

### Ocena rozprawy doktorskiej zatytułowanej

„Oznaczanie wybranych związków małowcząsteczkowych oraz białek w moczu chorych na raka stercza oraz z łagodnym przerostem stercza” wykonanej przez mgr Wiktora M. Srokę, zatrudnionego w Katedrze i Zakładzie Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, UMK w Toruniu;

Promotor: prof. UMK dr hab. Michał Marszał.

Po rozkodowaniu genomu ludzkiego, w 2001 roku, wydawało się, że naukowcy są już o krok od pełnego poznania mechanizmów funkcjonowania ludzkiego organizmu. Przypuszczano, że dalsze badania doprowadzą do szybkiego wprowadzenia innowacyjnych testów diagnostycznych a także terapii genowej, co miało potencjalnie doprowadzić do wyeliminowania wielu chorób takich jak: nowotwory oraz choroby przewlekłe (choroby układu sercowo-naczyniowego, choroby układu nerwowego, choroby metaboliczne). Rozszyfrowanie kodu genetycznego człowieka nie wyjaśnia jednak wszystkich aspektów łączących przebieg procesu chorobowego z ekspresją genu i wynikającą z tego zmianą fenotypu. Dlatego obecnie obserwuje się gwałtowny rozwój interdyscyplinarnej systemiki stanowiącej połączenie takich dziedzin nauki jak: genomika, transkryptomika, proteomika, metabolomika i innych.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska wpisuje się właśnie w celowane badania metabolomiczne i proteomiczne i stanowi bardzo ciekawe studium dotyczące poszukiwania tzw. biomarkerów raka stercza w grupie 26 aminokwasów i amin biogennych oraz 3 wybranych białek w moczu chorych na raka stercza oraz pacjentów z łagodnym przerostem prostaty.

Zagadnienia poruszane w ocenianej pracy doktorskiej zmierzające właśnie do poszukiwania nowych kandydatów na biomarkery raka stercza zasługują na uznanie. Działania takie zmierzające do opracowania markerów, które nie tylko pozwolą na odróżnienie chorych na nowotwór od grupy kontrolnej ale również kontrolę leczenia choroby czy wykorzystanie w badaniach przesiewowych i uchwycenie zmian nowotworowych zanim jeszcze wystąpią kliniczne objawy choroby są właśnie przedmiotem ocenianej rozprawy doktorskiej.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska zawiera spis treści, wykaz stosowanych skrótów, zwięzły wstęp, krótki cel pracy, krótkie wprowadzenie do metodologii prowadzonych badań i opisu wyników, 10 wniosków, dwa streszczenia, 64 pozycje piśmiennictwa oraz 3 publikacje stanowiące przedmiot rozprawy doktorskiej.

Załączone prace opublikowane zostały w czasopismach o zasięgu międzynarodowym o wysokich współczynnikach odniesienia IF: *European Journal of Cancer Prevention* (IF=3,031; 2 prace 2015 i 2016r.) oraz 1 praca w *International Journal of Biological Markers* (IF=1,371). Jedna praca dotycząca oznaczania aminokwasów została wykonana we współpracy z przedstawicielami Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz z grupą badaczy z Uniwersytetu w Melbourne w Australii, gdzie Autor przebywał na stażu naukowym. Wszystkie prace są wieloautorskie i Autor załączył oświadczenia poszczególnych autorów o ich wkładzie w poszczególnych pracach.

Fakt opublikowania całości pracy doktorskiej znakomicie ułatwia pracę recenzentowi umożliwiając skupienie się na ocenie jej oddziaływanie na stan aktualnej wiedzy w tym zakresie.

Na podkreślenie również zasługuje fakt pozyskania środków finansowych z grantów: grantu Iuventus Plus (MNiSzW) oraz grantu Preludium (NCN) na jej realizację.

Wszystko to wskazuje, że podjęty temat został dobrze przemyślany i prawidłowo zaplanowany przez Promotora, zostały zabezpieczone środki na jego realizację, co skutkowało 3 publikacjami, które się złożyły na ocenianą rozprawę doktorską.

Przedłożoną do oceny rozprawę doktorską mgr Wiktora M. Sroki oceniam bardzo wysoko – jako rozprawę wyróżniającą. Realizowana w pracy doktorskiej tematyka badawcza jest atrakcyjna poznawczo i stanowi przedmiot intensywnych badań czołowych krajowych i międzynarodowych laboratoriów badawczych. Dlatego też, na wyróżnienie zasługuje podejście metabolomiczne – proteomiczne poszukiwania potencjalnych biomarkerów raka stercza. Słowa uznania należą się Promotorowi i Doktorantowi za konsekwentną realizację trafnie sformułowanego tematu rozprawy.

Celem ocenianej pracy doktorskiej było określenie różnic w stężeniach 26 aminokwasów i amin biogennych oraz 3 wybranych białek (*Alpha-methylacyl-CoA racemase (AMACR)*),

*Engrailed protein 2 (EN2)* oraz *Human serine protease (HEP)*) w moczu pacjentów z rakiem stercza oraz pacjentów z łagodnym przerostem stercza. Badania realizowano w ścisłej współpracy z Kliniką Urologii Uniwersyteckiego Szpitala im. Dr J. Biziela w Bydgoszczy. Na badania uzyskano zgodę Komisji Etycznej przy Collegium Medicum w Bydgoszczy, UMK w Toruniu. Wszystkie badania przeprowadzono na dobrze dobranych i scharakteryzowanych grupach badawczych.

Zwartość aminokwasów w moczu oznaczano po derywatywacji metodą Boughton'a i wsp. (Anal. Chem. 2011, 83, 7523-7530). Badania zawartości aminokwasów i amin biogennych w moczu wykazały, że w grupie pacjentów z PCa występują istotnie wyższe stężenia argininy, homoseryny oraz proliny w porównaniu do grupy kontrolnej. Jednakże wymienione 3 aminokwasy nie różnicują pacjentów z PCa oraz pacjentów z BPH lepiej niż obecnie wykorzystywane białko PSA. Lepiej widoczne różnice w poziomach aminokwasów były widoczne w moczu po masażu prostaty. Jednocześnie przeprowadzone badania nie potwierdziły przydatności sarkozyny jako biomarkera raka prostaty, jak to ogłosili Sreekumar i współpracownicy w czasopiśmie Nature w 2009 roku.

Kolejne dwie publikacje dotyczą celowanych badań proteomicznych, gdzie w jednej publikacji metodą ELISA oznaczano EN2 (*Engrailed protein 2*) a w drugiej analizowano możliwość różnicowania grupy badanej (z rakiem stercza) oraz grupy kontrolnej z łagodnym przerostem stercza na podstawie oznaczeń metoda ELISA dwóch białek racemazy  $\alpha$ -metylo-koenzymu A (AMACR) oraz ludzkiej proteazy serynowej (HEP) w moczu uzyskanym bez masażu oraz po masażu stercza.

Wykazano, że mocz pacjentów z grupy PCa pobrany po masażu stercza zawierał istotnie wyższe stężenia białka EN2 w porównaniu do stężeń EN2 w grupie kontrolnej. Stwierdzono, że pacjenci z najwyższym stopniem agresywności nowotworu w skali Gleasona (GS7) mieli istotnie wyższe stężenia EN2 w porównaniu do grupy GS6 i GS5. Wskazuje to, że monitorowanie stężenia EN2 w moczu pacjentów pozwala na różnicowanie pacjentów z rakiem stercza i pacjentów z łagodnym przerostem stercza. Pewnym ograniczeniem wydaje się tu jednak konieczność masażu stercza przed pobraniem moczu; bez masażu powyższych zależności nie obserwowano.

Kolejna praca nr 3 jest próbą analizy przydatności racemazy  $\alpha$ -metylo-koenzymu A (AMACR) oraz ludzkiej proteazy serynowej (HEP) jako potencjalnych biomarkerów raka stercza.

Stwierdzono, że tylko w moczu pobranym od pacjentów po masażu stężenia zarówno AMCAR i HEP były wyższe w grupie pacjentów z rakiem stercza jak i w grupie kontrolnej. Nie zaobserwowano różnic w poziomach obu białek zależnie od zaawansowania nowotworu oraz klasyfikacji Gleasona. Stwierdzono, że białka AMCAR i HEP nie były w stanie lepiej diagnozować pacjentów niż dotychczas stosowane PSA.

Analiza poziomów wszystkich trzech białek w moczu wykazała, że masaż stercza przed zbiórką moczu powoduje zwiększenie dyskryminacji grupy badanej od kontrolnej.

Do niewątpliwych osiągnięć rozprawy doktorskiej należy zaliczyć:

- Opublikowanie rozprawy doktorskiej w czasopiśmie o cyrkulacji międzynarodowej o wysokim współczynniku oddziaływania IF.
- Wdrożenie nowoczesnych narzędzi analitycznych do poszukiwania potencjalnych markerów w raku stercza.
- Wykorzystanie nowoczesnych narzędzi chemometrycznych przy interpretacji uzyskanych wyników, oraz krytyczna dyskusja własnych wyników z wynikami uzyskanymi przez innych autorów.

Jako recenzent chciałbym również poddać dyskusji niektóre wątpliwości, jakie nasuwają się po uważnej analizie przedstawionej rozprawy doktorskiej:


- Załączone publikacje, stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej zostały umieszczone po wnioskach, streszczeniach i piśmiennictwie, co zdaniem oceniającego nieco ogranicza wymowę ich integralności z całą rozprawą. Zdaniem oceniającego publikacje powinny być przedstawione wcześniej, np. po celu badań a całość mogłaby zostać podsumowana np. dyskusją oraz perspektywami dalszych badań. Z powyższych uwag nie czynię jednak zarzutu doktorantowi, a moje uwagi raczej traktuję jako głos w dyskusji, bowiem nie ma jeszcze w naszym kraju dobrych wzorców rozpraw doktorskich opartych w całości na publikacjach.

- Brakuje mi również w pracy ogólniejszej dyskusji, jakie kryteria spowodowały, że Autor wybrał właśnie te trzy białka (EN2, AMACR i HEP) do ew. sprawdzenia ich przydatności jako potencjalnych biomarkerów raka stercza.

Rozprawa doktorska mgr Sroki jest wysoce specjalistyczna, tematycznie spójna i jednocześnie stanowi oryginalne rozwiązanie w zakresie analizy poszukiwania potencjalnych biomarkerów raka stercza w oparciu o nowoczesną analizę metabolomiczno - proteomiczną.

Mgr W.M. Sroka jawi nam się jako zdolny młody naukowiec, która podczas realizacji rozprawy doktorskiej opanował wiele technik i metod badawczych wykorzystywanych w analizie proteomicznej i metabolomicznej. Umiejętnie współpracował z czołowymi polskimi i zagranicznymi jednostkami naukowymi jak Gdański Uniwersytet Medyczny czy z grupą badaczy z Uniwersytetu w Melbourne w Australii, gdzie Autor przebywał na stażu naukowym. Jego program realizowany w rozprawie doktorskiej zastał wsparty grantami: Iuventus Plus (MNiSzW) oraz Preludium (NCN).

Przedstawiona do oceny rozprawę doktorską uznaję za wyróżniającą i stwierdzam, że spełnia ona wszystkie wymogi formalne stawiane pracom doktorskim i stanowi bardzo wartościowe, pełne i całościowe podejście do podjętego tematu, ważne zarówno z naukowego i z aplikacyjnego punktu widzenia. Dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu wnioski: o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej oraz o dopuszczeniu mgr. Wiktora M. Sroki do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

KIEROWNIK  
Katedry i Zakładu Chemii  
Nieorganicznej i Analitycznej  
  
Prof. zw. dr hab. Zenon J. Kokot

Załącznik: wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Wiktora M. Sroki.

Poznań, 14 maja 2016 r.