

Bydgoszcz dn. 24.10.2023

Ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Rajskej

Ocenę przygotowano w związku z pismem nr WFD-500-D-417/2023 Przewodniczącego Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z dnia 22.09.2023 roku zgodnie z uchwałą Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego nr 60/2023 z dnia 19.09.2023.

Informacje ogólne

Podstawą ubiegania się Pani mgr Anny Rajskej o stopień naukowy doktora jest rozprawa na temat: „*Ocena patogenezy hiperandrogenizmu oraz zaburzeń metabolicznych wśród kobiet z zespołem policystycznych jajników przy użyciu analizy metabolomicznej*”. Promotorami pracy są Pan prof. dr hab. n. farm. Michał Markuszewski oraz prof. dr. hab. n. med. Dominik Rachoń. Opiekunem naukowym pracy była dr hab. inż. Magdalena Buszewska-Forajta. Dysertacja powstała na podstawie cyklu czterech prac, z czego trzy zostały już opublikowane, czwarta została wysłana do recenzji.

Rozprawa ma standardową formę, w której oprócz samych publikacji Autorka zawarła opis pracy jako spójnego cyklu z wstępem teoretycznym, wprowadzającym czytelnika w temat pracy od strony klinicznej i analitycznej tj. aspekt celowanej i niecelowanej analizy metabolomicznej, celem pracy, metodologię badań, podsumowaniami i wnioskami. Dysertacja zawiera także: spis treści, streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, wykaz prac stanowiących podstawę rozprawy, bibliografię, oświadczenia współautorów prac.

Ocena rozprawy doktorskiej

Temat badawczy podjęty przez Panią mgr Annę Rajska jest niezmiernie istotny z punktu widzenia klinicznego, gdyż zespół policystycznych jajników (PCOS) dotyka aż do 20% kobiet

i jest jedną z głównych przyczyn niepłodności, co powoduje, że problem jest nie tylko osobistym dramatem, ale z punktu widzenia demograficznego, ma także ogromne znaczenie społeczne. Mimo, że od wielu lat PCOS jest przedmiotem aktywnych badań mających na celu znalezienie jego przyczyny i sposobu walki z problemem, wyniki są co najmniej niezadowolające. Dlatego podejmowanie prób wykorzystania nowych strategii pozwalających na lepsze scharakteryzowanie zmian zachodzących na różnych poziomach w organizmie osób cierpiących na PCOS wydaje się jedyną drogą do wyjścia z pewnego impasu. Zastosowana przez Doktorantkę metabolomika jest obecnie jedną z najbardziej pożądaných metod odkrywania mechanizmów patofizjologicznych, gdyż detaliczna wiedza o zmianach zachodzących na poziomie związków drobnocząsteczkowych pozwala na uzupełnienie danych uzyskanych z badań genomu, transkryptomu i proteomu prowadząc do maksymalnie holistycznego spojrzenia na dane zagadnienie. Jednakże posługiwanie się analizą metabolomiczną wymaga bardzo dobrego przygotowania, zarówno merytorycznego, jak i praktycznego, gdyż na każdym kroku czyhają pułapki mogące doprowadzić do wyciągnięcia absolutnie błędnych wniosków, nawet z pozornie idealnego eksperymentu.

Niezmiernie wartościowym jest zatem dla mnie jako recenzenta rozprawa, której częścią jest rzetelnie przygotowana praca przeglądowa. Zapoznanie się z bieżącą literaturą z danego tematu i jej krytyczna ocena umożliwiają bowiem doskonałą bazę zarówno do odpowiedniego zaplanowania badań w projekcie w taki sposób, aby uzupełniały one dotychczasową wiedzę, odpowiadały na pytania ciągle pozostające bez odpowiedzi, i wdrażały nowe rozwiązania pozwalające przyjrzeć się problemowi z innej perspektywy, jak również dla odpowiedniego przeprowadzenia dyskusji własnych wyników. W rozprawie przedstawionej do recenzji, pierwsza z prac jest właśnie pracą przeglądową podsumowującą zastosowanie analizy metabolomicznej w poznaniu patomechanizmu oraz poszukiwaniu ewentualnych biomarkerów PCOS. Publikacja ukazała się w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* o IF 5.924 i MEiN 140. Artykuł stanowi bardzo szczegółowe zestawienie metodologii, wykorzystanych w badaniach rodzajów próbek biologicznych oraz samych zmian w szlakach biochemicznych. Jest tym samym pracą, w której badacze zajmujący się PCOS mogą znaleźć zarówno informacje od strony czysto analitycznej, jak i interpretację wyników. O dużej wartości pracy, poza wspomnianymi wskaźnikami, świadczy wysoka ilość cytacji sięgająca na dzień pisania recenzji aż 51 (rok publikacji – 2020).

Jak wynika z całości rozprawy, spostrzeżenie wynikające z przygotowania powyższego *review* dotyczące braku dotychczasowych badań na więcej niż jednej matrycy biologicznej w danej badanej grupie pacjentów oraz braku analiz prowadzonych równoległe na kilku

platformach analitycznych zostało wykorzystane przez Doktorantkę w kolejnych pracach eksperymentalnych. Prace przedstawiają logiczny, przemyślany ciąg, pozwalając uzyskać spójny i szeroki obraz zmian biochemicznych towarzyszących zespołowi policystycznych jajników. W każdej z prac grupy badane i kontrolne dobrane są wg dobrze określonych kryteriów, metodologia opisana jest w sposób pozwalający na odtworzenie całości procedury, a zachowana sztuka kontroli jakości i raportowania wyników umożliwiają ocenę poprawności eksperymentalnej na wszystkich etapach. Opracowanie danych i analiza statystyczna odpowiadają przyjętym standardom, co w całości daje gwarancję, że otrzymane wyniki dają podstawę do przeprowadzenia interpretacji natury biochemicznej.

Pierwsza z nich, w której Pani Magister jest trzecim autorem, została opublikowana w roku 2019 w czasopiśmie *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* (IF 3.813, MEiN 100). Podobnie jak wcześniej omówiona praca przeglądowa, ten artykuł również wyróżnia się znaczącą ilością cytacji (21), co na pracę oryginalną jest dużym osiągnięciem. W niniejszej pracy autorzy zastosowali analizę metabolomu nietotnego i lotnego próbek krwi, stosując odpowiednio dwie platformy instrumentalne: chromatograf ciekłowy sprzężony ze spektrometrem mas wyposażonym w analizator czasu przelotu (TOF) oraz chromatograf gazowy połączony ze spektrometrem mas typu potrójny kwadrupol. Analiza związków lotnych wymagała wprowadzenia do protokołu etapu derywatywacji, który pozwolił na efektywne zwiększenie lotności oraz termostabilności związków. Przeprowadzone analizy umożliwiły wskazanie kilkunastu związków istotnie różnicujących badane grupy. Wśród nich znajdowały się głównie aminokwasy i lipidy. Identyfikacja związków pochodzących z analiz LC-MS oparta była o masę monoizotopową, rozkład izotopowy, czas retencji, wzór sumaryczny i kilka baz danych, natomiast z analiz GC-MS o bibliotekę widm NIST11. Zdecydowana większość obserwowanych zmian biochemicznych została wytłumaczona w oparciu o dane literaturowe. Autorzy w rzetelny sposób odnieśli się do ograniczeń swoich badań, z których relatywnie mała grupa badana (30 PCOS i 30 kontrola) stanowi największy minus biorąc pod uwagę wieloczynnikowe podłoże choroby. Niemniej, uzyskane wyniki dały bardzo solidne podstawy do kontynuacji obranego kierunku badań.

W kolejnej pracy Doktorantka powtórzyła analizy na obu platformach na nowym zestawie próbek walidując tym samym wcześniejsze wyniki i dodatkowo wskazała na inne związki wykazujące znamienność statystyczną w różnicowaniu badanych grup. Pracę opublikowano w czasopiśmie *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (IF 3.4, MEiN 100). Do analiz włączono spektrometr mas typu TOF posiadający możliwość fragmentacji, co znacząco wpływa na poziom wiarygodności identyfikacji

analizowanych związków. Ponadto, rozszerzono analizę na drugą matrycę, mocz, co pozwoliło na uzupełnienie informacji o metabolity istotne w charakterystyce PCOS występujące w próbkach pobieranych w sposób bezinwazyjny. Zwiększony panel związków umożliwił także zwiększenie wiarygodności w identyfikacji szlaków metabolicznych związanych z przebiegiem PCOS. Ilość uczestników badania była zbliżona do poprzedniego badania (35/35). W związku z tym mam pytanie dotyczące możliwości powiększenia grup – jaka jest rzeczywista szansa na zebranie grupy znacząco większej (>100?) oraz jak duża, biorąc pod uwagę heterogenność pacjentek z PCOS, powinna być taka grupa? Czy byłoby zasadne i możliwe zaprojektowanie badań uwzględniających różne fenotypy tak, aby stanowiły one osobne grupy odniesienia w badaniach metabolomicznych?

Ostatni etap badań opisanych w dysertacji Pani mgr Anny Rajskiej przedstawia opracowanie metody oznaczania wybranych hormonów steroidowych w moczu jako przedstawicieli grupy związków wykazujących największą zmienną w analizach opisanych w poprzedniej pracy, jak również w literaturze z zakresu PCOS. Doktorantka bardzo dobrze uzasadniła wybór moczu jako matrycy alternatywnej do krwi oraz konieczność wprowadzenia metod o większej swoistości i czułości niż rutynowo stosowane testy immunoenzymatyczne. Powyższe warunki spełnia analiza z użyciem platformy LC-MS, w szczególności z typem analizatora potrójny kwadrupol. Właśnie takiego wyboru dokonała Pani mgr Rajska, jednocześnie wyłamując się ze schematycznego stosowania tradycyjnych metod preparatyki próbki i opracowując protokół oparty o mikroekstrakcję do fazy stałej w formie cienkiego filmu. Oprócz prostoty oznaczeń istotnym elementem cechującym metody mikroekstrakcyjne jest bardziej „zielone” podejście do chemii analitycznej, co jest bardzo ważne z punktu widzenia obecnych kłopotów z zanieczyszczeniem środowiska i konieczności praktycznego wprowadzania rozwiązań alternatywnych adresujących niedoskonałości czy wady rutynowo wykorzystywanych testów. Z uwagi na moje doświadczenie w pracy z TF-SPME chciałam zapytać co stało za wyborem pokrycia PS-DVB, ponieważ wszystkie z analizowanych tutaj związków doskonale ekstrahuje sorbent C18, który jest dużo praktyczniejszy w użyciu i ogólnie dostępny? Jakkolwiek autorzy otrzymali bardzo dobre wyniki, a metoda przeszła pozytywnie walidację pozwolę sobie polecić pracę Boyaci E. i wsp. „Introduction of solid-phase microextraction as a high-throughput sample preparation tool in laboratory analysis of prohibited substances” (*Analytica Chimica Acta* 809 (2014) 69– 81), w której znajduje się mnóstwo praktycznych spostrzeżeń analitycznych o różnych grupach związków zakazanych w sporcie, w tym hormonów steroidowych. Krótka sekcja jest także poświęcona porównaniu wyników analiz wybranych związków w formie wolnej i

skoniugowanych pochodnych glukuronidowych. Jakkolwiek ta część nie była walidowana, jednak w aspekcie prezentowanej przez Panią mgr Rajską pracy może to stanowić dobry punkt wyjścia do optymalizacji kolejnej metody analiz moczu z użyciem TF-SPME bez konieczności przeprowadzania hydrolizy enzymatycznej.

Podsumowanie

Dysertacja Pani mgr Anny Rajskiej została przygotowana w sposób niezmiernie skrupulatny, jest bardzo przejrzysta, polskie opracowania poszczególnych publikacji są krótkie, treściwe i w pełni oddają merytorykę zawartą w oryginalnych pozycjach. Wysokie wskaźniki cytacji potwierdzają, zarówno istotność i aktualność podjętej tematyki badań, jak również wysoki poziom prac.

Rozprawa doktorska Pani mgr Anny Rajskiej stanowi spójny cykl prac opatrzony skondensowanymi opisami w języku polskim i odpowiednimi sekcjami uzupełniającymi całość dzieła. Nie dopatrzyłam się żadnych błędów merytorycznych, ortograficznych, stylistycznych czy edytorskich. Jedynie w przypadku skrótów część wyrazów w nazwach pisana jest wielką, a część małą literą, co w mojej ocenie jest błędem. Poszczególne prace dobrze ukazują rozwój Doktorantki, od przygotowania teoretycznego, poprzez współudział w projekcie, a następnie, w przypadku dwóch ostatnich prac, Jej rolę jako głównego wykonawcy.

Mimo, że rolą recenzenta jest ocena osiągnięć przedstawionych w pracy, przyznaję, że chętnie widziałabym informację nt. dorobku Doktorantki jako dodatkowy rozdział w dysertacji. Z *Curriculum Vitae* Pani mgr Anny Rajskiej możemy wszakże wyczytać, że jest ona doświadczona w pracy badawczej, zarówno jako stypendystka i wykonawca projektów grantowych oraz kierownik granu Preludium. Należy podkreślić, że niniejsza praca doktorska została finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach wspomnianego grantu Preludium oraz środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój.

Podsumowując, na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej stwierdzam, że przyczynia się ona do rozwoju dyscypliny nauk farmaceutycznych oraz spełnia wszystkie wymogi merytoryczne i formalne stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023 poz. 742). Równocześnie, zwracam się do Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o nadanie Pani mgr Annie Rajskiej stopnia doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauk farmaceutycznych.

Biorąc pod uwagę wysoki poziom rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Rajskiej oraz spełnienie wymogów formalnych dotyczących zgłaszania wniosków o wyróżnienie recenzowanych prac (sumaryczny IF > 4.0 – tu 13.137 oraz minimum jedna praca oryginalna pierwszego autorstwa z minimum Q2) wnoszę do Wysokiej Rady o wyróżnienie opiniowanej pracy.



dr hab. Barbara Bojko, prof. UMK