Dr hab. Wiesław Wiczkowski, prof. Instytutu
Zakład Chemii i Biodynamiki Żywności
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polska Akademia Nauk w Olsztynie

Olsztyn, 05.06.2022

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Recenzja pracy doktorskiej mgr Tomasza Kowalczyka pt. „*Analiza proteomiczna i metabolomiczna niedrobnokomórkowego raka płuca z wykorzystaniem technik wielkoskalowych opartych na spektrometrii mas*" wykonanej w Centrum Badań Klinicznych i Zakładzie Biologii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku pod kierunkiem dr hab. n med. Piotra Zabielskiego (promotor) i dr n med. Joanny Kiśluk (promotor pomocniczy).

Dostępne dane wskazują, że w spośród chorób nowotworowych różne typy raka płuca są rozpoznawane jako główne przyczyny zgonów ludzi na świecie. Natomiast niedrobnokomórkowy rak płuca stanowi aż 80% wszystkich zdiagnozowanych przypadków raka płuca. Pomimo, że w ostatnich latach dokonał się istotny postęp w diagnostyce i strategii leczenia tego typu nowotworów jednak rokowania dla osób u których zdiagnozowano niedrobnokomórkowego raka płuca są wciąż niezadawalające. Ponadto, tradycyjna diagnostyka i klasyfikacja, oparta na badaniach histopatologicznych chociaż jest w 100% specyficzna dla raka płuca charakteryzuje się niską czułością.

Zatem, przedstawiona do recenzji praca doktorska dobrze wpisuje się w trendy poszukiwania nowych metod umożliwiających diagnostykę chorób nowotworowych, w tym niedrobnokomórkowego raka płuca, w oparciu o biomarkery białkowe i drobnocząsteczkowe. Tym bardziej, że spośród nowoczesnych narzędzi analitycznych w technikach wykorzystujących spektrometrię mas, takich jak metabolomika i proteomika, pokłada się największe nadzieje w zakresie identyfikacji specyficznych markerów progresji i typu chorób nowotworowych. Przypuszcza się zatem, że dzięki tym technikom stanie się możliwe wypełnienie luki w zakresie wiedzy na temat różnic na poziomie metabolomu i proteomu, między innymi w trzech podtypach niedrobnokomórkowego raka płuca oraz tkance niezmienionej nowotworowo. Ponadto, oczekuje się charakterystyki pełnego profilu białek i

metabolitów oraz szlaków metabolicznych różnicujących podtypy niedrobnokomórkowego raka płuca od tkanki niezmienionej nowotworowo.

Oceniana rozprawa doktorska licząca 214 stron obejmuje trzy zagadnienia, z czego dwa zostały opublikowane w pracy przeglądowej i oryginalnej w latach 2020-2021 w czasopismach indeksowanych w Journal Citation Reports o łącznym „Impact Factor" równym 11,826 punktów oraz sumarycznej ilość 280 punktów MNiSW (rozdział 1, str. 3). O dużej wartości tych prac świadczy opublikowanie ich w bardzo dobrych czasopismach naukowych, tj. *BBA - Molecular Basis of Disease* (IF: 5,187; punktacja MNiSW: 140) i *Cancer* (IF: 6.639; punktacja MNiSW: 140). Przed opublikowaniem prace te były poddane ocenie recenzentów, musiały spełnić wszystkie wymogi dotyczące sposobu przedstawiania wyników, ich interpretacji oraz dyskusji, a przyjecie ich do druku świadczy o ich wysokiej wartości naukowej. W obu artykułach Doktorant jest pierwszym autorem i zgodnie z informacjami zawartymi w rozdziale 14 dysertacji (tj. „Informacje o charakterze udziału współautorów w publikacjach") jego udział w powstaniu tych prac był wiodący, tj. w przypadku pracy pierwszej wkład Doktoranta został oszacowany na 70% i polegał na opracowaniu koncepcji pracy, przeglądzie literatury i przygotowaniu manuskryptu, a w przypadku pracy drugiej został oszacowany na 52% i obejmował wykonanie doświadczeń, opracowanie wyników oraz analizę i dyskusje wyników.

Oprócz wykazu publikacji stanowiących rozprawę doktorską (str. 3, rozdział 1), załączonych pełnych tekstów publikacji i suplementów (rozdział 10, str. 110-181) oraz informacji o charakterze udziału współautorów w publikacjach (rozdział 14, str. 197-214) dysertacja zawiera zestawienie wszystkich publikacji doktoranta (rozdział 2, str. 4), bardzo pomocny w lekturze pracy wykaz stosowanych skrótów (rozdział 2, str. 8-13), wstęp (rozdział 4, str. 14-31), cel pracy (rozdział 5, str. 32), charakterystykę materiału badawczego i opis zastosowanych metod (rozdział 6, str. 33-47), omówienie wyników (rozdział 7, str. 48-96) i dyskusję (rozdział 8, str. 97-108) oraz wnioski (rozdział 9, str. 109). Całość uzupełnia streszczenie w języku polskim (rozdział 11, str. 182-184) i angielskim (rozdział 12, str. 185-187) oraz bibliografia (rozdział 13, str. 188-196).

W osiemnastostronicowym wstępie Autor w sposób syntetyczny przedstawił aktualny stan wiedzy na temat niedrobnokomórkowego raka płuca oraz jego diagnostyki i klasyfikacji.

Wskazał, że pomimo wprowadzenia nowych strategii leczenia, ciągle towarzyszy im diagnostyka oparta na histopatologii, będąca obecnie złotym standardem rozpoznawania raka płuca. Jednakże, jak zwraca uwagę Doktorant, tradycyjna diagnostyka i klasyfikacja uważana jest za nadmiernie uproszczoną, w kontekście występowania podtypów mieszanych raka płuca, a także identyfikacji wielu mutacji genetycznych, które nie są specyficzne dla konkretnego podtypu. Z drugiej zaś strony dostępne dane jednoznacznie wskazują, że przeprowadzenie jak najdokładniejszej charakterystyki nowotworu już we wczesnym stadium umożliwia dobór odpowiedniej terapii oraz sprzyja skuteczności zastosowanego leczenia. Dlatego wprowadzenie nowych, alternatywnych metod określania podtypów niedrobnokomórkowego raka płuca oraz wczesnej diagnostyki jest uzasadnione i oczekiwane. W rozdziale tym Doktorant wskazuje również, że obecnie największe możliwości poznawcze w zakresie zrozumienia procesów zachodzących w organizmie ludzi i zwierząt, w poszczególnych tkankach, a również i komórkach dają wielkoskalowe badania proteomiczne i metabolomiczne. Wskazuje, że metody diagnostyczne oparte na tych badaniach mogą być w przyszłości złotym standardem w diagnostyce niedrobnokomórkowego raka płuca, wymagają jednak dokładnego określenia różnic na poziomie proteomu i metabolomu pomiędzy tkankami zdrowymi a zmienionymi oraz pomiędzy poszczególnymi podtypami zmian, uzasadniając tym samym konieczność podjęcia badań w tym zakresie. W dalszej części wstępu Autor opisuje proces identyfikacji i walidacji biomarkerów oraz wskazuje, że spośród nowoczesnych narzędzi analitycznych spektrometria mas wydaje się techniką niosącą największy potencjał poznawczy. W kolejnych dwóch podrozdziałach wstępu, w sposób bardzo klarowny i wyczerpujący, Doktorant przedstawił wykorzystanie proteomiki i metabolomiki w badaniach biologii nowotworów. Tej bardzo istotnej kwestii Doktorant poświecił również interesującą pracę poglądową wskazując w niej między innymi, że dzięki proteomice i metabolomice możliwa jest analiza tysięcy cząsteczek w dużej liczbie próbek, z potencjałem rozpoznania ich jako biomarkery chorób nowotworowych. W pracy wykazał również, że uzupełnienie informacji genetycznej o proteomikę i metabolomikę może dać szerszą wiedzę na temat biologii guza, ułatwiając tym samym wskazanie nowych biomarkerów oraz celów terapeutycznych. Ponadto opisał istotne kwestie dotyczące technicznych aspektów klinicznej proteomiki i metabolomiki opartej na spektrometrii mas a omawiane zagadnienia przedstawił w kontekście intensywnie rozwijającej się medycyny precyzyjnej. W mojej ocenie przedstawione we wstępie i pracy poglądowej zagadnienia są ścisłe związane z przedmiotem pracy doktorskiej, zostały opracowane z wykorzystaniem

bogatego piśmiennictwa i wskazują na bardzo dobre i szerokie spojrzenie Autora na podjętą tematykę badawczą.

W kolejnym rozdziale Autor przedstawia trzy jasno sformułowane cele badawcze.

Rozdział „Materiały i metody" składa się z dwunastu podrozdziałów i liczy piętnaście stron. Opisano w nim proces rekrutacji pacjentów do badań (wraz z informacją o akceptacji zrealizowanych badań przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku), sposób pobierania próbek i ich zabezpieczenia do czasu analiz. Następnie, scharakteryzowano analizę proteomiczną, uwzględniając podział na przygotowanie próbek do analiz, utworzenie standardu wewnętrznego i znakowanie za pomocą TMT, frakcjonowanie próbek, właściwą analizę z wykorzystaniem wysokosprawnego chromatografu cieczowego Dionex 3000 sprzężonego z spektrometrem mas Thermo Orbitrap Fusion, identyfikację białek i analizę bioinformatyczną. W tym miejscu na podkreślenie zasługuje fakt zastosowania znakowania znacznikami TMT w celu zwiększenia precyzji pomiaru różnicowej ekspresji białek oraz po raz pierwszy jednego kanału 126 znacznika TMT-10plex jako standardu odniesienia we wszystkich pomiarach, tworząc proteomiczny standard wewnętrzny. W przypadku schematu analiz metabolomicznych wymieniono natomiast preparatykę próbek do badań, właściwą analizę z wykorzystaniem wysokosprawnego chromatografu cieczowego sprzężonego z spektrometrem mas Agilent LC-QTOF-MS (tj. RP-LC-MS i HILIC-LC-M) oraz analizę danych.

Zwrócenia uwagi wymaga fakt, że zastosowane techniki przygotowania próbek do analiz oraz metody analityczne były złożone i czasochłonne oraz potrzebowały dużego nakładu pracy aby w pełni umożliwić zrealizowanie założonego celu badawczego. Dzięki temu jednak możliwe było uzyskanie wielu nowych informacji o metabolomie i proteomie niedrobnokomórkowego raka płuca oraz różnicach w szlakach metabolicznych trzech badanych typów tego nowotworu. Podsumowując tę część dysertacji stwierdzam, że przemyślana i dopracowana metodyka jest jej mocną stroną.

Liczący 48 strony rozdział „Wyniki" składa się z 21 podrozdziałów zawierających 19 rycin i jedną tabelę. Na podstawie zestawień liczbowych, będących rezultatem pracy organizacyjnej i analitycznej Doktorant przedstawił w poszczególnych podrozdziałach opis własnych osiągnięć. W ramach przyjętej organizacji badań w pierwszej kolejności omówił wyniki dotyczące badań proteomicznych, które nie zostały jeszcze opublikowane. Zgodnie z obowiązującymi zasadami w celu potwierdzenia prawidłowej pracy spektrometru mas w trakcie prowadzonych badań proteomicznych Autor prowadził regularną analizę próbki

kontrolnej. Podkreślić należy, że uzyskane z tych analiz dane dotyczące liczby zidentyfikowanych peptydów i białek oraz niewielki błąd pomiaru masy przez cały okres analiz wskazują na wysoką stabilność pracy spektrometru mas dowodząc dużych umiejętności analitycznych i precyzji Doktoranta oraz właściwego podejścia do podjętego problemu badawczego. Dużym osiągnięciem Doktoranta jest również dokonanie analizy porównawczej różnicowej ekspresji białek pomiędzy wczesnym i zaawansowanym stadium nowotworu w trzech podtypach niedrobnokomórkowego raka płuca i w porównaniu do tkanki kontrolnej oraz analiza szlaków metabolicznych w oparciu o wyniki różnicowej analizy ekspresji białek. Kolejnym istotnym etapem badań była identyfikacja głównych czynników regulacyjnych oraz unikalnych białek podlegających ekspresji we wczesnym i zaawansowanym stadium nowotworu w trzech podtypach niedrobnokomórkowego raka płuca. W dalszej części tego rozdziału Doktorant przeprowadził selekcję i analizę białek charakteryzujących poszczególne podtypy niedrobnokomórkowego raka płuca oraz analiza szlaków metabolicznych różnicujących podtypy niedrobnokomórkowego raka płuca. Podsumowując, identyfikacja ponad trzech tysięcy białek podlegających ekspresji w niedrobnokomórkowym raku płuca oraz wyselekcjonowanie białek istotnie różnicujących poszczególne podtypy stanowią ważne osiągnięcie pracy Doktoranta.

Drugi główny obszar badań przedstawiony w rozdziale „Wyniki" został opublikowany w pracy oryginalnej i dotyczy analizy różnic metabolomicznych tkanki nowotworowej i kontroli oraz różnic pomiędzy podtypami niedrobnokomórkowego raka płuca z wykorzystaniem dwóch metod „odcisku palca". We wstępie Doktorant wskazuje, że metabolomika może mieć duży potencjał w zakresie rozróżniania podtypów niedrobnokomórkowego raka płuca. Następnie w przeprowadzonych badaniach wykorzystując dwie metody chromatografii cieczowej sprzężone ze spektrometrią mas, tj. RP-LC-MS do pomiaru metabolitów niepolarnych lub o niskiej polarności i HILIC-LC-MS do pomiaru metabolitów polarnych, Doktorant scharakteryzował profil metabolomiczny tkanek i osocza pacjentów z wczesnym i zaawansowanym stadium niedrobnokomórkowego raka płuca. Po przeanalizowaniu próbek tkanek i/lub osocza od 137 pacjentów zidentyfikowano ponad 200 metabolitów różnicujących podtypy tego nowotworu. Większość zidentyfikowanych metabolitów należała do aminokwasów, kwasów tłuszczowych, karnityn, lizoglicerofosfolipidów, sfingomielin, plazmalogenów i glicerofosfolipidów. Ponadto zidentyfikował metabolity związane z biosyntezą N-acyloetanoloamin, tj. glicerofosfo (N-acylo)etanoloamin, które odróżniały wczesny etap raka płaskonabłonkowego od

gruczolakoraka. Natomiast do grupy związków różniących tkankę nowotworową i kontrolną, oprócz wymienionych powyżej grup substancji, zaliczył związki biorące udział w cyklu Krebsa, cyklu mocznikowym i procesach oddychania komórkowego. Doktorant podkreślił, że przeprowadzone badania wykazały nowe, dotychczas nieopisane, metabolity rozróżniające podtypy niedrobnokomórkowego raka płuca, zwłaszcza we wczesnym stadium raka oraz aktywność nowych szlaków metabolicznych. Sugeruje, że dalsze badania nad rolą szlaków biosyntezy N-acyloetanoloamin we wczesnym stadium niedrobnokomórkowego raka płuca mogą ujawnić nowe cele prognostyczne i diagnostyczne.

Kolejną częścią dysertacji jest dwunastostronicowa dyskusja w której na tle dostępnej literatury naukowej Doktorant przeprowadził ocenę uzyskanych wyników. Wskazał, że wykorzystanie właściwie dobranej metodyki umożliwiło identyfikację tysięcy białek podlegających ekspresji w niedrobnokomórkowym raku płuca, wyselekcjonowanie białek istotnie różnicujących poszczególne podtypy i stadia zaawansowania badanego nowotworu oraz określenie ponad dwustu metabolitów różnicujących tkankę guza od tkanki kontrolnej. Na podstawie tych danych Doktorant mógł wskazać procesy biologiczne zachodzące zarówno w tkance zdrowej jak i zmienionej nowotworowo. Natomiast analiza bioinformatyczna ekspresji białek i zawartości metabolitów pomiędzy podtypami niedrobnokomórkowego raka płuca jak i w stosunku do kontroli pozwoliła określić szlaki metaboliczne istotne różnicujące poszczególne typy, a także wyodrębnić unikatowe białka i metabolity charakterystyczne dla badanych podtypów i stadium zaawansowania. Na szczególną uwagę zasługuje sprawność z jaką, pomimo szeregu płaszczyzn, Doktorant analizuje wyniki badań wielkoskalowej analizy ekspresji białek i setek metabolitów przyczyniając się do dokładniejszego poznania biologii i biochemii procesów zachodzących w niedrobnokomórkowym raku płuca. Świadczy to o bardzo dobrej znajomości literatury i dojrzałości naukowej Doktoranta.

Badania podsumowuje sześć dobrze sformułowanych poprawnych wniosków. Są one dobrze udokumentowane i wynikają z przeprowadzonych eksperymentów oraz odpowiadają założonym celom. Jednakże, w pracy brakuje jednego generalnego wniosku podsumowującego całość przeprowadzonych prac.

Bibliografia pracy liczy 132 pozycje przedstawiające zagadnienia związane z tematem prowadzonych badań. Wszystkie prace są anglojęzyczne i w ponad 60% pochodzą z ostatnich dziesięciu lat.

Oceniana dysertacja w rozdziale drugim (str. 4) zawiera zestawienie wszystkich publikacji doktoranta. Na podstawie tych danych nie można jednak podjąć się pełniej oceny

dorobku Doktoranta ponieważ jest to zestawienie liczbowe wskazujące jedynie ilość opublikowanych przez Doktoranta prac, ich sumaryczny „Impact Factor" oraz liczbę punktów MNiSW. W przypadku przedstawienia takich danych, aby można było przeprowadzić ich adekwatną ocenę, niezbędne jest wymienienie wszystkich publikacji wraz z informacją o roli Doktoranta w powstaniu opublikowanych badań.

Podsumowując stwierdzam, że praca doktorska mgr Tomasza Kowalczyka jest oryginalnym osiągnieciem naukowym, badania są nowatorskie i ważne z punktu widzenia naukowego i społecznego. Doktorant wykazał się dużą wiedzą teoretyczną i umiejętnościami analitycznymi oraz umiejętnością rozwiązywania problemów naukowych. Pracę doktorską mgr Tomasza Kowalczyka pt. „*Analiza proteomiczna i metabolomiczna niedrobnokomórkowego raka płuca z wykorzystaniem technik wielkoskalowych opartych na spektrometrii mas*" oceniam pozytywnie.

Uwagi końcowe

Stwierdzam, że praca doktorska mgr Tomasza Kowalczyka pt. „*Analiza proteomiczna i metabolomiczna niedrobnokomórkowego raka płuca z wykorzystaniem technik wielkoskalowych opartych na spektrometrii mas*" spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn.zm.) oraz art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 z późn.zm.) i niniejszym wnoszę do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Tomasza Kowalczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.