Dr hab. Piotr Młynarz, prof. PWr
Zakład Chemii Bioorganicznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Wrocławska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław

Wrocław, 25.08.2019 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani lek. Izabeli Kiluk zatytułowanej „Charakterystyka pacjentów z ostrą zatorowością płucną, obserwacja wieloletnia"

Przedstawiona do oceny dysertacja doktorska została wykonana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. n. med. Bożeny Sobkowicz w Katedrze i Klinice Kardiologii Uniwersyteckiej Szpitala Klinicznego w Białymstoku.

Pomimo upływu prawie trzech dekad, które minęły do tej pory od zapoczątkowania systematycznych badań metabolomicznych, nie zostały one implementowane w rutynowych badaniach klinicznych. Chociaż, w znacznej mierze przyczyniły się do poznania podłoża molekularnego wielu chorób cywilizacyjnych i zapalnych. Obserwacja zmian poziomów metabolitów w szeroko pojętym materiale biologicznym pochodzącym od pacjentów, w porównaniu z grupą kontrolną, którą są najczęściej osoby zdrowe, pozwala na obserwację zmian poziomów w kluczowych szlakach biochemicznych. Takie podejście sprzyja zastosowaniu metabolomiki jako narzędzia diagnostycznego i predykcyjnego w medycynie, choć niewątpliwie słabym punktem tej metody jest pobór, przygotowanie próbki oraz sam pomiar, który często różni się pomiędzy grupami badawczymi. Brak standaryzacji procedur znacznie sprzyja powstawaniu różnic w prowadzonych badaniach oraz jest bez wątpienia główną barierą zastosowania narzędzi metabolomicznych w medycynie.

Niniejsza rozprawa doktorska poświęcona jest w całości jednej tematyce badawczej związanej z analizą osocza pacjentów z ostrą zatorowością płucną (OZP) za pomocą spektrometrii mas połączonej z chromatografią gazową (GC-MS) oraz cieczową (LC-MS). Praca składa się z 82 stron, posiada układ standardowy złożony z 14 rozdziałów, z których najważniejsze to: wstęp, cel rozprawy, materiały i metody, wyniki, omówienie wyników i dyskusja, wnioski, ograniczenia pracy, streszczenie, streszczenie w języku angielskim, piśmiennictwo, wykaz stosowanych skrótów, spis tabel, spis rycin oraz skale. W tym miejscu muszę dodać, że moim zdaniem dla czytelnika cztery ostatnie rozdziały powinny znaleźć się na początku pracy w celu poprawienia komfortu jej czytania.

Praca zawiera bardzo skondensowany wstęp literaturowy, w którym Autorka dysertacji porusza rutynową diagnostykę OZP oraz jej słabe punkty, medycynę spersonalizowaną oraz problem rozproszonych badań metabolomicznych. Spośród wszystkich tematów podjętych we wstępie zabrakło moim zdaniem szerszego opisu dotychczasowych doniesień literaturowych na temat zastosowania badań metabolomicznych w OZP.

Następny rozdział to cel pracy, w której nadrzędnym celem była „*Ocena czynników związanych z wystąpieniem OZP przy użyciu metod tradycyjnych oraz metabolomicznego odcisku palca*". Natomiast do celów podrzędnych składających się na eksplorację podjętego wyzwania naukowego należy poszukiwanie profilu metabolitów osocza krwi pacjentów cierpiących na OZP

w porównaniu do grupy kontrolnej oraz „*wskazanie osoczowych metabolitów różnicujących pacjentów hospitalizowanych z powodu ostrej zatorowości płucnej od osób z grupy kontrolnej, ze szczególnym uwzględnieniem pacjentów z idiopatyczną OZP, oraz pacjentów z OZP z potwierdzoną zakrzepica żył głębokich kończyn dolnych oraz bez zakrzepicy celem wskazania nowych potencjalnych markerów diagnostycznych i prognostycznych dla OZP*". Ten fragment celu pracy, zdaniem recenzenta, został napisany w bardzo skomplikowany sposób. Dodatkowy cel, który mógłby być wpisany do tego rozdziału to wpływ leku enoksaparyny na poszczególne grupy pacjentów, który jest w pracy opisany w podrozdziale 3.3 zatytułowanym „*Charakterystyka metabolomiczna*".

W dalszej części pracy w rozdziale trzecim „ *Materiały i metody*" została w dość skrupulatny sposób opisana metodyka przygotowania próbek, warunki analizy, a także obróbki i analizy danych. Niniejsza część pracy została przedstawiona w taki sposób, że może stanowić przewodnik do odtworzenia przeprowadzonych eksperymentów oraz obliczeń statystycznych i chemometrycznych. W jednym tylko punkcie recenzent został zaskoczony faktem (str. 13, podrozdział 3.3.2), że Doktorantka zastosowała miarę „dwóch kropli".

Niewątpliwym sukcesem tej pracy jest dobrze zaplanowany eksperyment (opis parametrów medycznych, dobór pacjentów, dobór jednostek chorobowych), co posiada bezpośredni wpływ na otrzymane wyniki, które zostały opisane w rozdziale czwartym. W zaprezentowanym eksperymencie zostało pobrane osocze pochodzące od 36 pacjentów (33% z rozpoznaniem OZP idiopatycznym oraz 67% z rozpoznaniem nieidiopatycznym) oraz od 13 osób zdrowych (kontrola). Spośród pacjentów wyselekcjonowano osoby z ZŻG (zakrzepicą żył głębokich) oraz bez ZŻG. Charakterystyka pacjentów z OZP wraz z wyróżnieniem parametrów różnicujących pacjentów z idiopatyczną i nieidiopatyczną OZP, ZŻG oraz bez ZŻG została zebrana w tabelach 2-4. Pobrany materiał był analizowany, tak jak już wcześniej wspomniałem, za pomocą dwuplatformowego podejścia, stosując metodę LC-MS oraz GC-MS. Taki sposób analizy materiału biologicznego sprzyja komplementarnemu poszukiwaniu istotnych metabolitów, które uczestniczą w poszczególnych szlakach biochemicznych, które są związane z rozwijającymi się procesami chorobotwórczymi w organizmie.

W pierwszym etapie prac, w celu oceny wpływu enoksaparyny na organizm ludzki została przeprowadzona analiza wielowymiarowa i jednowymiarowa otrzymanych danych z pomiarów analitycznych dla grupy kontrolnej przed i po podaniu leku. Z wykonanej analizy OPLS-DA (Ryc. 5) wynika, że podanie enoksaparyny zmienia metabolom grupy kontrolnej. Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała 85 znacząco zmienionych metabolitów, które zostały znalezione jako różnicujące obie grupy, spośród nich zostało zidentyfikowanych 19 (a nie 20) i przedstawionych wraz ze zmianami procentowymi w tabeli 7. W dalszej części pracy przeprowadzono w identyczny sposób analizę różnic pomiędzy grupą kontrolną po przyjęciu enoksaparyny z pacjentami cierpiącymi na OZP. Analiza OPLS-DA wykazała bardzo dobry rozdział pomiędzy badanymi grupami (parametry R2=0.985, Q2=0.751). Analiza statystyczna wykazała 430 cech metabolicznych różnicujących obie grupy, z których zidentyfikowano 85 (Tabela 8). Następnie oceniono metabolom osób zdrowych po przyjęciu enoksaparyny względem pacjentów z idiopatyczną OZP, nieidiopatyczną OZP, z ZŻP oraz bez ZŻP (Ryc. 7, Tabele 9, 10, 11). Następnie zostały wykonane analizy poszczególnych stanów patologicznych poprzez zastosowanie diagramów Venna. W tym celu określono różnicę w metabolitach osocza pomiędzy grupami chorobowymi w odniesieniu do grupy kontrolnej. Wszystkie metabolity wspólne i różnicujące zostały przedstawione w sposób bardzo czytelny na rycinie 9 i 10, natomiast analiza szlaków matabolicznych dla poszczególnych stanów chorobowych na rycinie 11, 12,

13. Takie podejście pozwala na analizę najbardziej zaburzonych szlaków biochemicznych, co ma niezwykle ważne znaczenie w poszukiwaniu nowych celów terapeutycznych.

Bardzo ciekawym rozdziałem jest fragment dysertacji zatytułowany „*Omówienie wyników i dyskusja*". Autorka dysertacji przedstawia w nim różnice pomiędzy badanymi grupami wraz z próbą wyjaśnienia zachodzących zmian w organizmie ludzkim. Niewątpliwym osiągnięciem tej pracy jest opis efektu działania enoksaparyny na organizm osób zdrowych, dzięki czemu Autorka mogła zanalizować zmiany metaboliczne wywołane samym lekiem. Kolejnym porównaniem była komplementarna analiza pacjentów OZP względem osób zdrowych, która wykazała największe zmiany w metabolizmie glicerofosfolipidów, następnie mniejsze w biosyntezie glikozylofosfatydyloinozytolu oraz najmniejsze w metabolizmie kwasu linowego, alfa-linolowego i arachidonowego. Ciekawą obserwacją, która jest rezultatem niniejszej pracy, są znacznie większe zmiany w metabolizmie, w przypadku nieidiopatycznej OZP w odniesieniu do idiopatycznej OZP. Z przedstawionej analizy jasno wynika zaangażowanie poszczególnych szlaków metabolicznych w obu chorobach w tym dla nieidiopatycznej spośród najbardziej zmienionych szlaków należy wymienić metabolizm glicyny, seryny i treoniny, biosyntezy aminoacylo-tRNA, metabolizm aminokwasów BCAA oraz metabolizm kwasu pirogronowego. Jest to bardzo dobra obserwacja wskazująca na zmiany, na poziomach molekularnych, które zachodzą w tych dwóch stanach patologicznych. Podobne porównanie zostało przeprowadzone dla pacjentów z ZŻG względem pacjentów bez ZŻG, w odniesieniu do grupy kontrolnej. W tym miejscu również Doktorantka zauważyła, że więcej zmian zachodzi w metabolizmie pacjentów z ZŻG, co wydaje się tez być bardzo logiczne. Dodatkowo zostało zauważone, że wykres przedstawiający analizę szlaków metabolicznych pacjentów z idiopatyczną OZP oraz pacjentów bez ZŻP jest podobny.

Spośród wszystkich opisów prawdopodobnych przyczyn zachodzących w poszczególnych szlakach metabolicznych towarzyszących poszczególnym stanom patologicznym opisanych w dalszej części dysertacji zostały opisane zmiany w procesie hipoksji, metabolizmie energetycznym, metabolizmie lipidów, procesach przekazywania sygnałów i informacji genetycznej. Najbardziej ciekawym moim zdaniem jak również najbardziej kontrowersyjnym może być założony proces hipoksji. W związku z tym mam pytanie o oznaczenia czynnika transkrypcyjnego HIF-1, oraz poziomów mleczanu oraz ciał ketonowych w analizowanym materiale biologicznym.

Opisową część pracy zamyka rozdział „Podsumowanie i wnioski" napisany w języku polskim i angielskim, w którym zostały skrótowo podsumowane osiągnięcia niniejszej dysertacji.

Reasumując, wszystkie cele rozprawy doktorskiej zostały zrealizowane. Jednak do najważniejszych osiągnięć pracy doktorskiej zaliczam rozróżnienie metaboliczne OZP nieidiopatyczne od idiopatycznego oraz pacjentów z ZŻG i bez ZŻG wraz z opisem zmienionych szlaków metabolicznych, co może stanowić bardzo dobry punkt wyjściowy do dalszych badań. Mam nadzieję, że ze względu na swoją wysoką wartość naukową przedstawione w pracy wyniki zostaną jak najszybciej opublikowane w renomowanym czasopiśmie naukowym.

W tym miejscu muszę wspomnieć, że według bazy „*Web of Science*" Doktorantka jest współautorką 4 publikacji naukowych oraz 5 doniesień konferencyjnych, co świadczy o dużym zaangażowaniu Pani lek. Izabeli Kiluk w badania naukowe prowadzone na Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku.

Na samym końcu z obowiązku recenzenta muszę wspomnieć, że pomimo tego, iż praca jest napisana w sposób bardzo czytelny Doktorantka nie ustrzegła się użycia kolokwializmów, błędów

edytorskich, językowych oraz interpunkcyjnych, których w swoim zwyczaju nie wymieniam, ponieważ nie wpływają na wartość naukową pracy.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani lek. Izabeli Kiluk spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z 18 kwietnia 2003 z późniejszymi zmianami i uzupełnieniami) „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki" i wnioskuję o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.