



**dr hab. Michał Ciborowski**  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
Centrum Badań Klinicznych  
Laboratorium Metabolomiki

## **RECENZJA**

rozprawy doktorskiej mgr Marty Ewy Kordalewskiej pt.:

*„Ocena zmian metabolicznych u chorych z rakiem nerki z wykorzystaniem komplementarnych technik analitycznych i niecelowanej analizy metabolomicznej”*

wykonanej w Zakładzie Biofarmacji i Farmakokinetyki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem Prof. dr hab. Michała Jana Markuszewskiego oraz Dr Renaty Wawrzyniak, będącej promotorem pomocniczym.

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska dotyczy wykorzystania metabolomiki do poszerzenia wiedzy o procesach biochemicznych, związanych z występowaniem raka nerkowokomórkowego oraz jego najczęściej występującego podtypu, jasnokomórkowego raka nerki. Pomimo, iż rak nerki stanowi tylko ok. 3-4% nowych rozpoznań wśród guzów litych w Polsce, jest przyczyną wielu zgonów związanych z występowaniem choroby nowotworowej. W Polsce śmiertelność powiązana z rakiem nerki, w porównaniu do innych chorób nowotworowych, plasuje tą chorobę na 7 miejscu w przypadku mężczyzn, a na 12 w przypadku kobiet. Ponadto, odnotowywane w naszym kraju średnie wartości współczynników zachorowalności i umieralności na raka nerek przewyższają dwukrotnie te wyliczane z danych światowych. Pokazuje to, iż podjęty problem badawczy ma nie tylko ogromne znaczenie poznawcze, ale również praktyczne. Wskazanie zaburzonych szlaków metabolicznych nie tylko pozwala na lepsze zrozumienie zmian w procesach biochemicznych wywołanych występowaniem danej choroby, ale może również przyczynić się do wytypowania nowych markerów diagnostycznych czy też opracowania nowych terapii. Myśląc o potencjalnym wykorzystaniu uzyskanych wyników badań do opracowania nowych metod diagnostycznych, Doktorantka trafnie wybrała materiał do badań. Mocz jest materiałem biologicznym, który w przypadku chorób nerek ma bezpośredni kontakt z miejscem występowania stanu patologicznego, a ponadto można go pozyskać w sposób nieinwazyjny i zwykle dostępny jest

w dużych ilościach. Należy również docenić wybrany przez Doktorankę warsztat badawczy. Żadna z technik analitycznych stosowanych w badaniach metabolomicznych nie umożliwia pomiaru wszystkich znanych metabolitów. W związku z tym, zgodnie z najnowszymi trendami światowymi, aby zwiększyć liczbę mierzonych metabolitów należących do różnych klas, materiał badawczy analizuje się z wykorzystaniem komplementarnych metod. Właśnie taka strategia badawcza została zastosowana przez Doktorankę.

Oceniana rozprawa obejmuje 128 stron maszynopisu i ma typowy układ. Po spisie treści Doktorantka zamieściła wykaz stosowanych skrótów, część teoretyczną i cel pracy. Po celu pracy umieszczona jest część eksperymentalna, w której znajdują się m.in. wykaz zastosowanej aparatury, materiałów i odczynników oraz opis pobierania materiału do badań wraz z charakterystyką pacjentów. Ponadto, w części tej opisane są metody przygotowania próbek moczu do badań, wykorzystane metody analityczne, procedury użyte do wstępnego opracowania danych pomiarowych, zastosowane metody statystyczne oraz strategia identyfikacji metabolitów. Na zakończenie części eksperymentalnej przedstawione są uzyskane wyniki badań. Dalsze części rozprawy to dyskusja uzyskanych wyników, wnioski, wykaz rycin i tabel, bibliografia oraz streszczenia w języku polskim i angielskim.

We wstępie teoretycznym Doktorantka przedstawia dane epidemiologiczne dot. występowania raka nerki i śmiertelności związanej z tą chorobą. Dane te zaprezentowane są z podziałem na kontynenty oraz z uwzględnieniem różnic w występowaniu choroby i związanej z nią śmiertelności w zależności od płci. Oprócz danych globalnych przedstawiona jest również epidemiologia raka nerki w Polsce. W dalszej części wstępu opisana jest najnowsza klasyfikacja kliniczna guzów nerki z podziałem na podtypy raka nerki oraz stopnie zaawansowania choroby. Następnie Doktorantka opisuje czynniki ryzyka wystąpienia raka nerki, mutacje genetyczne zwiększające ryzyko zachorowania, objawy choroby, a także stosowane obecnie metody diagnostyczne oraz strategie terapeutyczne. Kolejna część wstępu poświęcona jest metabolomice. Doktorantka przedstawia różne podejścia do badań metabolomicznych, takie jak badania niecelowane, profilowanie metabolitów czy też celowaną analizę metabolomiczną. O dojrzałości naukowej Doktorantki świadczą kolejne paragrafy tej części wstępu, które poświęcone są planowaniu badań naukowych, w ramach których mają być przeprowadzone badania metabolomiczne. Z części tej dowiadujemy się na co zwrócić uwagę dobierając grupy badane oraz wybierając rodzaj materiału do badań. Doktorantka zaznacza, iż pobieranie

materiału do całego projektu powinno odbywać się według opracowanych wcześniej procedur, tak aby zminimalizować ewentualną zmienność mogącą pojawić się na tym etapie. Następnie krótko przedstawione są poszczególne etapy protokołu analitycznego, tj. przygotowanie próbek badanych i próbek do kontroli jakości badań, wstępna analiza danych, metody analiz statystycznych oraz strategie identyfikacji metabolitów w zależności od wykorzystanej techniki badawczej. Wymienione są również narzędzia do analizy szlaków metabolicznych, które mogą być pomocne przy interpretacji uzyskanych wyników badań. W części teoretycznej opisane są również techniki analityczne wykorzystywane do niecelowanej analizy metabolomicznej. Opisane są ich wady i zalety, a całość podsumowana jest na Rysunku 4. W ostatniej części wstępu przedstawione są dotychczasowe wyniki badań nad rakiem nerki, uzyskane z wykorzystaniem metabolomiki. Zapewne omyłkowo, ten podpunkt wstępu nie został zawarty w spisie treści. Scharakteryzowanych jest tu ponad 30 publikacji naukowych, w których badania przeprowadzono nie tylko na materiale pobranym od pacjentów, ale także na liniach komórkowych czy też modelach zwierzęcych. W badaniach tych wykorzystano różne techniki analityczne stosowane w metabolomice, jednak w żadnej z prac nie przeprowadzono tak komplementarnych badań jak w niniejszej rozprawie. Są to zatem pierwsze tak kompleksowe badania metabolomiczne przeprowadzone na pacjentach z rakiem nerki.

W kolejnym rozdziale sformułowany jest jasny i zrozumiały cel pracy. Wymienione są cztery etapy badań, które mają prowadzić do osiągnięcia tego celu, tj.: dobór grup badanych, oznaczenia analityczne, analiza danych i interpretacja biochemiczna wyników.

W części eksperymentalnej wymieniona jest aparatura badawcza oraz wykorzystane odczynniki i materiały zużywalne. Opisana jest również metodyka pobierania materiału do badań oraz przedstawiona charakterystyka pacjentów. Wartość przeprowadzonych badań podnosi informacja, iż przed pobraniem materiału do badań pacjenci nie byli poddani farmakoterapii przeciwnowotworowej. Brak jest natomiast informacji odnośnie zabezpieczenia próbek moczu przed wzrostem bakterii. Czy przed zamrożeniem próbki zostały zabezpieczone poprzez dodanie przykładowo azydku sodu?

Charakterystyka pacjentów przedstawiona jest w postaci trzech tabel (Tabele 5-7), każda odpowiadająca innej grupie badanej. Pierwsza grupa to pacjenci ze zdiagnozowanym rakiem nerkowokomórkowym i grupa kontrolna. Próbkę pobrane od tych osób były analizowane różnymi technikami separacyjnymi (chromatografia gazowa i cieczowa oraz elektroforeza

kapilarna) w połączeniu z detekcją MS. Druga grupa to pacjenci z jasnokomórkowym rakiem nerki oraz grupa kontrolna. Próbkę od tych pacjentów zostały przeanalizowane technikami LC-MS i GC-MS. Trzecia grupa pacjentów to poszerzona grupa druga, a materiał biologiczny zebrany od tych osób został poddany analizom z zastosowaniem spektroskopii  $^1\text{H}$  NMR. Mam uwagi do doboru pacjentów. Zgodnie z Tabelą 5, w tej części badań grupa kontrolna składała się z ok. 59% kobiet, zaś grupa badana z ok. 57% mężczyzn. Podobnie w Tabeli 7, w trzeciej grupie badanej mężczyźni stanowili ok. 52% zdrowych ochotników, zaś w grupie pacjentów z jasnokomórkowym rakiem nerki znalazło się ponad 66% mężczyzn. Ponadto, w Tabelach 6 i 7 podana jest masa ciała i wskaźnik BMI, zaś w Tabeli 5 tylko wskaźnik BMI. Dobrym uzupełnieniem tabel byłyby wartości istotności statystycznych, wskazujące, iż porównywane grupy nie różniły się istotnie statystycznie podanymi w tabelach parametrami. Uwagę zwraca również uzasadnienie wykonania badań w trzeciej grupie pacjentów. Zgodnie z opisem, badania na tej grupie pacjentów zostały wykonane celem walidacji wyników uzyskanych dla grupy drugiej. Próbkę pacjentów z grupy drugiej analizowano technikami LC-MS i GC-MS, zaś z grupy trzeciej techniką NMR. Jaka część metabolitów wykrytych przy pomocy spektrometrii mas połączonej ze wspomnianymi technikami separacyjnymi została również wykryta przy wykorzystaniu techniki NMR?

Kolejne punkty części eksperymentalnej to szczegółowe opisy metod przygotowania próbek moczu do oznaczeń analitycznych, metod oznaczania próbek wszystkimi technikami, procedur przetwarzania danych pomiarowych i wykorzystanych metod statystycznych. Opisy te są bardzo dokładne, co wskazuje, iż Pani mgr Marta Kordalewska jest dobrze zaznajomiona z wykorzystywanymi protokołami analitycznymi.

Uzyskane wyniki badań znajdują się w rozdziale 2. Są one zestawione w postaci 12 rycin i 10 tabel. Zastanawiająca jest duża różnica w ilości zmiennych pomiędzy pierwszą a drugą grupą badaną, uzyskana w pozytywnej polaryzacji w badaniu techniką HPLC-TOF/MS. W pierwszej grupie były to 573 zmienne, w drugiej 205 zmiennych. Czy jest jakieś wyjaśnienie tej różnicy? Na stronie 72 przedstawiony jest wzór do wyliczenia procentu zmiany danego sygnału w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej, jednak w tabelach zawierających istotne statystycznie metabolity wstawione są po prostu strzałki wskazujące kierunek zmian. Przedstawienie zmian w postaci wartości liczbowych niesie ze sobą więcej informacji, pokazując nie tylko kierunek zmiany, ale również jej wielkość.

W dyskusji Doktorantka przedstawia własne wyniki w kontekście znanych przemian biochemicznych zachodzących w przebiegu chorób nowotworowych, a w szczególności raka nerki. Należy podkreślić, iż obserwowane zmiany interpretowane są nie tylko z uwzględnieniem przemian związków drobnocząsteczkowych, ale również biorąc pod uwagę znane z literatury zaburzenia szlaków białkowych obserwowane w przebiegu raka nerki. Świadczy to o szerokiej wiedzy biochemicznej Doktorantki w badanej tematyce. Uzyskane wyniki są również porównane do wyników z prac naukowych, w których wykorzystano metabolomikę do badań nad rakiem nerki. Bardzo dobrym podsumowaniem dyskusji jest Rysunek 17. Przedstawia on połączone szlaki metaboliczne, do których należą istotne statystycznie metabolity wykryte w wyniku przeprowadzonych badań. Nazwy metabolitów mają różne kolory, w zależności od metody, którą dany metabolit został wykryty. Bardzo dobrze obrazuje to komplementarność wykorzystanych technik.

Wnioski wyciągnięte przez Doktorantkę na podstawie przeprowadzonych badań przedstawione są w postaci 5 punktów. Oprócz realizacji głównego celu pracy, czyli określenia zmian metabolicznych obserwowanych w raku nerki, Autorka wskazuje na użyteczność wybranych narzędzi analitycznych do osiągnięcia tego celu oraz ich komplementarność w badaniach metabolomicznych. Jeden z wniosków dotyczy wykrycia zmian w poziomie modyfikowanych nukleozydów, takich jak pseudourydyna oraz metyloguanozyna. Ich znaczenie w przebiegu innych chorób nowotworowych było już wcześniej opisywane, natomiast dzięki przeprowadzonym badaniom ich zmieniony poziom został po raz pierwszy stwierdzony w moczu pacjentów z rakiem nerki.

Cytowane piśmiennictwo obejmuje 155 pozycji, z czego 80% to prace opublikowane w ostatnim dziesięcioleciu. Są to w większości prace anglojęzyczne.

Podsumowując, uważam, iż rozprawa doktorska Pani mgr Marty Kordalewskiej porusza bardzo ważne zagadnienie kliniczne. Poszerzenie naszej wiedzy o szlakach metabolicznych zaburzonych w związku z rozwojem raka nerki może przyczynić się do poprawy diagnostyki i wskazania nowych celów terapeutycznych.

Z poziomu recenzenta nie mogę pominąć kilku błędów w druku, jak np. dwie kropki na końcu zdania na stronie 37 czy stężenie 200mM zapisane z odstępem pomiędzy zerami na stronie 52. Pragnę jednak podkreślić, że zarówno wymienione w recenzji uwagi, jak i błędy edytorskie nie podważają wartości merytorycznej przeprowadzonych badań.

Biorąc pod uwagę całość rozprawy doktorskiej stwierdzam, iż spełnia ona warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 poz. 882 z późn. zm.). Wnioskuje zatem do Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o przyjęcie niniejszej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Marty Kordalewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, ze względu na szeroki i nowatorski zakres wykonanych badań oraz ich dużą wartość merytoryczną zwracam się z prośbą do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy.

Białystok, dn. 28.05.2020r.

**KIEROWNIK**  
Laboratorium Metabolomiki  
Centrum Badań Klinicznych  
*Ciborowski*  
dr hab. Michał Ciborowski

Pieczętka jednostki organizacyjnej recenzenta

Michał Ciborowski

Imię i nazwisko recenzenta

dr hab.

Tytuł/stopień naukowy/stanowisko recenzenta

Imię i nazwisko  
doktoranta:

Marta Ewa Wordalewska

Tytuł pracy doktorskiej:

Ocena zmian metabolicznych u chorych  
z rakiem nerki z wykorzystaniem komplementarnych  
technik analitycznych i niecelowanej analizy  
metabolomicznej

#### WNIOSEK O WYRÓŻNIENIE PRACY DOKTORSKIEJ

Niniejszy zwracam się z wnioskiem do Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie przedmiotowej rozprawy doktorskiej.

Uzasadnienie:

Prezentowana mi do oceny rozprawa doktorska ma nowatorski charakter. Wykorzystano w niej najnowsze techniki analityczne. Przeprowadzone badania mają ogromne znaczenie kliniczne, społeczne i poznawcze. Po raz pierwszy przeprowadzono takie szerokie badania metabolomiczne na materiale biologicznym pobranym od pacjentów z rakiem nerki.

**KIEROWNIK**  
Laboratorium Metabolomiki  
Centrum Badań Klinicznych  
Ciborowski  
dr hab. Michał Ciborowski



## Zasady wyróżniania pracy doktorskiej

uchwalone przez Radę WF z OML w dniu 16.09.2014 r.

KANONICZNA ILMINACJA  
WYDZIAŁU FARMACEUTYCZNEGO  
GŁÓWNY OŚRODEK NAUKI I WYCHOWANIA  
FARMACEUTYCZNEGO  
UL. SŁOBIEŃSKA 100, 01-032 WARSZAWA  
TEL. 22 623 42 00, 22 623 42 01  
FAX 22 623 42 02  
WWW.FARMACEUTYCZNY.GUMED.WARSZAWA.PL

Praca doktorska może zostać wyróżniona przez Radę Nauk Farmaceutycznych poprzez podjęcie stosownej uchwały jeżeli spełnione są jednocześnie wszystkie warunki:

1. Wszyscy recenzenci pracy doktorskiej wystąpili w ramach przedłożonych pisemnych opinii z wnioskami wraz z uzasadnieniem o wyróżnienie pracy doktorskiej (załącznik nr 1). Wnioski o wyróżnienie składane w trakcie obrony pracy doktorskiej nie są rozpatrywane.
2. Po publicznej obronie wszyscy recenzenci podtrzymują (w formie ustnej) wniosek o wyróżnienie pracy.
3. Wyniki badań będących przedmiotem pracy zostały, do dnia przyjęcia pracy doktorskiej przez Radę Wydziału, ogłoszone w formie publikacji lub cyklu publikacji w czasopiśmie o łącznym współczynniku oddziaływania (*impact factor, IF*) wynoszącym co najmniej 3,0 (wartość IF wg JCR z roku opublikowania pracy). Doktorant w co najmniej jednej publikacji jest pierwszym współautorem. Artykuły przyjęte do druku uważa się za opublikowane.
4. Średnia wszystkich ocen z egzaminów doktorskich jest nie niższa niż 4,5 przy czym z dyscypliny podstawowej – jest ocena 5.

RNF podejmuje uchwałę o wyróżnieniu pracy doktorskiej w tajnym głosowaniu większością  $\frac{2}{3}$  głosów. Wyróżnienie następuje w dniu nadania stopnia doktora. Uzyskanie wyróżnienia uprawnia do ubiegania się o przyznanie nagrody naukowej Rektora GUMed.

## Zasady wyróżniania osiągnięcia naukowego w postępowaniu habilitacyjnym

uchwalone przez Radę WF z OML w dniu 16.09.2014 r.

Osiągnięcie naukowe może zostać wyróżnione przez Radę Nauk Farmaceutycznych poprzez podjęcie stosownej uchwały, na wniosek Komisji Habilitacyjnej powołanej do przeprowadzenia postępowania habilitacyjnego z inicjatywy wszystkich recenzentów, jeżeli wyniki badań, stanowiące osiągnięcie naukowe, będące przedmiotem postępowania habilitacyjnego zostały ogłoszone w formie cyklu publikacji w czasopiśmie o łącznym współczynniku oddziaływania (*impact factor, IF*) wynoszącym co najmniej 15,0 (wartość IF wg JCR z roku opublikowania pracy).

RNF podejmuje uchwałę o wyróżnieniu osiągnięcia naukowego w tajnym głosowaniu, większością  $\frac{2}{3}$  głosów. Wyróżnienie następuje w dniu nadania stopnia doktora habilitowanego. Uzyskanie wyróżnienia uprawnia do ubiegania się o przyznanie nagrody naukowej Rektora GUMed.

KANONICZNA ILMINACJA  
WYDZIAŁU FARMACEUTYCZNEGO  
GŁÓWNY OŚRODEK NAUKI I WYCHOWANIA  
FARMACEUTYCZNEGO  
UL. SŁOBIEŃSKA 100, 01-032 WARSZAWA  
TEL. 22 623 42 00, 22 623 42 01  
FAX 22 623 42 02  
WWW.FARMACEUTYCZNY.GUMED.WARSZAWA.PL