

Gdańsk, 2022-08-20

Recenzja

rozprawy doktorskiej autorstwa mgr Pauliny Zofii Goryńskiej z tytułu „Nowe możliwości identyfikacji związków różnicujących poszczególne stadia i rodzaje nowotworów mózgu u ludzi z wykorzystaniem niskoinwazyjnej metody mikroekstrakcji do fazy stałej”

Pomimo ciągłej poprawy jakości diagnostyki obrazowej oraz technik analitycznych wykorzystywanych w bioanalizie, wiele chorób pozostaje trudne do rozpoznania na odpowiednio wczesnym etapie znacznie zwiększającym szansę na uzyskanie sukcesu terapeutycznego. Do takich chorób należą choroby nowotworowe ze szczególnym uwzględnieniem guzów mózgu. Obecnie poza stosowanymi rutynowo metodami diagnostyki obrazowej coraz więcej na znaczeniu zyskują metody diagnostyki molekularnej. W przypadku glejaków do najbardziej obiecujących molekularnych markerów diagnostycznych należą mutacje w genie dehydrogenazy izocytrynianowej (IDH) oraz badanie kodelecji ramion chromosomów 1p/19q. Nie są to jednak jednoznacznie specyficzne testy stąd też ciągle aktualna jest potrzeba poszukiwania innych związków, o potencjalnym charakterze biomarkerów, pozwalających odpowiednio wcześnie i z odpowiednio wysokim prawdopodobieństwem na określenie ryzyka choroby. Atrakcyjną alternatywą badawczą są aktualnie wykorzystywane techniki metabolomiczne, które zarówno na poziomie niecelowanych jak i celowanych analiz mogą dostarczać interesujących informacji o zmianie jakościowej i/lub ilościowej profili małocząsteczkowych związków endogennych obecnych w badanym materiale biologicznym.

W ten obszar badawczy perfekcyjnie wpisuje się oceniana praca doktorska mgr Pauliny Goryńskiej wykonana pod kierunkiem dr hab. Barbary Bojko, prof. UMK, Kierownik Katedry Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej, Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, wybitnej specjalistki w obszarze chemii analitycznej i procesów przygotowania próbek. Jest podsumowaniem badań nad zastosowaniem procedury mikroekstracji do fazy stałej (*Solid Phase Microextraction, SPME*), jako etapu przygotowania próbek, w analizie metabolomicznej fragmentów tkankowych różnych histologicznie typów guza mózgu. Wyniki badań eksperymentalnych Doktorantki dotyczące bezpośrednio ocenianej dysertacji opublikowane zostały w trzech artykułach oryginalnych w renomowanych czasopismach naukowych, w tym dwóch z listy *Journal Citation Reports (JCR): Jove – Journal of Visualized Experiments* oraz *Cancers*, a także pracy poglądowej w również prestiżowym *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Wszystkie wyżej wymienione prace ukazały się w okresie od 2016 do 2022 roku. Sumaryczna wartość współczynnika wpływu (*Impact Factor, IF*) tych publikacji wynosi ponad 11. We wszystkich wyżej wymienionych artykułach Pani mgr Paulina Goryńska jest pierwszym autorem, poza pracą poglądową z 2016 roku, gdzie Doktorantka była drugą autorką. Całkowity dorobek publikacyjny mgr Pauliny Goryńskiej, razem z pracami stanowiącymi podstawę osiągnięcia naukowego opisywanego w pracy doktorskiej, na dzień składania rozprawy doktorskiej, to w sumie 9 prac z czego 8 opublikowanych w prestiżowych czasopismach z listy JCR o łącznym współczynniku wpływu 38,5. Opis wkładu pracy Doktorantki jak również oświadczenia współautorów wszystkich publikacji potwierdzają istotną rolę oraz wiodące zaangażowanie mgr Pauliny Goryńskiej w realizację badań oraz powstawanie prac. Jej zaangażowanie w badania naukowe jak i powstawanie publikacji odnoszą się zarówno do etapu koncepcji i projektowania eksperymentów, ale także do pozyskiwania i analizy danych, walidacji wyników oraz ostatecznie pisania manuskryptów prac. Tak szerokie podejście jest oczywiście oczekiwane w przypadku doktorantów, ale trzeba też przyznać, że Pani mgr Paulina Goryńska wywiązała się z postawionych zadań bardzo dobrze. Doktorantka brała

udział także w charakterze wykonawcy w projekcie HARMONIA finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki pod tytułem „Nowe rozwiązania analityczne w onkologii: od badań podstawowych do szybkiej diagnostyki śródoperacyjnej” (nr 2015/18/M/ST4/00059).

Rozprawa doktorska mgr Pauliny Goryńskiej jest napisana w języku polskim i ma charakter zbioru czterech opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych. We wstępie teoretycznym obejmującym ok. 14 stron przedstawione są podstawowe informacje z zakresu technik diagnostycznych stosowanych w nowotworach mózgu, metabolomiki oraz metod przygotowania próbek w analizie metabolomicznej ze szczególnym uwzględnieniem mikroekstrakcji do fazy stałej. Całość wstępu wieńczy publikacja poglądowa z 2016 współautorstwa Doktorantki oznaczona jako praca **A0** a poświęcona SPME jako obiecującemu narzędziu w medycynie translacyjnej oraz poszukiwaniu nowych substancji farmakologicznie czynnych. Następnie w zwięzły sposób przedstawiony został cel pracy doktorskiej a także materiały i metody wykorzystywane podczas prowadzonych badań. W skróty sposób przedstawione zostały wyniki oraz wnioski stanowiąc niejako podsumowanie trzech prac oryginalnych będących podstawą osiągnięcia doktorskiego a w całości załączonych na końcu dysertacji (prace **A1-A3**). Jest to bardzo dobre podejście, ponieważ pozwala całościowo spojrzeć na problematykę badawczą podejmowaną w badaniach a przedstawioną w publikacjach a także kompleksowo ocenić efekty i jakość realizowanych badań. Rozprawę uzupełniają streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów i symboli, oświadczenia współautorów oraz zgody Komisji Bioetycznej. Całość dysertacji, wraz z cyklem publikacji to ponad 145 stronicowe dzieło.

Podstawowym celem pracy była ocena możliwości zastosowania mikroekstrakcji do fazy stałej w diagnostyce różnicowej nowotworów mózgu, o różnym pochodzeniu histologicznym i genetycznym. W tym celu posłużono się opracowanym protokołem analizy metabolomicznej z techniką SPME na etapie przygotowania próbek oraz analizowano otrzymane profile metabolomiczne pod kątem ich użyteczności diagnostycznej. Osiągnięcie tego celu możliwe było poprzez zrealizowanie kolejnych

etapów polegających na: optymalizacji parametrów ekstrakcji SPME do warunków klinicznych „*on site*”, w tym dobór warunków maksymalnej desorpcji metabolitów z materiału biologicznego; zastosowanie wyżej wymienionego protokołu analitycznego do badania próbek pochodzących od pacjentów z nowotworami mózgu o różnej etiologii; analizę otrzymanych wyników w odniesieniu do rodzaj nowotworu oraz występowania wybranych mutacji genetycznych oraz końcową interpretację biologiczną wyników.

Do wymiernych efektów prowadzonych badań Doktorantki opisanych w rozprawie oraz w załączonych publikacjach stanowiących podstawę dysertacji należą:

- zweryfikowanie możliwości wykorzystania techniki SPME, jako nowego podejścia do szybkiej i stosunkowo prostej ekstrakcji metabolitów z próbek klinicznych, potencjalnie także na sali operacyjnej;

- przeanalizowanie z wykorzystaniem wysokorozdzielczej spektrometrii mas uprzednio wyekstrahowanych techniką SPME próbek a następnie porównanie uzyskanych profili metabolomicznych guzów mózgu i skorelowanie ich z wynikami analizy histologicznej oraz oznaczeń genetycznych;

- zaproponowanie konkretnych profili metabolomicznych pozwalających na identyfikowanie pacjentów o histologicznie zróżnicowanych typach nowotworów mózgu, a także zaobserwowanie różnic pomiędzy pacjentami uwzględniając występowanie specyficznych mutacji genetycznych;

- wskazanie metabolitów propionylokarnityny i kwasu L-2-aminoadypinowego, jako istotnych dla różnicowania histologicznego i genetycznego pacjentów z mutacją dehydrogenazy izocytrynianowej 1 (IDH1), oraz cystationiny w przypadku pacjentów z kodecją 1p19q.

Za najbardziej wartościowe poznawczo wnioski z wykonanych badań, uważam określenie protokołu SPME w celu ekstrakcji metabolitów z tkanki guza mózgu bez wykorzystania jakiegokolwiek

wcześniejszej preparatyki próbki, co w konsekwencji prowadzi do przypuszczenia, że biopsja chemiczna *ex vivo* z użyciem SPME ma potencjalne szanse na implementację do diagnostyki śródoperacyjnej w neurochirurgii. Za niezwykle cenne uważam także wyniki, w których wykazano metabolity różnicujące próbki guza pod względem występujących mutacji genetycznych. Jest to kolejne potwierdzenie, że metabolomika jako ostatnia gałąź biologii systemowej opisywać może także zmiany zachodzące na poziomie szlaków metabolicznych wynikające z wcześniejszych mutacji genetycznych czy zmian proteomicznych.

Czytając dysertację oraz załączone publikacje nasunęły mi się następujące pytania i komentarze. Z czego, zdaniem Doktorantki, wynika różnica w efektywności roztworu desorpcyjnego pomiędzy zaproponowanym przez Vuckovic et al. [Anal. Chem. 2011, 83, 1944] a ostatecznie zoptymalizowanym w przeprowadzonych badaniach i opublikowanych w pracy **A1**? Czy rozważano zastosowanie podejścia planowania eksperymentu znanego jako *Design of Experiments* (DoE) w celu optymalizacji parametrów procesu mikroekstrakcji do fazy stałej, np. w przypadku poszukiwania najbardziej efektywnej mieszaniny roztworu desorpcyjnego? Podejście takie bardzo często umożliwia znalezienie krytycznych parametrów dla danego procesu przy minimalnej liczbie wykonanych eksperymentów i jednocześnie, dzięki, algorytmom optymalizacyjnym, w obrębie rozpatrywanej macierzy zmiennych wskazanie najbardziej optymalnych parametrów odpowiedzi. Wykonując porównania, takie jak w pracy **A1** przedstawione na rycinie 3, warto znormalizować skalę, w tym przypadku intensywności, tak aby już na pierwszy rzut oka widoczne były różnice w wysokościach obserwowanych pików. W przedstawionych wynikach badań metabolomicznych próbek pochodzących od pacjentów z guzami mózgu a stanowiących meritum pracy **A3** brakuje wyników analizy próbek QC. W przyszłości unikałbym także bezpośrednio z angielskiego zapożyczonych określeń typu „figura” na str. 19 zamiast rycina. I wreszcie czy planowane są analizy celowane pod kątem oznaczeń ilościowych wybranych paneli metabolitów u pacjentów z konkretnymi typami guza mózgu, w celu wykonania walidacji wcześniej uzyskanych wyników?

Powyższe uwagi i pytania nie wpływają na ogólną wartość merytoryczną pracy, którą oceniam bardzo wysoko. Praca doktorska mgr Pauliny Goryńskiej ma znaczące walory nowości i oryginalności naukowej. Dysertacja potwierdza wysoką wiedzę i umiejętności Kandydatki do stopnia naukowego doktora nauk farmaceutycznych. Zawiera także elementy wyników potencjalnie atrakcyjne do wykorzystania w opracowywaniu nowych metod diagnostycznych, także o charakterze klinicznym i śródoperacyjnym. Rozprawa doktorska mgr Pauliny Goryńskiej spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.) w związku z art. 179 ust 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.).

Biorąc powyższe pod uwagę wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszcy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie mgr Pauliny Goryńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego w dyscyplinie nauk farmaceutyczne. Jednocześnie mając na uwadze bardzo duże zaangażowanie Doktorantki w pracę badawczą wyrażone m.in. w postaci pierwszego autorstwa wszystkich prac eksperymentalnych przedstawionych jako cykl doktoratu, potencjał diagnostyczny opublikowanej metodologii SPME w guzach mózgu oraz znaczący dorobek naukometryczny Doktorantki, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

KIEROWNIK ZAKŁADU
Biofarmacji i Farmakokinytyki

prof. dr hab. Michał J. Markuszewski