



Politechnika Łódzka, Wydział Chemiczny
Instytut Chemii Ogólnej i Ekologicznej
90-924 Łódź, ul. Żeromskiego 116
tel. +48 42 631-30-91, fax +48 42 631-31-28

Prof. dr hab. inż. Joanna Kałużna-Czaplińska

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr farm. Anny Rajskiej zatytułowanej

*„Ocena patogenezy hiperandrogenizmu oraz zaburzeń metabolicznych wśród kobiet
z zespołem policystycznych jajników przy użyciu analizy metabolomicznej”*

wykonanej

w Katedrze Biofarmacji i Farmakodynamiki Gdańskiego

Uniwersytetu Medycznego

Promotorzy pracy doktorskiej to:

Prof. dr hab. n. farm. Michał Jan Markuszewski

Prof. dr hab. n. med. Dominik Rachoń

Ocena wyboru tematyki badawczej

Badania z obszaru metabolomiki, które uwzględniają trzy podejścia naukowe: metabolomiczny odcisk palca, badanie profili metabolicznych oraz celowaną analizę metabolomiczną są obiecującym narzędziem służącym do oceny zmian patologicznych, wczesnego diagnozowania i prognozowania rozwoju chorób. Dzięki zastosowaniu nowoczesnych i czułych metod analitycznych, możliwe jest oznaczanie w próbkach biologicznych analitów o różnych właściwościach fizykochemicznych, występujących często na bardzo niskich poziomach stężeń. W tym celu w badaniach metabolomicznych chętnie są wykorzystywane tzw. techniki łączone, m.in. chromatografia gazowa, bądź cieczowa sprzężone ze spektrometrią mas, które pozwalają na jakościową i ilościową analizę metabolitów, a dodatkowo przy wsparciu zaawansowanego modelowania bioinformatycznego mogą stanowić potężne narzędzie diagnostyczne.

Tematyka podjęta w rozprawie doktorskiej przez mgr farm. Annę Rajska dotycząca oceny jakościowej i ilościowej zmian w metabolomie pacjentek z zespołem policystycznych jajników (PCOS – ang. *Polycystic ovary syndrome*) jest aktualna i bardzo interesująca, ponieważ dotyczy wyjaśnienia mechanizmów, które wpływają na wystąpienie tego endokrynnego zaburzenia u kobiet. Przeprowadzony zakres prac analitycznych przez Doktorantkę może także stać się alternatywą dla konwencjonalnych analiz biochemicznych.

Ocena formalna i merytoryczna rozprawy

Recenzowana dysertacja mgr farm. Anny Rajskiej stanowi spójny tematycznie zbiór 4 artykułów naukowych, które zostały opatrzone dodatkowym opisem. To przykład rozprawy doktorskiej w nowej formie. Na zaprezentowany opis składają się: część teoretyczna, w której znalazł się wstęp, część eksperymentalna z opisem przeprowadzonych badań w odniesieniu do poszczególnych publikacji. Załączony jest także abstrakt w języku polskim i angielskim. W osobnym rozdziale jest także jasno przedstawiony zasadniczy cel pracy oraz etapy badań. Na końcu została zaprezentowana literatura. Całość stanowi 111 stron z uwzględnieniem załączonych publikacji stanowiących podstawę rozprawy. Cytowana literatura obejmuje łącznie 106 zagranicznych i polskich pozycji naukowych z przewagą tych pierwszych. Oświadczenia współautorów publikacji dołączone do rozprawy potwierdzają niepodważalny wkład Doktorantki w ich powstawanie. Pani mgr farm. Anna Rajska jest pierwszym współautorem w 3 na 4 prace naukowe. Wykaz dorobku naukowego Doktorantki w mojej opinii jest wystarczający. Wskazuje na zaangażowanie w pracę naukową i świadome dobieranie czasopism naukowych, pod kątem prezentowanych wyników badań. Trzy prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały już opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych i były wcześniej poddane analizie przez niezależnych recenzentów i ocenione przez nich pozytywnie. Dlatego wartość merytoryczna publikacji nie podlega dyskusji i dalszej ocenie. Natomiast jedna z publikacji wchodząca w skład rozprawy jest nadal na etapie recenzji, jak napisała Doktorantka w pracy. Nie ma dodatkowych informacji, czy praca została już przyjęta do opublikowania. W załączonym wykazie są artykuły, które ukazały się w takich czasopismach naukowych jak: *International Journal of Molecular Sciences (MDPI)*, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology (Elsevier)*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (Elsevier)*. Sumaryczny współczynnik oddziaływania (*Impact Factor – IF*) dla 3 prac już opublikowanych wynosi 13,137 zgodnie z rokiem ich opublikowania, co daje dość wysoki, średni IF około 4,379.

Wstęp, opis wyników, dyskusja, podsumowanie i wnioski dotyczące otrzymanych rezultatów z powołaniem się na odpowiednie odnośniki literaturowe nie budzą zasadniczo moich wątpliwości. W części teoretycznej Doktorantka w bardzo przystępny sposób omówiła zagadnienia dotyczące etiopatogenezy zespołu policystycznych jajników, kryteriów diagnostycznych, aktualnych strategii terapeutycznych oraz podejść badawczych w badaniach metabolomicznych.

Z dużym zaciekawieniem czytałam informacje zawarte w rozprawie na temat zaburzenia PCOS i strategii terapeutycznych oraz roli jaką mogą odgrywać probiotyki i prebiotyki w leczeniu zespołu policystycznych jajników.

Zasadniczy cel badań został sformułowany czytelnie. Dotyczył oceny jakościowej i ilościowej zmian w metabolomie pacjentek z zespołem policystycznych jajników z zastosowaniem niecelowanej analizy metabolomicznej surowicy krwi i moczu oraz celowanej analizy metabolomicznej hormonów steroidowych w próbkach moczu kobiet z PCOS oraz zdrowych ochotniczek. Chcę podkreślić, że realizacja założonego celu głównego i poszczególnych zadań badawczych, które Doktorantka nazwała etapami badań, ze szczególnym uwzględnieniem etapu przygotowania próbek do analiz końcowych z wykorzystaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas oraz wysokosprawnej chromatografii ciekowej w różnych wariantach wymagały od Doktorantki dużego eksperymentalnego nakładu pracy, co jako analityk bardzo doceniam. Opracowanie materiału doświadczanego przez mgr farm. Annę Rajską wskazuje na dobre opanowanie przez Nią planowania eksperymentów poprzedzających końcowe oznaczenie analitów w materiale biologicznym. W części dysertacji dotyczącej opisu prowadzonych eksperymentów, szczególną uwagę zwrócono na:

- ✓ opracowanie odpowiednich procedur analitycznych, które umożliwią identyfikację i oznaczenia metabolitów w surowicy krwi i moczu z zastosowaniem chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrem mas z analizatorem typu potrójny kwadrupol (GC-QqQ/MS) oraz wysokosprawnego chromatografu ciekowego łączonego ze spektrometrem mas z analizatorem czasu przelotu (HPLC-TOF/MS),
- ✓ zastosowanie technik sprzężonych do oceny zmian w profilach metabolicznych osocza i moczu pacjentek z PCOS,
- ✓ analizę statystyczną wyników uzyskanych na podstawie celowanych i niecelowanych analiz metabolomicznych.

Za szczególnie wartościowe w przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej uważam:

- ✓ opracowanie nowych procedur analitycznych umożliwiających identyfikację i oznaczenie metabolitów związanych z zespołem policystycznych jajników, od momentu pobierania próbki, przez etap przygotowania próbek surowicy i moczu z uwzględnieniem etapów ekstrakcji i przekształcania analitów w bardziej lotne pochodne, w przypadku metod z zakresu chromatografii gazowej,
- ✓ oceny opracowanych metod pod kątem stabilności, powtarzalności i odtwarzalności pomiarów,
- ✓ wykorzystanie technik łączonych z zaawansowanymi podejściami bioinformatycznymi w celu wyjaśnienia patogenezy PCOS.

Istotnym elementem rozprawy doktorskiej jest także potencjalny charakter aplikacyjny opracowanych metod analitycznych do wskazania zmian w profilu metabolitów osocza/moczu u pacjentek z PCOS i zdrowych a także ilościowa analiza hormonów androgenowych w próbkach moczu.

Uwagi

Recenzent oprócz podkreślenia walorów i zalet dysertacji ma także obowiązek wskazania pewnych błędów, uwag i postawienia pytań, co poniżej przedstawiłam. Praca jest przygotowana starannie, tabele, rysunki, schematy i znajdujące się opisy są dość czytelne, choć zdarzają się błędy i niedociągnięcia:

- pod Tabelą 3 nie ma opisu, np. co do strzałek (kierunek zmian) występujących w tabeli,
- w języku polskim nie stosuje się kropek po liczbach w zapisie dziesiętnym, czy setnym tylko przecinki (np. błędny zapis Tabela 3),
- chromatogramy np. na str. 79 powinny zostać starannie opisane,
- doradzam także unikanie stosowania wyrażenia „pobór” (np. str.31) w kontekście próbek, używamy raczej zalecanej przez analityków formy pobieranie. Ta uwaga dotyczy całej pracy.

Przedstawione wyniki badań w rozprawie są bardzo interesujące, choć mam zastrzeżenia co do opisu części eksperymentalnej pracy, części analitycznej, która jest napisana bardzo skrótowo i niestety z pominięciem ważnych informacji analitycznych dotyczących optymalizacji i walidacji metod chromatograficznych (parametrów walidacyjnych). Nie ma także odniesienia się do kwestii analitycznych w podsumowaniu pracy.

Brakuje w opisach także informacji co do np. zastosowanych rozpuszczalników, decyzji ich wyboru, a często w pracy występuje odwołanie do zielonej chemii, więc na jakiej podstawie?

Są pominięte informacje co do zastosowanych narostów temperaturowych podawanych w metodach z użyciem np. chromatografu gazowego.

Wśród innych uwag dyskusyjnych, merytorycznych oraz pytań chcę wymienić:

- Czy prawidłowy jest zapis co do szybkości przepływu gazu nośnego (helu) 10 ml/min (str. 64) ?
- Co jest Pani największym osiągnięciem (nowością) w optymalizacji metod?
- Proszę o odniesienie się (skomentowanie) do wszystkich parametrów walidacji metody zawartych w publikacji 4 (oznaczenia ilościowe hormonów),
- Jaki jest potencjał diagnostyczny hormonów, o którym Pani pisze?
- Co rozumie Pani przez „procesowanie danych analitycznych” (str.24)?

- Mam także wątpliwości co do kolejności zakresu działań w etapach badań wskazanych przez Panią w podpunkcie 4 , czy faktycznie taka była kolejność ?

Podsumowanie recenzji

Stwierdzam, że mgr farm. Anna Rajska wykazała się wiedzą w aktualnej i ważnej tematyce będącej przedmiotem rozprawy doktorskiej. Wskazane w recenzji błędy i uwagi nie umniejszają wartości dysertacji.

Praca spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (aktualne odniesienie do aktu prawnego - tekst jednolity: DzU z 2022 r. poz. 574 z późn. zm.).

Wniosek końcowy

Podsumowując, recenzowana rozprawa zatytułowana „*Ocena patogenezy hiperandrogenizmu oraz zaburzeń metabolicznych wśród kobiet z zespołem policystycznych jajników przy użyciu analizy metabolomicznej*” spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim, zatem wnoszę o dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Joanna Kałużna-Czaplińska

Łódź, 31 października 2023 roku