



Zakład Bioanalitiki
UNIwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Jaczewskiego 8b, 20-090 Lublin
tel. +48 81 448 65 00

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

Lublin, 21 grudnia 2023

Recenzja rozprawy doktorskiej Małgorzaty Artymowicz

pt. „Zastosowanie podejścia celowanej analizy metabolomicznej w prospektywnej ocenie ilościowych zmian profili nukleozydów przed i po resekcji guza pęcherza moczowego”

Złożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Artymowicz, przygotowana pod promotorstwem dr. hab. Danuty Siluk, prof. uczelni i dr Wiktorii Stuck-Lewickiej, ma formę zbioru trzech artykułów współautorskich, spójnych tematycznie, opublikowanych w latach 2018 - 2023 w czasopismach posiadających współczynnik wpływu (ang. *impact factor*, IF), znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports* (JCR). Sumaryczny IF dla tych prac wynosi 13,207 (w oparciu o IF czasopisma na dzień publikacji). Na cykl składa się jedna praca przeglądowa (IF 3,443) i dwie prace oryginalne (IF 5,464; 4,3). W każdej z tych prac Doktorantka jest pierwszą autorką. Wszyscy współautorzy złożyli oświadczenia określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie publikacji. Po zapoznaniu się z oświadczeniami stwierdzam, że wskazują one, że wydzielone zagadnienie, prezentowane w rozprawie doktorskiej jest indywidualnym wkładem mgr Małgorzaty Artymowicz.

W rozprawie doktorskiej mgr Małgorzata Artymowicz podjęła się opracowania metody analitycznej umożliwiającej jednoczesnego oznaczania nukleozydów i deoksynukleotydydów oraz oceny zmian stężeń jedenastu nukleozydów i deoksynukleotydydów, potencjalnych markerów ryzyka nawrotu raka pęcherza moczowego: pseudourydyny, urydyny, N3-metylourydyny, inozyny, N2-metyloguanozyny, N2,N2-dimetyloguanozyny, N6-metyloadnozyny, 2-metylotioadenozyny, 5-metylotioadenozyny, 2-deoksyguanozyny i 8-hydroksy-2-deoksyguanozyny w próbkach moczu pobranych od pacjentów przed

zabiegiem przezcewkowej resekcji guza pęcherza moczowego (TURBT) oraz w czasie do 12 miesięcy po operacji wycięcia guza.

Rak pęcherza moczowego jest dziesiątym pod względem częstości występowania typem nowotworu wśród ludzi na świecie. W chorobie tej istnieje duże ryzyko nawrotu i progresji choroby. Doskonalenie narzędzi diagnostycznych i prognostycznych jest jednym z aktualnych wyzwań stojących przed badaczkami i badaczami. Włączenie się Doktorantki w badania nad weryfikacją markerów diagnostycznych, które pozwoliłyby ocenić na wczesnym etapie ryzyko nawrotu choroby, uważam za trafne i cenne. Równie trafne jest rozpoznanie, że sukces badań nad markerami metabolicznymi jest ściśle powiązany (uzależniony) od dostępności wiarygodnych, czułych i selektywnych metod analitycznych, które zapewnią precyzyjne i dokładne monitorowanie metabolitów w płynach ustrojowych. Doktorantka umiejętnie zidentyfikowała ważny społecznie obszar badawczy, dobrze zdefiniowała problem badawczy i prawidłowo wyznaczyła cele.

Rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Artymowicz, którą stanowi cykl trzech publikacji, została opatrzona komentarzem w języku polskim, na który składa się *Wykaz skrótów*, *Streszczenie* w języku polskim i angielskim, *Część teoretyczna*, *Cel pracy*, kilkustronicowe wprowadzenie do każdej publikacji prezentującej wyniki własnych badań literaturowych i eksperymentalnych prac naukowych, *Podsumowanie i Wnioski* oraz *Bibliografia*. Część doświadczalną pracy stanowią dwie publikacje w języku angielskim opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych o obiegu międzynarodowym *Sustainable Chemistry and Pharmacy* i *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Trzecia publikacja wchodząca w skład cyklu to praca przeglądowa przygotowana również w języku angielskim. Pracę opublikowano w czasopiśmie *Advances in Clinical Chemistry*. Doktorantka włączyła tą pracę do dysertacji jako podrozdział rozdziału zatytułowanego *Część doświadczalna*. Uważam, że dla zachowania spójności tytułów rozdziałów i zawartych w podrozdziałach treści bardziej odpowiednie było by umieszczenie pracy przeglądowej w rozdziale *Część teoretyczna* lub nadanie innych tytułów rozdziałom np. zamiast *Część teoretyczna – Wprowadzenie* a zamiast *Część doświadczalna – Cykl publikacji*. Pani mgr Artymowicz dołączyła do rozprawy zgody Komisji Bioetycznej, oświadczenia współautorów artykułów ujętych w cyklu publikacji stanowiących podstawę Jej dysertacji oraz wykaz osiągnięć. Struktura pracy jest zrozumiała i poprawna.

Na początku swojej dysertacji Doktorantka przedstawiła uzasadnienie podjęcia badań naukowych nad markerami diagnostycznymi dla raka pęcherza moczowego, omówiła zastosowania metabolomiki w badaniach biomedycznych, przedstawiła nukleozydy i deoksynukleotydy jako wskaźniki stanów patofizjologicznych i potencjalne markery diagnostyczne, zaprezentowała metody ich izolacji oraz analizy. Dużo uwagi poświęciła wyborowi celów metabolicznych dla swoich badań i obszernie wyjaśniła przesłanki leżące u podstaw Jej decyzji. Argumentacja jest dobrze poprowadzona i klarownie przedstawiona. Bez wątplenia Doktorantka potrafi umieścić w szerszym kontekście swoje badania i rozumie ich wagę i znaczenie. Praca przeglądowa, opublikowana w 2018 r., wchodząca w skład cyklu, poświęcona nukleozydom i deoksynuleozydom w moczu jest obszernym kompendium wiedzy (opartym na przeglądzie 125 pozycji literaturowych z lat 2000-2017) o strukturze i właściwościach fizykochemicznych tych metabolitów, metodach przygotowania próbek moczu do ich oznaczeń oraz metodach analitycznych wykorzystywanych do ich rozdziału i detekcji. W pracy szczegółowo omówiono także badania nad rolą nukleozydów w nowotworzeniu. Przedstawiono aktualny stan wiedzy o wykorzystaniu deoksynukleozydów jako markerów stresu oksydacyjnego oraz nukleozydów jako markerów procesów i chorób nowotworowych. W *Części teoretycznej* Doktorantka przywołała również prace dotyczące powyższych zagadnień, które ukazały się w latach późniejszych, tj. 2019-2023, co wskazuje, że Doktorantka śledziła doniesienia naukowe w interesującym ją obszarze badawczym rozumiejąc wagę bieżącego aktualizowania wiedzy w pracy badawczej. W mojej ocenie Doktorantka posiada wiedzę teoretyczną niezbędną do prawidłowego prowadzenia prac badawczych, których się podjęła.

Część eksperymentalną rozprawy doktorskiej mgr Artymowicz poprzedza rozdział zatytułowany *Cel pracy*, w którym Doktorantka wskazała główny cel realizowanych prac badawczych, przywołany przeze mnie już powyżej (drugi paragraf) oraz zdefiniowała sześć celi szczegółowych. W mojej opinii cele te powinny zostać ograniczone wyłącznie do celi badawczych (poz. 2-5), z pominięciem celu o charakterze technicznym („zebranie próbek moczu”, poz. 1). Wyniki uzyskane w trakcie badań oraz wnioski z nich płynące Doktorantka przedstawiła w dwóch publikacjach naukowych opublikowanych w czasopiśmie o obiegu międzynarodowym indeksowanych w bazie JCR, które zamieściła w rozdziale 2 i 3 *Części doświadczalnej* rozprawy.

Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że doktorantka bardzo kompleksowo podeszła do zagadnienia oceny zmian stężeń jedenastu nukleozydów i deoksynukleozydów jako potencjalnych

markerów ryzyka nawrotu raka pęcherza moczowego, w próbkach moczu pobranych od pacjentów przed zabiegiem przezcewkowej resekcji guza pęcherza moczowego oraz w czasie do 12 miesięcy po operacji wycięcia guza. Prace badawcze rozpoczęła od opracowania i optymalizacji metody ekstrakcji, która umożliwiła jednoczesną izolację nukleozydów i deoksynukleozydów. W procesie tym zastosowała ustrukturyzowane podejście oparte o narzędzia chemometryczne, wykorzystując metodę planowania doświadczeń (ang. *design of experiment*, DoE). Trafnie dokonała doboru czynników, przestrzeni i modeli. Realizacja prac badawczych w tym etapie wymagała od niej nabycia umiejętności z wielu obszarów eksperymentalnej pracy badawczej m.in. planowania eksperymentu optymalizacyjnego, prowadzenia ekstrakcji do ciała stałego (SPE), doboru warunków analiz chromatograficznych (HPLC) w tym sprzężonych ze spektrometrią mas (LC/MS), prowadzenia analiz HPLC i LC/MS. Bardzo proszę Doktorantkę o krótki komentarz, które z tych prac wykonywała samodzielnie, które etapy nastroczały jej największych trudności, jakich? Które etapy przyczyniły się w największym stopniu do rozwoju jej warsztatu badawczego?

W wyniku przeprowadzonych wieloetapowych prac optymalizacyjnych Doktorantka ustaliła warunki prowadzenia efektywnej ekstrakcji jedenastu analitów, które stanowiły przedmiot jej zainteresowania. Zoptymalizowaną procedurę ekstrakcji przedstawiła na str. 109 rozprawy. Procedura umożliwia przygotowanie próbek do analizy w krótkim czasie (18 min) i może być łatwo zaimplementowana do rutynowych oznaczeń do badań przed- i klinicznych. Pomimo uzyskania satysfakcjonujących wyników Doktorantka postanowiła dalej uprościć przygotowanie próbek moczu do analiz. Kierując się argumentami zwiększania przepustowości laboratorium, skracania czasu oznaczeń, upraszczania procedur, obniżania kosztów oznaczeń postanowiła dokonać oceny, czy możliwe jest uzyskanie porównywalnych wyników oznaczeń dla badanych jedenastu nukleozydów i deoksynukleozydów stosując alternatywną metodę przygotowania próbek moczu nie wymagającą ekstrakcji analitów do ciała stałego. Doktorantka wykazała, że podobny efekt można osiągnąć stosując metodę rozcieńczeniowo-precypitacyjną. Uproszczonej procedurę przygotowania próbek moczu przedstawiła na str. 123 rozprawy. Czy Doktorantka oceniała i porównywała efekt matrycowy dla obu metod przygotowania próbki? Doktorantka wskazuje, że próbki moczu rozcieńczała i wytrącała składniki matrycy. Czy wytrącony osad był oddzielany przed suszeniem próbek do sucha?

W kolejnym etapie swoich prac badawczych mgr Artymowicz opracowaną metodę analityczną, obejmującą etap przygotowania próbki oraz etap analizy LC/MS prowadzonej z wykorzystaniem spektrometru mas typu potrójny kwadrupol pracującego w trybie dMRM (ang. dynamic multiple reaction monitoring) poddała walidacji, w celu wykazania, że jest on odpowiednia do zamierzonego celu badawczego. Doktorantka wykazała, że opracowana przez nią metoda spełnia stawiane metodom bioanalitycznym kryteria akceptowalności (zgodnie z wytycznymi EMA i FDA). W oznaczeniu nie korzystano z analogów analitów - wzorców znakowanych izotopowo. Czy i w jakim sposób zastosowanie wzorców znakowanych izotopami wpłynęło by na parametry walidacyjne metody? Jakie wartości efektów matrycowych obserwowano dla badanych metabolitów?

W ostatnim etapie Doktorantka wykorzystwała zwalidowaną metodę do ilościowego oznaczenia stężenia jedenastu nukleozydów i deoksynukleozydów: pseudourydyny, urydyny, N3-metylourydyny, inozyny, N2-metyloguanozyny, N2,N2-dimetyloguanozyny, N6-metyloadnozyny, 2-metylotioadenozyny, 5-metylotioadenozyny, 2-deoksyguanozyny i 8-hydroksy-2-deoksyguanozyny w 133 próbkach moczu od 53 pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem pęcherza moczowego pobranych przed i po operacji przezcewkowej resekcji guza pęcherza moczowego a także w pięciu punktach czasowych po operacji (2, 3, 6, 9, 52 tygodniach po operacji). Uzyskane wyniki znormalizowała względem stężenia kreatyniny i przeprowadziła analizę statystyczną metodą hierarchicznych modeli liniowych. Największe różnice w stężeniu nukleozydów zaobserwowała między próbkami pobranymi przed i po operacji dla dwóch metabolitów 2-metylotioadenozyny i inozyny.

Praca doktorska została bardzo starannie przygotowana pod względem edytorskim. Nieliczne błędy lub nieścisłości wkradły się m.in. w miejscach, gdzie Autorka napotkała trudność z wyjaśnieniem w języku polskim znaczenia stosowanych akronimów (wywodzących się z języka angielskiego), dość dowolnie i niespójnie rozwija niektóre skrótowce np. dMRM i MRM czy QqQ i QTRAP.

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 rozwiązać oryginalny problem naukowy - opracować i walidować metodę analityczną do ilościowego oznaczania stężenia jedenastu nukleozydów i deoksynukleozydów w moczu oraz dokonać oceny stężenia tych metabolitów w próbkach moczu pobranych od pacjentów przed zabiegiem przezcewkowej resekcji guza pęcherza moczowego oraz w czasie do 12 miesięcy po operacji

wycięcia guza. Należy podkreślić, że opracowana metoda może zostać wdrożona do oznaczania tych wskaźników, posiadających potencjał diagnostyczny i prognostyczny, do dalszych badań nad rolą nukleozydów i deoksynukleozydów w procesie nowotworzenia i celowanej oceny ilościowych zmian profili nukleozydów i deoksynukleozydów w różnych jednostkach chorobowych. W mojej ocenie, doktorantka posiadała ogólną wiedzę teoretyczną niezbędną do realizacji prac badawczych oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Biorąc pod uwagę wszystkie powyższe fakty i argumenty stwierdzam, że rozprawa doktorska Małgorzaty Artymowicz pt. „Zastosowanie podejścia celowanej analizy metabolomicznej w prospektywnej ocenie ilościowych zmian profili nukleozydów przed i po resekcji guza pęcherza moczowego” przygotowana pod opieką promotorską dr. hab. Danuty Siluk, prof. uczelni (promotor) i dr. Wiktorii Stuck-Lewickiej (promotor pomocniczy) spełnia wszystkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Autorki do dalszych etapów przewodu i nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Ze względu na wysoki poziom naukowy i duży potencjał aplikacyjny badań wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej.

Lublin, dn. 21 grudnia 2023



Signed by /
Podpisano przez:

Emilia Maria Fornal
Uniwersytet
Medyczny w Lublinie

Date / Data: 2023-
12-21 13:46



Zakład Bioanalitiki
UNIwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Jaczewskiego 8b, 20-090 Lublin
tel. +48 81 448 65 00

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

Lublin, 21 grudnia 2023

Dotyczy rozprawy doktorskiej Małgorzaty Artymowicz pt. „Zastosowanie podejścia celowanej analizy metabolomicznej w prospektywnej ocenie ilościowych zmian profili nukleozydów przed i po resekcji guza pęcherza moczowego”

WNIOSEK O WYRÓŻNIENIE PRACY DOKTORSKIEJ

Niniejszym zwracam się z wnioskiem do Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Małgorzaty Artymowicz pt. „Zastosowanie podejścia celowanej analizy metabolomicznej w prospektywnej ocenie ilościowych zmian profili nukleozydów przed i po resekcji guza pęcherza moczowego” przygotowanej pod promotorstwem dr. hab. Danuty Siluk, prof. uczelni i dr Wiktorii Stuck-Lewickiej.

Doktorantka opracowała i zwalidowała metodę analityczną do ilościowego oznaczania stężenia jedenastu nukleozydów i deoksynukleozydów w moczu oraz dokonała oceny stężenia tych metabolitów w próbkach moczu pobranych od pacjentów przed zabiegiem przezcewkowej resekcji guza pęcherza moczowego oraz w czasie do 12 miesięcy po operacji wycięcia guza. Opracowana metoda ma duży potencjał aplikacyjny, może zostać wdrożona do oznaczania tych wskaźników, posiadających potencjał diagnostyczny i prognostyczny, do dalszych badań nad rolą nukleozydów i deoksynukleozydów w procesie nowotworzenia i celowanej oceny ilościowych zmian profili nukleozydów i deoksynukleozydów w różnych jednostkach chorobowych. Wyniki badań będące przedmiotem pracy zostały opublikowane w czasopiśmie posiadającym współczynnik wpływu (ang. *impact factor*, IF), znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports* (JCR). Sumaryczny IF dla tych prac wynosi 13,207 (w oparciu o IF czasopisma na dzień publikacji). W każdej z tych prac Doktorantka jest pierwszą autorką.

Ze względu na wysoki poziom naukowy i duży potencjał aplikacyjny badań mgr Małgorzaty Artymowicz wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej.



Signed by /
Podpisano przez:

Emilia Maria Fornal
Uniwersytet
Medyczny w
Lublinie

Date / Data: 2023-
12-21 13:23