Katedra i Zakład Patofizjologii
UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE
ul. Jaczewskiego 8b, 20-090 Lublin
tel. +48 81 448 65 00

dr hab. Emilia Fornal
Katedra i Zakład Patofizjologii
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Jaczewskiego 8b
20-090 Lublin
tel. 81 448 65 09
e-mail: emilia.fornal@umlub.pl

Lublin, 23 sierpnia 2019

Recenzja rozprawy doktorskiej Karoliny Pietrowskiej pt. „Ocena profilu metabolicznego płynu komorowego pacjentów z cukrzycą typu 2 poddawanych zabiegowi usunięcia zaćmy"

Złożona rozprawa doktorska mgr Karoliny Pietrowskiej pod promotorstwem dr hab. Michała Ciborowskiego, promotor pomocniczy dr Diana Dmuchowska, ma formę zbioru trzech artykułów współautorskich, spójnych tematycznie, opublikowanych w latach 2017-2018 w czasopismach posiadających współczynnik wpływu (ang. *impact factor*, IF), znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR). Sumaryczny IF dla tych prac wynosi 7,201 (w oparciu o IF czasopisma na dzień publikacji). Na cykl składa się jedna praca przeglądowa (IF 2,831, pkt. MNiSW 35) i dwie prace oryginalne (IF 2,569, 1,801, pkt. MNiSW 30, 25), w których doktorantka jest pierwszym autorem. Wszyscy współautorzy złożyli oświadczenia określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie publikacji i wyrazili zgodę na wykorzystanie tych prac w pracy doktorskiej mgr Pietrowskiej. Po zapoznaniu się z oświadczeniami stwierdzam, że wskazują one jednoznacznie, że wydzielone zagadnienie, prezentowane w rozprawie doktorskiej jest indywidualnym wkładem mgr Karoliny Pietrowskiej.

W rozprawie doktorskiej mgr Pietrowska podjęła się oceny profilu metabolicznego płynu komorowego pacjentów z cukrzycą typu 2 poddawanych zabiegowi usunięcia zaćmy. Kompleksowe badania metabolitów, produktów procesów biochemicznych zachodzących w żywych organizmach, stanowi obiecujące narzędzie laboratoryjne do badania mechanizmów patofizjologicznych, identyfikacji potencjalnych biomarkerów diagnostycznych, badaniu efektów terapeutycznych leków i substancji naturalnych o potencjale terapeutycznym. Metabolomika umożliwiając pomiar stężenia szerokiego zakresu składników w jednej próbce może dostarczyć wszechstronnych informacji o specyficznych reakcjach organizmu na bodźce, szybką i kompleksową ocenę złożonych reakcji biologicznych organizmu

na czynniki zewnątrz- i wewnątrzpochodne. Każdy mechanizm patofizjologiczny spowodowany przez chorobę i każda substancja bioaktywna wprowadzona do organizmu nieuchronnie doprowadzi bowiem do powiązanych zmian stężeń określonych metabolitów. Celem badań metabolicznych jest nie tylko poszukiwanie nowych biomarkerów diagnostycznych, które mogą umożliwić wczesne wykrycie choroby, ale także biomarkerów przydatnych w doborze odpowiedniej interwencji terapeutycznej i oceny odpowiedzi na zastosowane leczenie. Badania metabolomiczne umożliwiają ocenę poziomów wielu metabolitów w jednym przebiegu analitycznym, co prowadzi do lepszej klasyfikacji próbek w porównaniu z oznaczeniem pojedynczego metabolitu, a w konsekwencji do lepszego dobory optymalnej dla pacjenta procedury medycznej. Metabolom płynów organizmu (np. krwi, moczu, potu, łez, śliny, płynu mózgowo-rdzeniowego, płynu komorowego) odzwierciedla metabolizm całego organizmu. Analiza metabolomu płynów może dostarczyć cennych i istotnych z klinicznego punktu widzenia informacji. O ile metabolom krwi i moczu jest badany często, dla wielu jednostek chorobowych, o tyle metabolom płynu komorowego w dużej mierze pozostaje nierozpoznany, jak słusznie zauważyła Autorka. Tymczasem analiza płynu komorowego może przyczynić się do lepszego poznania procesów biochemicznych zachodzących w oku w stanach fizjologicznych i patologicznych.

Obecnie główną przyczyną ślepoty na świecie jest zaćma. Szacuje się, że w 2025 na zaćmę będzie chorowało 40 milinów ludzi. Do najczęstszych czynników ryzyka wystąpienia i rozwoju zaćmy należą cukrzyca, stres oksydacyjny, ekspozycja na światło ultrafioletowe i palenie tytoniu. Zaćma pięciokrotnie częściej występuje u pacjentów z cukrzycą niż u pacjentów bez cukrzycy. Ponadto cukrzyca jest również czynnikiem ryzyka powikłań podczas operacji usunięcia zaćmy. Analiza endogennych składników płynu komorowego, których stężenie zależy od charakteru i szybkości produkcji płynu oraz od wymiany z różnymi tkankami podczas wewnątrzgałkowego przepływu płynu, może dostarczyć informacji istotnych dla pełniejszego zrozumienia patofizjologii zaćmy czy identyfikacji nowych celów interwencji terapeutycznej. Pani mgr Pietrowska w ramach swojej pracy podjęła się zbadania profilu metabolicznego płynu komorowego pacjentów z cukrzycą typu 2 poddawanych zabiegowi usunięcia zaćmy. Do przeprowadzenia oznaczeń profilu metabolicznego wybrała metodę chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS). Jako cel badań wyznaczyła opracowanie metody przygotowania i analizy płynu komorowego techniką LC-MS oraz identyfikację metabolitów różnicujących płyn komorowy pacjentów chorych na cukrzycę typu 2 od płynu komorowego pacjentów z grupy kontrolnej.

Złożona rozprawa doktorska mgr Karoliny Pietrowskiej została opatrzona zwięzłym, przejrzystym i klarownym komentarzem w języku polskim (35 strony), w którym Doktorantka wyjaśniła problem badawczy opisany w publikacjach oraz zreasumowała najważniejsze wnioski płynące z prac, dołączyła

również streszczenie w języku polskim oraz w języku angielskim. Doktorantka przedstawiła wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską, zestawienie publikacji Autorki, wykaz stosowanych skrótów. We Wstępie Doktorantka po krótce przedstawiła zagadnienie zaćmy i operacji usunięcia zaćmy, ogólną charakterystykę i funkcje płynu komorowego oraz opisała czym zajmuje się metabolomika i wyjaśniła w jaki sposób prowadzone są badania metabolomiczne. Kolejne rozdziały komentarza poświęciła przedstawieniu celu pracy, zwięzłemu opisowi materiałów i metod oraz syntetycznemu opisowi najważniejszych wyników badań oraz ich dyskusji. W rozdziale dziewiątym przedstawiła najważniejsze wnioski płynące z Jej badań. Komentarz uzupełnia lista trzydziestu dziewięciu pozycji bibliografii. Komentarz, w mojej ocenie, ma poprawną strukturę, mgr Pietrowska umiejętnie naświetliła w nim problem badawczy, poprawnie zdefiniowała cel swoich badań oraz trafnie zsumowała uzyskane wyniki oraz płynące z nich wnioski.

Zapoznanie ze stanowiącymi cykl publikacjami złożonymi jako rozprawa doktorska było utrudnione. Doktorantka zdecydowała się na wydruk prac w pomniejszeniu (ok. 30%), odczytanie tekstu stało się bardzo trudne, miejscami wręcz niemożliwe i wymusiło konieczność wydruku oryginalnych prac przez recenzentkę. Decyzja Doktorantki jest o tyle zaskakująca, że to właśnie cykl publikacji stanowi rozprawę doktorską i nie można publikacji traktować podrzędnie. Prezentacja publikacji pozostaje w dużym kontraście do sposobu prezentacji komentarza, który jest czytelny i przejrzysty.

W trzech publikacjach naukowych, przedłożonych do oceny jako rozprawa doktorska, doktorantka przedstawiła gruntowny przegląd metod analitycznych (130 pozycje bibliograficzne) stosowanych do oznaczania środków farmaceutycznych i małocząsteczkowych związków endogennych w płynie komorowym oraz zaprezentowała wyniki własnych badań nad opracowaniem profilu metabolicznego płynu komorowego oraz identyfikacji metabolitów różnicujących płyn komorowy pacjentów chorych na cukrzycę typu 2 od płynu komorowego pacjentów z grupy kontrolnej.

W publikacji przeglądowej (*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 159 (2018) 23-36) Doktorantka przedstawiła metody analityczne stosowane do oznaczania leków, w tym obniżających ciśnienie wewnątrzgałkowe i antybiotyków oraz związków endogennych w płynie komorowym. Omówiono szczegółowo zastosowania techniki chromatografii cieczowej z detekcją UV, fluorescencyjną i MS. Przegląd literatury w zakresie oznaczeń związków endogennych wskazał na bardzo małą liczbę badań w tym zakresie, przy czym większość z nich skoncentrowana była na modelach zwierzęcych. Tylko trzy badania dotyczyły związków endogennych w płynie komorowym ludzi. Dokonany przegląd literatury

wykazał, że ten obszar badawczy wymaga dalszej uwagi i wskazał na potrzebę dalszych badań szczególnie w celu zbadania zmian w metabolomie płynu komorowego wywołanych przez rozwój choroby.

W pracy pt. „LC-MS-based metabolic fingerprinting of aqueous humor" (*Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2017, ID 6745932) Doktorantka przedstawiła wyniki badań nad opracowaniem metody przygotowania i analizy próbki techniką LC-MS umożliwiającej detekcję największej ilości metabolitów należących do różnych klas chemicznych. Doktorantka dokonała doboru rozpuszczalnika ekstrakcyjno-precepitacyjnego oraz gradientu fazy ruchomej dla rozdziału RP-LC. Opracowana metoda LCQTOF pozwoliła wykryć ponad 1000 cech metabolicznych w płynie komorowym. Na poziomie MS (na podstawie pomiaru dokładnej masy i rozkładu izotopowego) 250 z nich przypisano do metabolitów, należących do różnych klas chemicznych, które przypisano do 47 szlaków metabolicznych. Zidentyfikowano ponad 50 metabolitów w płynie komorowym m.in.: związki wiązane z krótkowzrocznością, jaskrą i nadciśnieniem ocznym (kwasy tłuszczowe, acylokarnityny, sfingolipidy, amidy kwasów tłuszczowych), związki o właściwościach przeciwutleniających (kwas cytrynowy, kwas askorbinowy, kwas chinowy, kwas pantotenowy, betaina, tauryna), metabolity wiązane z mikroflorą jelitową (p-krezol, siarczan p-krezolu, kwas indoksylosiarczkowy). Oprócz metabolitów wykryto również substancje farmakologiczne obecne w kroplach i żelach do oczu, które podawano pacjentom.

W pracy „An exploratory LC-MS-based metabolomics study reveals differences in aqueous humor composition between diabetic and non-diabetic patients with cataract (Electrophoresis 39 (2018) 12331240) Doktorantka przedstawiła wyniki badań składu płynu komorowego u dorosłych chorych na cukrzycę i bez cukrzycy poddawanych operacjom zaćmy, podjętych w celu poszerzenia wiedzy na temat mechanizmów zaćmy u chorych na cukrzycę oraz zidentyfikowania metabolitów różnicujących płyny komorowe pacjentów z zaćmą chorych na cukrzycę typu 2 i niechorujących na cukrzycę, co może się przyczynić do zidentyfikowania nowych potencjalnych celów terapeutycznych. Oznaczenie metabolomiczne przeprowadzono metodą LC-RP-QTOF MS/MS i LC-HILIC-QTOF MS/MS, co pozwoliło wykryć i zidentyfikować metabolity o szerokim spektrum właściwości fizykochemicznych. W wyniku badań wskazano 125 cech statystycznie istotnie różnicujących grupy badane, 29 z nich zidentyfikowano. Uzyskane wyniki badań wskazały na zwiększony stres oksydacyjny u pacjentów z cukrzycą typu 2 i zaburzenia w metabolizmie aminokwasów. Zaobserwowane obniżone poziomy pochodnych tryptofanu, wykazujących właściwości chroniące przed promieniowaniem UV, u pacjentów z cukrzycą typu 2 może skutkować zwiększonym narażeniem na to promieniowanie i w konsekwencji może prowadzić do przyspieszonego rozwoju zaćmy.

Doktorantka umiejętnie zaplanowała i przeprowadziła badania, które pozwoliły jej zrealizować założone cele – opracowała metodę analityczną do analizy metabolomicznej płynu komorowego metodą LC-MS, uzyskała informacje o profilu metabolicznym płynu komorowego u pacjentów z zaćmą chorych na cukrzycę typu 2 oraz zidentyfikowała metabolity różnicujące płyn komorowy tych pacjentów od pacjentów z zaćmą niechorujących na cukrzycę. Uzyskane wyniki są pierwszym opublikowanymi doniesieniem naukowym wykazującym różnice w składzie płynu komorowego między pacjentami z zaćmą z rozwiniętą cukrzycą typu 2 i bez cukrzycy. Zaobserwowano głównie różnice w przeciwutleniaczach, a także aminokwasach i ich pochodnych, co wskazuje, że zwiększony stres oksydacyjny i zaburzenia metabolizmu aminokwasów w płynie komorowym mogą być odpowiedzialne za wcześniejszy początek zaćmy u chorych na cukrzycę. Leczenie przeciwutleniaczami lub inhibitorami glikacji aminokwasów może spowolnić związane z cukrzycą zmiany biochemiczne prowadzące do zaćmy. Ponieważ badania nie obejmowały krwi, nie jest wiadomo, jak zauważyła Doktorantka, czy różnice w składzie metabolicznym płynu komorowego są odzwierciedleniem zmian metabolitu we krwi obwodowej. Zachęcam mgr Pietrowską do kontynowania badań i poszukiwania dalszych odpowiedzi w tym intrygującym i ważnym obszarze badawczym.

Doktorantka w swojej pracy nie ustrzegła się kilku drobnych błędów i nieścisłości:

- definicja cechy metabolicznej przedstawiona na stronie 25 jest nieprawidłowa;

- nie opisano procedury przygotowania ślepej próby (ang. *blank extractin*) " (str. 57);

- nie wyjaśniono w jaki sposób określano intensywność do wyliczenia współczynnika wariancji CV (powierzchni piku, wysokości piku?).

W komentarzu cel drugi (str. 20) został sformułowany nieco niefortunnie i niezdarnie, choć trzeba przyznać, że można z niego odczytać intencje Autorki. W tym miejscu należy podkreślić jednak, że cele zostały prawidłowo sformułowane w każdej publikacji stanowiącej rozprawę doktorską. Czy Doktorantka może zaproponować alternatywne brzemiennie dla celu 2 przedstawionego w komentarzu na str. 20?

W płynie komorowym zidentyfikowano na poziomie MS 250 cech metabolicznych. 50 z tych cech potwierdzono/zidentyfikowano na podstawie widma MS/MS. Proszę określić jaka cześć z pozostałych 200 cech metabolicznych a) nie została potwierdzenia ze względu na niezgodność uzyskanego widma MS/MS z widmem w bazach, a jaka b) nie została potwierdzona ze względu na brak widm w bazach. Bardzo proszę przedstawić zwięzłą dyskusję dotyczącą napotykanych trudnościami w identyfikacji metabolitów oraz ograniczeniach LC-QTOF w identyfikacji metabolitów.

Podsumowując, Doktorantka trafnie zidentyfikowała ważny problem badawczy, klarownie go przedstawiła i poprawnie sformułowała cel badawczy. Właściwie dobrała metody badawcze i zaplanowała eksperymenty, które pozwoliły jej opracować metodę LC-MS dla płynu komorowego oraz zidentyfikować metabolity różnicujące płyn komorowy pacjentów chorych na cukrzycę typu 2 od płynu komorowego pacjentów z grupy kontrolnej. Ponadto Pani mgr Pietrowska wykazała się umiejętnością analizy i interpretacji danych, przygotowania manuskryptów publikacji naukowych do druku oraz przeprowadzenia dyskusji naukowej.

Biorąc pod uwagę wszystkie powyższe fakty i argumenty stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Karoliny Pietrowskiej pt. „Ocena profilu metabolicznego płynu komorowego pacjentów z cukrzycą typu 2 poddawanych zabiegowi usunięcia zaćmy" przygotowana pod opieką dra hab. Michała Ciborowskiego i dr Diany Dmuchowskiej spełnia wszystkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim o dopuszczenie Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, w związku z wysoką jakością badań o dużym znaczeniu poznawczym składam wniosek o wyróżnienie przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej mgr Pietrowskiej.

Lublin, dn. 23.08.2019