszystkie prace są wieloautorskie (od 5 do 10 współautorów), we wszystkich Pani Patrycja Mojsak jest pierwszym autorem. Prace zostały opublikowane w czasopiśmie indeksowanym przez bazę Scopus, jednocześnie znajdują się one w wykazie wysokopunktowanych czasopism MEN (sumaryczny współczynnik wpływu $IF=13,024$,



Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (IF=3,935), *Current Issues in Molecular Biology* (IF=2,976) i *Frontiers in Molecular Biosciences* (IF=6,113). Rozprawa liczy 173 strony, składa się z 14 rozdziałów (w tym 180 pozycji literatury), załączonych publikacji, wykazu dorobku naukowego oraz opisu wkładu Doktorantki w realizację poszczególnych prac naukowych.

W toku prowadzonych badań mgr Patrycja Mojsak realizowała wytyczone przez siebie cele jak:

- opracowanie metodyki przygotowania próbek do analiz chromatograficznych z zastosowaniem chromatografii gazowej i spektrometrii mas,
- zastosowanie techniki chromatografii gazowej i spektrometrii mas celem oznaczenia i identyfikacji metabolitów w próbkach surowicy krwi od osób zdrowych (stan przedcukrzycowy, zdiagnozowana cukrzyca typu 2),
- zastosowanie techniki chromatografii gazowej i spektrometrii mas celem oceny zmian w profilu metabolitów w próbkach osocza od osób z genotypem ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2.

W rozprawie doktorskiej zamieszczono cykl trzech spójnych tematycznie artykułów naukowych. W publikacji [1] (praca przeglądowa) Autorka podkreśla, iż zakłócenie mikroflory jelitowej jest coraz częściej związane z patogenezą różnych chorób metabolicznych. Dodatkowo odpowiada ona za produkcję i przemianę metabolitów zaangażowanych w rozwój zaburzeń metabolicznych, takich jak otyłość i cukrzyca typu 2. W niniejszym przeglądzie przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat jej składu i obecności metabolitów w odniesieniu do postępu i rozwoju otyłości i cukrzycy typu 2. Aby zrozumieć zależność pomiędzy metabolitami występującymi w mikroflorze jelitowej a rozwojem zaburzeń metabolicznych, potrzebny jest dokładny ich jakościowy i ilościowy pomiar w próbkach biologicznych. Kał stanowi cenną matrycę biologiczną, której skład może odzwierciedlać stan zdrowia dolnego odcinka przewodu pokarmowego i całego organizmu. Spektrometria mas, głównie w połączeniu z chromatografią gazową lub chromatografią cieczą, jest powszechnie stosowana do pomiaru metabolitów w kale. Jednak profilowanie metabolitów w tak złożonej matrycy, stanowi wyzwanie zarówno z punktu widzenia chemii analitycznej, jak i biochemii. Autorka wskazuje, iż derywatywacja chemiczna jest jedną z najskuteczniejszych metod stosowanych w celu przezwyciężenia tych problemów. W artykule przedstawia obszerne podsumowanie metod derywatywacji metabolitów związanych z



mikroflorą jelitową przed analizą chromatograficzną, które zostały opublikowane w okresie 2015-2020. Dodatkowo przedstawiona metody analityczne stosowane do analizy metabolitów bez etapu derywatywacji. W publikacji [2] Autorka po raz pierwszy przedstawia wyniki badań dotyczących analizy poposiłkowych zmian metabolitów w osoczu za pomocą chromatografii gazowej i spektrometrii mas u mężczyzn bez cukrzycy z różnymi genotypami białka PROX1 do 5 lat przed pojawieniem się stanu przedcukrzycowego. Osiemnastu uczestników badania (12 z genotypem wysokiego ryzyka (HR) i 6 z genotypem niskiego ryzyka (LR)) wzięło udział w testach prowokacyjnych z posiłkami o wysokiej i normalnej zawartości węglowodanów. Uzyskane wyniki wykazały, że oba testy prowokacji posiłkowej wywołały zmiany w profilu 15 metabolitów w osoczu (aminokwasy, węglowodany, kwasy tłuszczowe i inne) u osób z genotypem wysokiego ryzyka, ale nie w przypadku osób z z genotypem niskiego ryzyka. Autorka wskazuje, iż poposiłkowe zmiany stężeń niektórych zidentyfikowanych metabolitów mogą być źródłem potencjalnych specyficznych wczesnych zaburzeń, prawdopodobnie związanych z przyszłym rozwojem cukrzycy typu 2. Zatem dokładne oznaczenie tych metabolitów może być ważne dla wczesnej diagnozy tej choroby metabolicznej. W publikacji [3] Autorka podkreśla, iż zmiany w metabolomie surowicy lub osocza mogą odzwierciedlać dysbiozę mikroflory jelitowej, o której wiadomo również, że występuje u pacjentów ze stanem przedcukrzycowym i cukrzycą typu. Stąd, ważnym zagadnieniem jest opracowanie wiarygodnej procedury analitycznej oznaczania i identyfikacji metabolitów zależnych od mikroflory. Autorka zaznacza, iż chromatografia gazowa ze spektrometrią mas to skuteczne narzędzie umożliwiające wykrywanie szerokiego zakresu metabolitów w próbkach biopłynów z dobrą powtarzalnością i odtwarzalnością, lecz wymaga doboru odpowiednich rozpuszczalników i warunków. Z tego powodu po raz pierwszy przeprowadziła badanie, w którym przeprowadziła optymalizację etapów przygotowania próbek do pomiaru 75 metabolitów związanych z florą jelitową w dwóch matrycach. W celu wskazania statystycznie istotnych metabolitów skorzystano z narzędzi wielowymiarowych.

Z formalnego punktu widzenia oceniana rozprawa obejmuje 173 stron maszynopisu podzielonych na szereg rozdziałów, wśród których można wymienić części typowe dla tego typu dzieł, czyli: wprowadzenie, przegląd literatury, omówienie problemu badawczego, po czy umiejscowiono podsumowanie i wnioski, bibliografia (180 pozycji literaturowych, z czego ok. 85 % to prace starannie dobrane, opublikowane w ostatnim pięcioleciu). Tekst został napisany jasnym i poprawnym językiem. Autorka rozprawy doktorskiej znacząco



utrudniła recenzentowi doszukania się niejasności i uchybień dbając o poprawność, także pod kątem gramatycznym i interpunkcyjnym.

Obowiązkiem recenzenta jest krytyczny komentarz ocenianej pracy. Jednakże, opisy problemu badawczego, jak i sposobu jego realizacji oraz uzyskane wyniki są zaprezentowane w sposób systematyczny i kompleksowy, co więcej poruszają wszystkie ważne aspekty, co świadczy o szerokiej wiedzy Doktorantki i wyjątkowej znajomości tematu. Podjęcie przez Doktorantki niniejszego tematu badawczego uważam za uzasadnione i niezwykle ważne z punktu widzenia metodologicznego i aplikacyjnego. Praca jest nowatorska, a otrzymane wyniki przedstawione zostały po raz pierwszy. Stwierdzam, że postawione cele pracy badawczej zostały w pełni zrealizowane, a osiągnięte wyniki stanowią istotny wkład w rozwój dziedziny.

Chciałabym podkreślić całokształt pracy Doktorantki. Efektem pracy Pani Patrycji Mojsak jest aż 17 publikacji naukowych (IF=61,074), w tym 3 publikacje związane z tematyką doktoratu (IF=13,024). Stanowią one zwartą całość przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej. Tak obszerne badania nie są opisane wcześniej w literaturze. Dodam w tym miejscu, iż tematyka badawcza jest według mojej opinii w pełni aktualna. Ponadto, na dorobek naukowy Doktorantki składa się 14 wystąpień konferencyjnych w formie referatów oraz posterów.

Podsumowując, Doktorantka podczas realizacji projektu doktorskiego uzyskała bardzo bogaty materiał doświadczalny. Dotyczy on bardzo istotnego zagadnienia jakim jest opracowanie metod analitycznych związanych z rozwijaniem nowatorskich metod w zakresie profilaktyki i leczenia cukrzycy typu 2. Dorobek Doktorantki uważam za bardzo istotny. Trzy prace związane z tematyką doktoratu opublikowane w uznanych przez środowisko naukowe czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania, uważam za dowód dojrzałości oraz samodzielności naukowej Kandydatki. Podjęta tematyka jest aktualna i posiada potencjał aplikacyjny. Projekt rozprawy jest przemyślany, cele jasno określone i osiągnięte przy dużym nakładzie pracy. Wnioski są poparte danymi eksperymentalnymi i odniesieniami do stanu wiedzy w literaturze. Uzyskane i opisane w ramach niniejszej pracy wyniki bezsprzecznie poszerzyły oraz usystematyzowały wiedzę w podjętym zakresie naukowym.



Wniosek końcowy

W związku z powyższym z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wszelkie warunki określone w stosownej Ustawie i **wniosuję do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Patrycji Mojsak do dalszych etapów przewodu doktorskiego**. Jednocześnie ze względu na zaangażowanie w pracę badawczą Doktorantki, wartościowy naukowo i wysoki poziom merytoryczny badań, a także bogaty dorobek naukowy pragnę rekomendować niniejszą rozprawę doktorską **do wyróżnienia**.

dr hab. Małgorzata Szultka-Młyńska, prof. UMK