

prof. dr hab. Renata Gadzała-Kopciuch  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu  
Wydział Chemii  
Katedra Chemii Środowiska i Bioanalityki  
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń

### **Recenzja rozprawy doktorskiej**

Pani mgr farm. Małgorzaty Artymowicz

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

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr farm. Małgorzaty Artymowicz została zrealizowana w Zakładzie Farmakodynamiki Katedry Biofarmacji i Farmakodynamiki Wydziału Farmaceutycznego Medycznego Uniwersytetu Gdańskiego głównie w ramach projektu PRELUDIUM 15 pt. *Zastosowanie podejścia celowanej analizy metabolomicznej w prospektywnej ocenie ilościowych zmian profili nukleozydów przed i po resekcji guza pęcherza moczowego* (2018/29/N/NZ7/02299) finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki (NCN). Promotorem rozprawy doktorskiej jest Pani dr hab. Danuta Siluk, prof. uczelni, a promotorem pomocniczym dr n. farm. Wiktoria Struck-Lewicka.

#### *Ocena wyboru tematyki badawczej*

Choroby nowotworowe, takie jak np. rak prostaty, stanowią istotny problem epidemiologiczny, a wczesne ich rozpoznanie ma kluczowe znaczenie dla skutecznego leczenia i poprawy rokowań pacjentów. Diagnostyka medyczna odgrywa zasadniczą rolę w tym procesie, wykorzystując różnorodne metody badawcze, aby umożliwić precyzyjną ocenę stanu zdrowia osoby chorej. Poszukiwanie biomarkerów chorób nowotworowych stanowi kluczowy obszar badań naukowych w zakresie medycyny, które ma na celu poprawę wczesnej diagnostyki, prognozowania oraz personalizacji terapii. Do takich biomarkerów raka prostaty można zaliczyć modyfikowane nukleozydy i deoksynukleozydy, które są metabolitami zachodzących przemian w obrębie kwasu rybonukleinowego (RNA) i kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA). Przez wiele dziesięcioleci związki te były przedmiotem intensywnych badań ze względu na ich potencjalne zastosowanie w kontekście chorób, takich jak rak czy stres oksydacyjny. Badania te były możliwe dzięki postępom w zakresie czułości i specyficzności przyrządów pomiarowych, które umożliwiają identyfikację tych związków na niskim poziomie stężeń. To szczególnie istotne w przypadku biomarkerów chorób nowotworowych czy innych istotnych związków, których ilości mogą być bardzo małe we wczesnych stadiach choroby. W związku z powyższym, postęp w dziedzinie technik analitycznych nie tylko podnosi jakość badań naukowych, ale również ma bezpośrednie zastosowanie w diagnostyce klinicznej, przyczyniając się do bardziej niezawodnych i skutecznych pomiarów, co z kolei przekłada się na szybsze podjęcie właściwej terapii. Doktorantka bardzo świadomie wybrała tematykę

badawczą ukierunkowaną na poszukiwanie nowych rozwiązań w zakresie opracowania procedur analitycznych umożliwiających zarówno przygotowanie próbek moczu (bez i z wykorzystaniem ekstrakcji do fazy stałej) do jakościowego i ilościowego oznaczenia wyizolowanych związków za pomocą chromatografii cieczowej w połączeniu ze spektrometrią mas. Tematyka dysertacji jest więc jak najbardziej uzasadniona, aktualna i interesująca, ale także istotna z praktycznego punktu widzenia uwzględniając potencjalną możliwość wdrożenia wyników badań do diagnostyki medycznej.

### *Ocena formalna i merytoryczna rozprawy doktorskiej*

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi zbiór trzech prac (rozdział w monografii i dwa opublikowane artykuły), które powiązane są tematycznie ze sobą oraz z tytułem rozprawy i napisane zostały w języku angielskim. We wszystkich tych publikacjach Pani mgr farm. Małgorzata Artymowicz jest pierwszym autorem. Wszystkie zamieszczone prace ukazały się w czasopismach naukowych, które są indeksowane w bazie *Journal Citation Reports* (JCR) i równocześnie są wymienione w wykazie punktowanych czasopism MEiN oznaczone jako:

- D1.** *Advances in Clinical Chemistry* (2018), *Urinary nucleosides and deoxynucleosides*, **Patejko, M.**, Struck-Lewicka, W., Siluk, D., Waszczuk-Jankowska, M., Markuszewski, M.J.,
- D2.** *Sustainable Chemistry and Pharmacy* (2021), *Development and optimization of modified nucleosides and deoxynucleosides simultaneous extraction with the use of Design of Experiments approach*, **Artymowicz, M.**, Macioszek, S., Jacyna, J., Dawidowska, J., Struck-Lewicka, W., Markuszewski, M.J., Siluk, D.,
- D3.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2023), *Targeted quantitative metabolomics with a linear mixed-effect model for analysis of urinary nucleosides and deoxynucleosides from bladder cancer patients before and after tumor resection*, **Artymowicz, M.**, Struck-Lewicka, W., Wiczling, P., Markuszewski, M., Markuszewski, M.J., Siluk, D.

Sumaryczny współczynnik oddziaływania (*Impact Factor* – IF) tych prac wynosi 13,206 zgodnie z rokiem ich opublikowania, co daje wysoki, średni IF około 4,4 dla każdej z prac. Zamieszczone w dysertacji oświadczenia współautorów wskazują, że udział Doktorantki w realizacji wszystkich prac był wiodący (o czym świadczy również pierwsza pozycja na liście autorów).

Recenzowana rozprawa zawarta została na 206 stronach maszynopisu. Otwiera ją 30 stronicowy komentarz poprzedzony streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz wykaz skrótów, po którym zamieszczony został cel, kopia opublikowanych manuskryptów (rozdział w monografii i dwie publikacje), bibliografia w postaci 125 cytowanych odnośników literaturowych, zgody Komisji Bioetycznej, oświadczenia współautorów oraz lista osiągnięć Doktorantki (publikacje, konferencje naukowe, nagrody i wyróżnienia, kursy szkolenia i szkolenia oraz pozostałe aktywności).

Celem badawczym jaki postawiła sobie Pani mgr farm. Małgorzata Artymowicz była ocena jedenastu modyfikowanych nukleozydów i deoksynukleozydów w materiale

biologicznym (moczu) pobieranym od pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem pęcherza moczowego przed i po zabiegu operacyjnym. Cel został sformułowany poprawnie. Doktorantka bardzo szczegółowo przedstawiła cele cząstkowe, które stały się podstawą do realizacji zadań badawczych.

Cykl artykułów będących przedmiotem rozprawy poprzedzony jest czterema krótkimi rozdziałami stanowiącymi *Część teoretyczną*. W pierwszym - Doktorantka opisała epidemiologię raka prostaty, przeprowadziła charakterystykę histopatologiczną oraz przedstawiła najczęściej występujące objawy w przypadku raka pęcherza moczowego, podstawy diagnostyki i możliwości leczenia tego typu nowotworów. Zgłębienie wiedzy w tym zakresie było niezbędne w celu zaplanowania dalszych badań po resekcji. W kolejnym rozdziale omówione zostały podstawy metabolomiki z opisaniem strategii celowanej i niecelowanej, po czym Doktorantka opisała oznaczanie modyfikowanych nukleozydów i deoksynukleozydów (rozdział 3.1) oraz osiągnięcia innych badaczy w zakresie epitranskryptomiki (rozdział 3.2). Komentarz wprowadzający, Pani mgr farm. Małgorzata Artymowicz, zakończyła omówieniem badań metabolomicznych w nowotworze pęcherza moczowego, po czym przedstawiła cel rozprawy doktorskiej, a następnie zmieściła krótkie opisy do załączonych prac.

Pierwsza praca wchodząca w skład rozprawy doktorskiej oznaczona jako **D1** (*Urinary nucleosides and deoxynucleosides*, 2018), to 51 stronicowy rozdział w monografii, który stanowi bardzo dobrze przygotowany przegląd literaturowy z zakresu nukleozydów i deoksynukleozydów występujących w moczu głównie jako metabolity RNA i oksydacyjnych uszkodzeń DNA (potencjalne biomarkery w chorobach nowotworowych). Doktorantka dokonując szczegółowego przeglądu literatury wykazała, że metabolity te były badane pod kątem ich potencjalnego występowania w stanach chorobowych, w tym raka i stresu oksydacyjnego. Za bardzo wartościowy należy uznać wnikliwy przegląd dotyczący osiągnięć innych badaczy odnośnie metod przygotowania próbek w celu wyizolowania wybranych związków oraz końcowego ich oznaczania. Interesujący jest także ostatni rozdział tego manuskryptu, gdzie Doktorantka opisuje wykorzystanie modyfikowanych nukleozydów i deoksynukleozydów w medycynie jako leków przeciwwirusowych i przeciwnowotworowych. Ten bardzo dobrze przygotowany przegląd literatury z zakresu tematyki rozprawy doktorskiej stanowi solidną podstawę do stworzenia autorskiej koncepcji opracowanej w ramach realizowanych prac badawczych.

Praca oznaczana przez Doktorantkę jako **D2** to publikacja związana jest z wykorzystaniem metody projektowania eksperymentów (*Design of Experiments*) w kierunku optymalizacji ekstrakcji modyfikowanych nukleozydów i deoksynukleozydów z moczu, jak i technice końcowego oznaczania tych związków. Celem niniejszego artykułu było opracowanie procedury przygotowania próbek pozwalającej na jednoczesną ekstrakcję 12 zmodyfikowanych nukleozydów i deoksynukleozydów z wykorzystaniem ekstrakcji do fazy stałej (SPE). Wykorzystano komercyjnie dostępne sorbenty – żywicę modyfikowaną kwasem fenyloboronowym i polimer kationowymienny. W celu zmniejszenia liczby eksperymentów, a co za tym idzie objętości stosowanych

rozpuszczalników, opracowana procedura została zoptymalizowana z wykorzystaniem podejścia *Design of Experiments*. Optymalizację SPE przeprowadzono stosując *Fractional Factorial Design* z wybranymi zmiennymi wejściowymi, takimi jak skład rozpuszczalników do kondycjonowania, przemywania i elucji oraz czas prowadzenia ekstrakcji. Opracowana i zoptymalizowana procedura SPE umożliwiła Doktorantce jednoczesną ekstrakcję wybranych, zmodyfikowanych nukleozydów i deoksynukleozydów z moczu oraz ich oznaczenie z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas z potrójnym kwadrupolem (HPLC-QqQ/MS).

Ostatnia z publikacji oznaczona jako **D3** to rezultaty badań, jakie Pani mgr farm. Małgorzata Artymowicz uzyskała bez stosowania SPE, skupiając się na doborze odpowiedniego roztworu do rozcieńczania próbek i strącania substancji współwystępujących w próbkach moczu. Doktorantka uznała, że takie podejście pozwala na skrócenie czasu podczas przygotowania próbek w porównaniu z ekstrakcją do fazy stałej przy zachowaniu identycznej efektywności procesu ekstrakcji. Opracowaną procedurę (wraz z oznaczeniem badanych związków) podano pełnej walidacji zgodnie z wymogami FDA i EMA. Doktorantka przeprowadziła również analizę statystyczną z wykorzystaniem hierarchicznych modeli liniowych i wykazała, że po resekcji podwyższony poziom inozyny i obniżony poziom 2-metylotioadenozyny jest wynikiem zaburzonego metabolizmu puryn w stanie nowotworowym. Niewątpliwie, opracowana procedura posiada charakter aplikacyjny - może stanowić szybką metodę do ilościowego oznaczania nukleozydów i deoksynukleozydów w moczu pacjentów z guzem pęcherza moczowego.

Podsumowując tę część mojej oceny, stwierdzam, że Doktorantka w pełni zrealizowała cel pracy, dobrała właściwe metody badacze, w przemyślny sposób zinterpretowała uzyskane wyniki, a także poprawnie sformułowała wnioski.

#### *Uwagi szczegółowe i podsumowanie*

Przy lekturze rozprawy doktorskiej Pani mgr farm. Małgorzaty Artymowicz nasuwają się też pewne uwagi i pytania, które wymagają wyjaśnienia:

- Str. 38 – w celu cząstkowym 2 Doktorantka użyła terminu „izolacja” – proszę o wyjaśnienie,
- Ryc. 1 w komentarzu oraz abstrakt graficzny w artykule oznaczonym jako **D3** - pozwolę się nie zgodzić z Doktorantką, gdyż schemat zamieszczony na tej rycinie ma zamienione etapy - walidacja procedury następuje po dokonaniu pomiarów, a nie przed ich wykonaniem. Z definicji walidacji wynika, że proces walidacji obejmuje ocenę dokładności, precyzji, czułości, specyficzności i tym podobnych parametrów, uzyskanych w wyniku przeprowadzonych pomiarów w celu skutecznej oceny, czy metoda spełnia ustalone kryteria jakościowe,
- Co było podstawą dokonania wyboru sorbentów PBA i PCX w ekstrakcji do fazy stałej? Czy podejmowano próby zastosowania innych sorbentów?
- Czy sprawdzano utratę analitów podczas odparowywania rozpuszczalników po elucji z wykorzystaniem ekstrakcji do fazy stałej?

Oceniając rozprawę doktorską Pani mgr farm. Małgorzaty Artymowicz stwierdzam, że tematyka rozprawy doktorskiej jest bardzo ważna zarówno pod względem poznawczym, jak i praktycznym. Dysertacja napisana jest w przejrzysty i czytelny sposób. Zawiera niezbędne wiadomości wprowadzające (komentarz do artykułów wchodzących w skład rozprawy) oraz opisane szczegółowo w pracy przeglądowej (rozdział w *Advances in Clinical Chemistry*), które potwierdzają wiedzę teoretyczną i dobre przygotowanie Doktorantki do realizacji podjętej w rozprawie tematyki badawczej. Opracowane procedury analityczne spełniają wszelkie kryteria akceptacji, obejmujące zakres pomiarowy, liniowość, granicę wykrywalności, oznaczalność, dokładność, precyzję, odzysk, efekt matrycowy oraz odporność. Krytyczne podejście Pani mgr farm. Małgorzaty Artymowicz do uzyskanych wyników świadczy o jej naukowej dojrzałości i doskonałej znajomości zagadnień poruszanych w rozprawie. Sposób zaplanowania i przeprowadzenia badań, forma przedstawienia wyników i wszechstronna ich analiza, są niezbitym dowodem bardzo dobrego poziomu przygotowania Doktorantki do prowadzenia badań naukowych.

### *Wniosek końcowy*

Uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr farm. Małgorzaty Artymowicz została przygotowana z niezwykłą starannością pod względem zarówno merytorycznym, jak i edytorskim. Zawiera kompletną dokumentację przeprowadzonych badań i rzetelną dyskusję uzyskanych wyników, a także poprawnie sformułowane wnioski. Warto podkreślić, że wyniki będące podstawą rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w dwóch artykułach naukowych w renomowanych czasopismach i jednym rozdziale w monografii o międzynarodowym zasięgu.

Wyrażam przekonanie, że recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr farm. Małgorzaty Artymowicz pt. *Zastosowanie podejścia celowanej analizy metabolomicznej w prospektywnej ocenie ilościowych zmian profili nukleozydów przed i po resekcji guza pęcherza moczowego* spełnia w pełni wymogi stawiane pracom doktorskim w oparciu o art. 179 ust. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1669), zgodnie z wymogami określonymi w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U. Nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami) i wnoszę do Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego, w tym do publicznej obrony przedłożonej dysertacji doktorskiej.

*Renata Gadońska-Kopciuch*  
Toruń, dnia 19 listopada 2023 r.

prof. dr hab. Renata Gadzała-Kopciuch  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu  
Wydział Chemii  
Katedra Chemii Środowiska i Bioanalityki  
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń

## WNIOSEK O WYRÓŻNIENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Niniejszym zwracam się do Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr farm. Małgorzaty Artymowicz zatytułowanej *Zastosowanie podejścia celowanej analizy metabolomicznej w prospektywnej ocenie ilościowych zmian profili nukleozydów przed i po resekcji guza pęcherza moczowego.*

### Uzasadnienie:

Przedstawiona do recenzji praca doktorska zawiera elementy nowości naukowej oraz jest bardzo dobrze zaplanowanym oryginalnym zagadnieniem naukowym. Jest potwierdzeniem wszechstronnej wiedzy Doktorantki w reprezentowanej dyscyplinie naukowej, umiejętności realizowania zadań badawczych oraz poprawnej interpretacji uzyskanych wyników. Należy docenić ogromną wartość aplikacyjną uzyskanych wyników w ramach tej pracy. Dodatkowo, Pani mgr farm. Małgorzata Artymowicz posiada wysoki dorobek naukowy (łącznie 13 artykułów w renomowanych czasopismach z bazy JCR oraz trzy rozdziały w monografiach – dwa w angielskich monografiach, jeden w monografii polskojęzycznej). Biorąc pod uwagę wyżej wymienione czynniki pozytywnie wyróżniające rozprawę doktorską oraz kompetencje i aktywność Doktorantki składam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

*Renata Gadzała-Kopciuch*  
Toruń, dnia 19 listopada 2023 r.