

Łódź, 11.08.2023 r.

Dr hab. n. med. Anna Hogendorf  
Klinika Pediatrii, Diabetologii, Endokrynologii i Nefrologii  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
ul. Sporna 36/50, 91-738, Łódź

## **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 ”**

**na stopień doktora nauk medycznych**

**Promotor pracy: prof. dr hab. n. med. Michał Ciborowski**

Laboratorium Metabolomiki, Centrum Badań Klinicznych

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Cukrzyca typu 2 (T2DM) należy do najbardziej rozpowszechnionych i podstępnych chorób cywilizacyjnych XXI wieku. Pomimo znacznego postępu medycyny oraz coraz lepszego dostępu do technik diagnostycznych, w tym badań molekularnych, określenie kolejnych, poza oczywistymi, specyficznych czynników ryzyka tej choroby jest trudne.

Nowe możliwości w tym zakresie stwarzają analizy metabolomiczne próbek biologicznych w zdrowiu i chorobie. Metabolom, to złożona kompozycja drobnocząsteczkowych związków, o masie molekularnej mieszczącej się w granicach 80 – 1500 Da, należących do różnych klas chemicznych. Wśród nich wyróżnia się m.in. węglowodany, aminokwasy, lipidy, peptydy, minerały, aminy biogenne, nukleotydy, kwasy organiczne, witaminy czy hormony. Metabolity te mogą być ważnymi modulatorami szlaków, odgrywając rolę w rozwoju różnych chorób metabolicznych, w tym także T2DM. Metabolomika więc, w połączeniu z genetyką, transkrytomiką, proteomiką może pogłębić naszą wiedzę na temat mechanizmów molekularnych stojących za rozwojem T2DM, a nawet wskazać szlaki metaboliczne, które mogą być obiecującymi celami terapeutycznymi dla nowych leków.

Co ciekawe, część z tych metabolitów związana jest bezpośrednio z obecnością mikroorganizmów wchodzących w skład tzw. mikrobiomu jelitowego człowieka. Zaburzenia dotyczące ilości, rodzaju i różnorodności mikrobioty są aktualnie przedmiotem tysięcy badań rocznie. Jak pokazują w ostatnim wydaniu *Nature Microbiology* A.W. Walker i L. Hoyles (*Human microbiome myths and misconceptions*. *Nat Microbiol* 8, 1392–1396 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01426-7>), przez lata narosło wokół tego tematu wiele mitów począwszy od błędnie oszacowanej ilości komórek i ciężaru tych mikroorganizmów, po badania jakościowe oraz określanie związku tzw. „patobiomu” i „dysbiozy” z różnorodnymi chorobami.

Doktorantka postawiła sobie za cel dokładną analizę metabolitów związanych z mikrobiomem jelitowym (MDMs), które mogłyby być markerami ryzyka rozwoju T2DM, wykorzystując wysoce powtarzalną i czułą technikę -chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas (GC-MS). Ma ona znacznie lepszą rozdzielczość chromatograficzną niż dotychczas stosowana w badaniach chromatografia ciekła (LC-MS). GC-MS jest więc zdolna w prostszy sposób określić szeroką gamę metabolitów związanych z florą jelitową i rozwojem T2DM. Do badań Doktorantka postanowiła wykorzystać surowicę i osocze, w których stężenie MDMs może być co prawda niższe niż w kale, mimo to związki te przedostają się z jelit do krwiobiegu i mogą odgrywać ważną rolę w modulowaniu metabolizmu gospodarza. Zmiany ich stężenia mogą również świadczyć o pojawieniu się początkowych zaburzeń metabolicznych prowadzących do rozwoju T2DM.

Przed przystąpieniem do analiz Doktorantka dogłębnie przestudiowała istniejące piśmiennictwo, a następnie opracowała metodykę przygotowania próbek do analiz przy użyciu

GC-MS, dostosowaną do pomiaru wybranych MDMs w surowicy i osoczu. Następnie dokonała pomiaru metabolitów w surowicy krwi osób zdrowych, w stanie przedcukrzycowym i ze zdiagnozowaną T2DM.

Stosując tę samą technikę dokonała także oceny poposiłkowych (posiłek wysokowęglowodanowy (WW) i normowęglowodanowy (NW)) zmian w profilu metabolitów osocza u osób z genotypem ryzyka rozwoju T2DM w genie PROX1 w porównaniu do osób z genotypem ochronnym.

Przedstawiona praca doktorska liczy, wraz z załącznikami, 173 strony, podzielone na 14 rozdziałów oraz 180 pozycji, rozważnie dobranego i aktualnego piśmiennictwa. Podstawą do ubiegania się o stopień doktora nauk medycznych jest cykl 3 publikacji o łącznej punktacji 13,024 IF i 310 pkt. MNiSW, w których Doktorantka jest pierwszą autorką.

Artykuły włączone do cyklu to praca poglądowa *“The role of gut microbiota (GM) and GM-related metabolites in diabetes and obesity. A review of analytical methods used to measure GM-related metabolites in fecal samples with a focus on metabolites' derivatization step”* J Pharm Biomed Anal. 2020 Nov 30;191:113617. doi: 10.1016/j.jpba.2020.113617.

oraz dwie prace oryginalne

*“ A preliminary study showing the impact of genetic and dietary factors on GC-MS-based plasma metabolome of patients with and without PROX1-genetic predisposition to T2DM up to 5 years prior to prediabetes appearance “* Curr Issues Mol Biol. Jun 29 2021;43(2):513-528, oraz

*“Optimization of a GC-MS method for the profiling of microbiota-dependent metabolites in blood samples: an application to type 2 diabetes and prediabetes”.* Front Mol Biosci. 2022;9:982672.

Wstęp napisany jest jasno i czytelnie charakteryzuje patomechanizm cukrzycy typu 2 począwszy od czynników genetycznych, poprzez możliwy wpływ metabolitów mikrobiomu jelitowego na rozwój tej choroby, na omówieniu metod analiz metabolomicznych kończąc. Dodatkowo Doktorantka dogłębnie charakteryzuje rolę biologiczną i znaczenie kliniczne probiotyków w zapobieganiu rozwoju cukrzycy typu 2.

Na podkreślenie zasługuje staranność przygotowania warsztatu badawczego. Doktorantka, o czym świadczy pierwsza włączona do cyklu publikacja, dokonała bardzo wnikliwego przeglądu literatury. Okazało się, że do badań z wykorzystaniem GC-MS stosowanych było wiele różnych protokołów przygotowania próbek osocza czy surowicy

istotnie różniących się rodzajem stosowanych rozpuszczalników lub warunków inkubacji oraz odczynników użytych na etapie derywatywacji. Dlatego też Doktorantka dokonała wyboru najczęściej używanych rozpuszczalników i warunków na etapie derywatywacji, a następnie zoptymalizowała protokół przygotowania próbek osocza i surowicy. Najlepszą powtarzalność, odtwarzalność oraz intensywność sygnału wybranych MDMs uzyskała się przy przygotowaniu próbek za pomocą metanolu z dodatkiem wody. Ponadto wykazała, że objętość i stężenie odczynnika do metoksymacji mają największy wpływ na powtarzalność i intensywność oznaczanych metabolitów, podczas gdy warunki procesu derywatywacji w największym stopniu wpływają na kompletność tego procesu. Opracowana metoda pozwoliła na powtarzalny pomiar w próbkach osocza lub surowicy 75 metabolitów związanych z florą jelitową.

Badania zostały przeprowadzone z wykorzystaniem próbek surowicy oraz osocza zgromadzonego podczas realizacji projektu pt: „Rola czynników behawioralnych, antropometrycznych i molekularnych w rozwoju cukrzycy typu 2 – projekt 1000PLUS” 22. Protokół badań uzyskał akceptację Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (nr zgód: R-I-002/290/2008/2009, R-I-002/35/2014 oraz APK.002.239.2022).

W publikacji numer 2 do badań włączono próbki pobrane od 42 pacjentów, u których stwierdzono stan przedcukrzycowy na etapie włączenia do projektu oraz od osób zdrowych. Podczas 5-letniej obserwacji 24 z nich rozwinęło T2DM (grupa T2DM\_T2), a pozostałych 18 pacjentów dalej miało stan przedcukrzycowy.

Na podstawie analizy próbek klinicznych Doktorantka wykazała różnice w profilu metabolitów związanych z florą jelitową pomiędzy osobami ze stanem przedcukrzycowym oraz ze zdiagnozowaną T2DM, a poprzez analizę krzywych ROC, oceniła także użyteczność metabolitów, które w przyszłości mogłyby usprawnić diagnostykę T2DM. Największą zdolność do rozróżniania osób w stanie przedcukrzycowym od pacjentów z T2DM zaobserwowano dla kombinacji siedmiu metabolitów tj. Glu, Leu, OA, SA, Trp, Orn i trans-4-hydroksy-L-Pro. To oryginalne spostrzeżenie autorki pozwala na identyfikację kolejnego potencjalnego wskaźnika rozwoju T2DM. Dokładność diagnostyczną tego panelu metabolitów można dodatkowo zwiększyć, włączając do niego rutynowe parametry diagnostyczne, takie jak np.: FG czy HbA1c. Z punktu widzenia naukowego, niezwykle istotny jest fakt, że AAs wyprodukowane przez GM mogą być wchłaniane w jelitach i akumulowane we krwi. W ten sposób GM może wpływać na poziomy tej grupy metabolitów we krwi, które odgrywają ważną rolę patogenezie T2DM. Oznaczanie więc metabolitów flory jelitowej mogłoby w przyszłości

służyć pomocą przed wdrożeniem odpowiedniego leczenia lub profilaktyki w optymalnym czasie.

GM może być ważnym źródłem zwiększonej ilości rozgałęzionych aminokwasów (BCAAs) i odgrywać kluczową rolę w insulinooporności, co zostało dokładnie opisane we wstępie rozprawy. Jeśli chodzi o BCAAs, zaobserwowano różnice w poziomie Leu, której intensywność była znacznie wyższa u pacjentów z T2DM niż u tych ze stanem przedcukrzycowym. Wyniki przedstawione w tej pracy są zgodne z innymi odkryciami wskazującymi na istotny związek BCAAs (zwłaszcza Leu) z T2DM.

Podwyższony poziom BCAAs prowadzi do akumulacji karnityny w mięśniach, co wywołuje stres oksydacyjny i dysfunkcję mitochondriów, a tym samym pogarsza wrażliwość na insulinę. Niższy poziom Cre w surowicy, może odzwierciedlać mniejszą ilość mięśni szkieletowych, a tym samym mniej miejsc docelowych dla insuliny, co może częściowo wyjaśniać patogenezę T2DM związaną z niższym poziomem Cre w surowicy. W grupie pacjentów z potwierdzoną T2DM zaobserwowano obniżony poziom Cre w porównaniu do osób ze stanem przedcukrzycowym. Jest to bardzo ciekawe z punktu widzenia naukowego, gdyż w okolicy człowieka zidentyfikowano wcześniej bakterie i grzyby zdolne do rozkładu Cre. W związku z tym dokładne oznaczenie tych MiDMs może mieć zasadnicze znaczenie dla wczesnej diagnozy T2DM.

W publikacji numer 3 opisano badania metabolomiczne w odniesieniu do predyspozycji genetycznych rozwoju T2DM. Zostały one przeprowadzone na próbkach osocza pobranych od 18 zdrowych mężczyzn, 12 z genotypem ryzyka w genie *PROX1* oraz 6 z genotypem ochronnym. Polimorfizm pojedynczego nukleotydu w genie *PROX1* jest silnym genetycznym czynnikiem podatności na upośledzenie funkcji komórek  $\beta$  i rozwój T2DM.

Podział na grupy przeprowadzono na podstawie polimorfizmu rs340874 w tym właśnie genie. Do grupy wysokiego ryzyka (z ang. high risk, HR) włączono homozygotycznych nosicieli allelu wysokiego ryzyka C (genotyp CC, n=12), a do grupy niskiego ryzyka (z ang. low risk, LR) homozygotycznych nosicieli allelu ochronnego T (genotyp TT, n=6). Grupy były dopasowane pod względem wieku, parametrów antropometrycznych, FG, insuliny, a także HOMA-IR, HOMA-B czy HbA1c. Na podstawie analizy otrzymanych wyników u żadnego z uczestników nie stwierdzono T2DM czy stanu przedcukrzycowego. Zebrane informacje na temat dziennej miary aktywności fizycznej pokazały, że wszyscy uczestnicy posiadali umiarkowaną lub wysoką (większość uczestników) aktywność fizyczną. Dzielne spożycie

energii było również podobne u wszystkich uczestników. Po około pięciu latach od pierwszej wizyty uczestnicy z kohorty 1000PLUS zostali wezwani na wizytę kontrolną. U sześciu osób z grupy nosicieli alleli ryzyka w rs340874 *PROX1* zaobserwowano pogorszenie wybranych parametrów klinicznych (np. glikemia na czczo, HOMA-IR, HbA1c), które wskazują na rozwój T2DM.

Doktorantka udowodniła, iż obydwa testy prowokacyjne (WW, NW) wywołały zmiany w poziomie MDMs u zdrowych osób mających predyspozycje genetyczne do rozwoju T2DM w genie *PROX1*, których nie odnotowano u osób z genotypem ochronnym. Różnice w odpowiedzi poposiłkowej mogą być źródłem wczesnych zaburzeń metabolicznych, także w poziomie metabolitów związanych z GM, które mogą być powiązane z przyszłym rozwojem T2DM.

Autorka ponadto zaobserwowała u pacjentów z predyspozycją genetyczną do rozwoju T2DM wyższy poziom Ala i norleucyny w osoczu po posiłku NW, natomiast po posiłku WW podwyższony poziom His. Ala jest metabolitem syntetyzowanym z pirogronianu i AAs (głównie rozgałęzionych) w mięśniach szkieletowych oraz w jelitach, która jest wykorzystywana w procesie glukoneogenezy w wątrobie. Dlatego też poposiłkowy wzrost Ala w osoczu może zwiększać glukoneogenezę i może przyczyniać się do rozwoju hiperglikemii u osób z predyspozycjami genetycznymi.

Rozprawa doktorska napisana jest z wielką starannością. Trudno doszukać się w pracy nawet błędów literowych, a pojedyncze błędy edytorskie takie jak: brak kursywy w wersie 5 na stronie 15, brak rzeczownika w wersie 18, strona 17; oraz rozwinięcie skrótów „CARBs”, „AAs” wers 16 strona 30, w żaden sposób nie umniejszają dużej wartości merytorycznej i praktycznej pracy. Umieszczenie we pracy osiemnastu szczegółowych, kolorowych rycin bardzo ułatwia zaznajomienie się z jej tematyką.

Całkowity dotychczasowy dorobek naukowy Doktorantki w zakresie jakości i ilości publikacji jest również imponujący (razem 31 pozycji, IF 61,074 i 1138 pkt. MNiSW) i został zestawiony w tabeli na stronie 8.

Podsumowując, pracę doktorską mgr Patrycji Mojsak oceniam pozytywnie i bardzo wysoko. Ma ona charakter nowatorski, a poczynione oryginalne spostrzeżenia dowodzą biegłości naukowej Autorki. Według mojej oceny dysertacja odpowiada wymogom stawianym pracom doktorskim, określonym w art. 187 ust. z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce ( t.j. Dz. U. z 2022 r. , poz. 574), gdyż



prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego przedstawione jako zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych, w których Doktorantka jest pierwszą autorką.

Zestawione w cykl prac publikacje prezentują odkrycia będące wynikiem dogłębnie przemyślanych i starannie wykonanych badań, które przyczyniają się do lepszego zrozumienia wpływu obecności mikroorganizmów jelitowych na metabolizm człowieka i mogą w obiektywny sposób zweryfikować wiele istniejących na ten temat mitów.

W związku z powyższym, zwracam się do Wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Patrycji Mojsak do dalszych etapów przewodu doktorskiego, a jednocześnie biorąc pod uwagę, że badania zaprezentowane w rozprawie doktorskiej są oryginalne w skali międzynarodowej, mają ogromny potencjał zarówno naukowy, jak i praktyczny, wnioskuję o jej wyróżnienie.

Anna Hogendorf



**dr hab. n. med. Anna Hogendorf**  
profesor UM  
specjalista pediatra  
specjalista diabetolog  
2034468 tel. 505-979-152

