UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII NIEORGANICZNEJ I ANALITYCZNEJ

ul. Rokietnicka 3
60-806 Poznań

tel.:61 854 66 10
fax: 61 854 66 09

Dr hab. Agnieszka Klupczyńska-Gabryszak

Poznań, 19.05.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Ewy Paszkowskiej
pt. „Wykorzystanie metabolomiki w badaniach prenatalnych płodowego zespołu Downa"

Metabolomika jest intensywnie rozwijającą się gałęzią nauki, przyczyniającą się do lepszego zrozumienia mechanizmów komórkowych, w tym patomechanizmów rozwoju i przebiegu chorób. To z kolei może przyczynić się m.in. do identyfikacji nowych markerów diagnostycznych i prognostycznych, zaprojektowania nowych leków, a także narzędzi służących do oceny skuteczności podjętego leczenia. Przedstawiona praca doktorska jest przykładem zastosowania narzędzi metabolomicznych do wykrywania nieprawidłowości we krwi oraz płynie owodniowym występujących u ciężarnych kobiet z płodem obarczonym zespołem Downa. Zaproponowaną tematykę badawczą uważam za uzasadnioną i ważną z poznawczego oraz praktycznego punktu widzenia. Podjęte przez Doktorantkę badania wnoszą wkład w coraz głębsze poznanie patomechanizmu złożonego zespołu wad wrodzonych będącego skutkiem trisomii chromosomu 21, a ich kontynuacja może doprowadzić do zwiększenia obecnych możliwości diagnostyki prenatalnej tego zespołu wad.

Oceniana rozprawa obejmuje cykl trzech powiązanych tematycznie, wieloautorskich artykułów naukowych (dwóch publikacji oryginalnych i jednej przeglądowej), opublikowanych w czasopismach naukowych w latach 2018-2021. We wszystkich trzech publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem. Wszystkie artykuły zostały opublikowane w punktowanych czasopismach naukowych, a ich łączny współczynnik oddziaływania (*Impact Factor*) wynosi 6,629. Z załączonych oświadczeń współautorów jasno wynika, że mgr Ewa Paszkowska pełniła wiodącą rolę w postawaniu prac zawartych w rozprawie, począwszy od tworzenia koncepcji i przeglądu literatury, poprzez wykonanie części eksperymentalnej, po opracowanie otrzymanych wyników i przygotowanie manuskryptów. Warty podkreślenia i uznania jest fakt posiadania przez Doktorantkę w swoim dorobku publikacyjnym aż 13 innych artykułów oraz 3 rozdziałów w monografiach, co świadczy o jej dużej aktywności naukowej.

Przedstawiona dysertacja została wykonana pod kierunkiem dr hab. Moniki Zbuckiej-Krętowskiej (promotora) z Zakładu Endokrynologii Ginekologicznej i Ginekologii Wieku Rozwojowego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku oraz dr Pauliny Samczuk (promotora pomocniczego) z Centrum Badań Klinicznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku w zespole badaczy o dużym doświadczeniu w prowadzeniu badań metabolomicznych. Warto zauważyć, że jedna z publikacji włączonych do rozprawy powstała w ramach współpracy międzynarodowej z prof. Coral Barbas z Centre of Metabolomics and Bioanalysis (CEMBIO), jednego z najlepszych ośrodków badań metabolomicznych w Europie.

Przedstawiona rozprawa liczy 90 stron i rozpoczyna się od wykazu publikacji stanowiących jej podstawę, zestawienia dorobku naukowego mgr Ewy Paszkowskiej oraz wykazu skrótów. W kolejnej części rozprawy Doktorantka zawarła wprowadzenie do poruszanej tematyki badawczej. Opisano przyczyny i objawy zespołu Downa, podział i opis stosowanych badań prenatalnych oraz podstawowe informacje o metabolomice. Doktorantka zaakcentowała niewystarczalność istniejących rozwiązań w zakresie diagnostyki zespołu Downa i potencjał badań metabolomicznych, wykorzystujących najnowocześniejsze narzędzia analityczne.

Cele pracy zostały prawidłowo i jasno zdefiniowane. Autorka wskazała dwa cele badawcze, z których pierwszy był celem poznawczym, a drugi aplikacyjnym. Pierwszym celem ocenianej rozprawy było poszukiwanie różnic w poziomach metabolitów występujących w osoczu krwi oraz płynie owodniowym pomiędzy grupą ciężarnych kobiet, których płód obarczony był zespołem Downa a grupą kobiet z płodem o prawidłowym kariotypie. Drugi cel stanowiła ocena potencjału diagnostycznego profilu metabolitów wykrytych w próbkach krwi obwodowej matki w prenatalnej diagnostyce zespołu Downa. Na przeprowadzenie badań zgodę wyraziła Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku. Próbki do badań pochodziły z jednego ośrodka, którym była Klinika Rozrodczości i Endokrynologii Ginekologicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Jako metody badawczej Doktorantka użyła nowoczesnej techniki łączonej – chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS) o wysokiej rozdzielczości. We wszystkich eksperymentach Doktorantka zastosowała niecelowaną strategię metabolomiczną. Do analizy otrzymanych danych użyto szerokiego wachlarza specjalistycznych oprogramowań, na który składały się programy komercyjne oraz programy w otwartym dostępie. Specyfika nieukierunkowanych badań metabolomicznych niesie za sobą konieczność wieloetapowej analizy danych z zastosowaniem zaawansowanych narzędzi

bioinformatycznych. Na podkreślenie zasługuje, biorąc pod uwagę przedstawione w końcowej części rozprawy informacje o charakterze udziału współautorów w publikacjach, opanowanie przez mgr Ewę Paszkowską nie tylko wymagającej techniki analitycznej, ale także różnorodnych narzędzi statystycznej analizy danych.

Wyniki oraz ich dyskusja, przedstawione w publikacjach stanowiących rozprawę doktorską oraz omówione w postaci dwunastostronicowego komentarza, pokazują duże zaangażowanie Doktorantki i potwierdzają, że cele rozprawy zostały zrealizowane.

Doktorantka w pierwszym etapie podjętych prac przeprowadziła przegląd dostępnej literatury, który koncentrował się na wykorzystaniu metabolomiki niecelowanej w badanich zaburzeń pojawiających się w okresie prenatalnym i został opublikowany w czasopiśmie *Expert Review of Proteomics*.

W kolejnym etapie prac Doktorantka przeprowadziła analizę metabolomiczną osocza krwi pobranego od ciężarnych kobiet noszących płód obarczony zespołem Downa oraz kobiet stanowiących grupę kontrolną. Obszerny zbiór danych analitycznych, uzyskany za pomocą techniki LC-MS, został poddany analizie z wykorzystaniem wielowymiarowych i jednowymiarowych metod statystycznych. Spośród 115 związków, których poziomy wykazywały statystycznie istotnie różnice pomiędzy badanymi grupami ciężarnych kobiet, zidentyfikowano 5 metabolitów: butyrylo-L-karnitynę, 3 amidy kwasów tłuszczowych oraz piperynę. Uzyskane przez mgr Ewę Paszkowską wyniki dodatkowych analiz statystycznych (krzywych ROC) pozwoliły ponadto na zaproponowanie związków małocząsteczkowych o potencjalnym znaczeniu diagnostycznym w prenatalnej diagnostyce zespołu Downa. Wyniki tego etapu badań opublikowano w czasopiśmie *Prenatal Diagnosis*.

Wykonana w następnym etapie prac niecelowana analiza metabolomiczna próbek płynu owodniowego doprowadziła do wskazania metabolitów różnicujących kobiety w ciąży, których płód obarczony był zespołem Downa oraz kobiety z płodem o prawidłowym kariotypie. Spośród 114 związków, których poziomy wykazywały statystycznie istotnie różnice pomiędzy badanymi grupami ciężarnych kobiet, zidentyfikowano 4 metabolity: metylohistydynę, diacetylosperminę, heksanoilokarnitynę oraz siarczan-p-krezolu. Doktorantka podjęła się próby interpretacji zaobserwowanych zmian w metabolomie płynu owodniowego. Szczególnie interesująca jest identyfikacja siarczanu p-krezolu stanowiąca przesłankę popierającą koncepcję osi mózgowo-jelitowej. Wyniki tego etapu badań opublikowano w czasopiśmie *Ginekologia Polska*.

W końcowej części ocenianej dysertacji znajdują się wnioski, kopie prac stanowiących rozprawę doktorską, streszczenie w języku polskim i angielskim, spis literatury oraz informacje o charakterze udziału współautorów w poszczególnych publikacjach. Rozprawa zawiera 75 odpowiednio dobranych pozycji piśmiennictwa. Większość cytowanych publikacji pochodzi z ostatnich 10 lat, co świadczy o znajomości aktualnego stanu wiedzy z zakresu poruszanej tematyki.

Atutem zawartych w rozprawie doktorskiej badań jest wykorzystanie różnorodnego materiału biologicznego. W związku z zamiarem uzupełnienia istniejących metod diagnostyki prenatalnej o oznaczanie wybranych związków we krwi, Doktorantka wykonała analizę metabolomiczną próbek osocza krwi. Jednakże kluczowym z punktu widzenia wyjaśnienia mechanizmów rozwoju zespołu Downa wydaje się być analiza próbek płynu owodniowego, jako materiału niosącego dużo informacji o stanie płodu. Za szczególnie wartościowe uważam ponadto dopasowanie porównywanych grup kobiet ciężarnych, których próbki zostały włączone do badań. Warto zauważyć, że metabolom człowieka ulega zmianom pod wpływem różnych czynników fizjologicznych, patologicznych i środowiskowych, takich jak wiek, płeć, dieta, choroby, stosowane leki czy używki. Dlatego ważne jest odpowiednie zaprojektowanie badania i dobór odpowiedniej grupy kontrolnej (porównawczej).

Wywiązując się z obowiązku recenzenta, chciałabym przedstawić kilka pytań oraz zagadnień do dyskusji i proszę o ustosunkowanie się do nich w trakcie publicznej obrony:

1) Ze względu na małą liczebność badanych grup kobiet ciężarnych Doktorantka mogłaby rozważyć przeprowadzenie dalszych badań w celu potwierdzenia zaobserwowanych różnic w profilu metabolicznym krwi obwodowej i płynu owodniowego.
2) W ramach badań do niniejszej rozprawy analizowano dwa różne materiały biologiczne – osocze krwi oraz płyn owodniowy. Proszę o skomentowanie różnic metodologicznych w postępowaniu z wyżej wymienionymi matrycami, obejmujących m.in. zastosowanie innej kolumny chromatograficznej czy też innej objętości mieszaniny ekstrakcyjnej dodanej podczas procedury przygotowania próbki. Ponadto z czego wynikało zastosowanie różnych kryteriów podczas etapu filtrowania uzyskanych danych spektralnych? W przypadku próbek płynu owodniowego do dalszych analiz wyselekcjonowano powtarzalne sygnały zarejestrowane przynajmniej w 50% próbek kontrolnych, a w przypadku osocza wartość ta wynosiła 80%.
3) W części dotyczącej analizy danych Doktorantka poruszyła kwestię występowania braków danych (ang. *missing values*) i stwierdziła, że zastąpiono je „adekwatną

wartością". Proszę o doprecyzowanie, jakimi wartościami zastępowano brakujące dane. W publikacjach stanowiących rozprawę też brakuje takiej informacji.

4) Na metabolom danej próbki składają się małocząsteczkowe związki o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych, różnych masach, występujące na różnych poziomach stężeń. W związku z tym żadna z obecnie wykorzystywanych technik analitycznych nie pozwala na analizę wszystkich metabolitów występujących w próbce. Można stwierdzić, że zakres informacji na temat profilu metabolicznego badanej próbki ograniczony jest zastosowaną metodą analityczną. Chciałabym, żeby Doktorantka zaproponowała inne komplementarne metody lub modyfikacje zastosowanej metody, które można by było zastosować do kontynuacji podjętych badań, aby zwiększyć możliwości wykrycia różnicujących metabolitów związanych z występowaniem płodowego zespołu Downa.
5) W całej rozprawie przy podawaniu wartości liczbowych używano kropki zamiast przecinka. Domyślam się, że przyczyną tych błędów było zbyt pochopne przełożenie tekstu z języka angielskiego na język polski.
6) Ryciny 1 i 2 nie posiadają podanego źródła ani informacji o tym, czy stanowią one opracowanie własne Doktorantki.
7) W Tabeli 1 brakuje informacji o tym, czy podane wartości *p* uwzględniają korektę związaną z wielokrotnymi porównaniami (jednoczesnym testowaniem wielu hipotez). Jedynie w publikacji poświęconej płynowi owodniowemu Doktorantka wspomina o zastosowanej korekcie Benjamini-Hochberga.
8) W pracy nie uniknięto drobnych błędów interpunkcyjnych oraz określeń nie będących precyzyjnym językiem naukowym, np. polaryzacja pozytywna i negatywna zamiast dodatnia i ujemna czy też niezbyt trafnego tłumaczenia *missing values* jako „puste pola". Powyższe drobne błędy nie obniżają wartości rozprawy.

Podsumowując, przedstawiona praca doktorska koncentruje się na poszukiwaniu zmian w metabolomie krwi oraz metabolomie płynu owodniowego związanych z występowaniem zespołu Downa oraz określenia użyteczności tych zmian jako markerów diagnostycznych tego zespołu wad. Badania zawarte w dysertacji posiadają zatem nie tylko wartość poznawczą, ale także potencjał aplikacyjny wnosząc wkład w rozwój nowych metod w prenatalnej diagnostyce zespołu Downa. Zastosowana nowoczesna metodologia, opierająca się na technice LC-MS, potwierdza wysokie kwalifikacje analityczne Doktorantki oraz wysokie umiejętności z zakresu analizy i interpretacji danych. Mgr Ewa Paszkowska wykazała się

znajomością szeregu programów i testów umożliwiających stosowną analizę statystyczną wyników, a włączona do cyklu publikacja przeglądowa oraz rzetelna dyskusja wyników świadczą o specjalistycznej wiedzy i zdolności do krytycznej analizy literatury naukowej.

Biorąc pod uwagę powyższe, stwierdzam, że oceniana dysertacja spełnia ustawowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim i wnioskuję do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Ewy Paszkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Agnieszka Klupczyńska-Gabryszak