



Prof. Piotr Młynarz  
Katedra Biochemii,  
Biologii Molekularnej i Biotechnologii  
Wydział Chemiczny  
Politechnika Wrocławska  
Wybrzeże Wyspiańskiego 27  
50-370 Wrocław

Wrocław, 30.08.2023 r.

## Recenzja

### **rozprawy doktorskiej mgr farm. Julii Jacyny, zatytułowanej: „Analizy metabolomiczne w nowotworach pęcherza moczowego z zastosowaniem technik analitycznych sprzężonych ze spektrometrią mas oraz zaawansowanych metod statystycznych”**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska była zrealizowana pod kierunkiem Pana Profesora Michała Markuszewskiego, który od lat z dużymi sukcesami zajmuje się bioanalitiką stosowaną w naukach medycznych oraz ścisłych i przyrodniczych, to jest w chemii i biologii.

Odpowiednie zaplanowanie eksperymentu razem z opracowaniem powtarzalnych protokołów badawczych, przeprowadzenie analizy metodyki przygotowania próbki oraz wykonania pomiaru powinno być częścią procedury związanej z prawidłowo wykonaną analizą metabolomiczną. Pomimo dużego potencjału metabolomiki i prawie 30 lat jej rozwoju nie została ona wdrożona na stałe do diagnostyki medycznej. Główną przyczyną jest właśnie brak powtarzalności wyników pomiędzy różnymi laboratoriami na skutek stosowania odmiennych procedur. Problem ten występuje pomimo wielu prac systematyzujących poszczególne protokoły badawcze. W szczególności dotyczy badań z zastosowaniem spektrometrii mas sprzężonej z takimi metodami rozdzielania jak chromatografia gazowa oraz chromatografia cieczowa, gdzie zarówno przygotowanie eksperymentu jak i jego przeprowadzenie wymaga ustalenia wielu zmiennych. W tym świetle, tym bardziej ważna staje się tematyka podjęta w niniejszej dysertacji, a w połączeniu z diagnostyką raka pęcherza jest nie tylko ważna z naukowo-badawczego punktu widzenia, ale również ze względów społecznych.

Dysertacja doktorska Pani mgr Julii Jacyny jest napisana w formie hybrydowej tzn. znajdują się w niej zwyczajowo streszczenia w języku polskim i angielskim oraz wprowadzenie, w którym zostały dołączone opublikowane prace w formie wydruków „pdf”. Jest to ciekawy, aczkolwiek dość niespotykany sposób konstrukcji wstępu do pracy doktorskiej. Rezultaty badań wykonanych do pracy doktorskiej zostały również dołączone w formie trzech wydrukowanych prac.

Jak już napisałem praca ta nie jest standardowa składa się z takich rozdziałów jak: „Streszczenie”, „Wprowadzenie”, „Cel pracy”, „Część doświadczalna”, „Podsumowanie i wnioski”, „Piśmiennictwo” oraz „Addendy”.

Streszczenie pracy zawiera syntetyczny opis prac przeprowadzonych w dysertacji doktorskiej. Rozdział „Wprowadzenie” stanowi bardzo ciekawy fragment pracy, który w pierwszym

podrozdziale wprowadza czytelnika w problematykę związaną z rakiem pęcherza tzn.: zostały zaprezentowane dane epidemiologiczne, czynniki ryzyka, klasyfikacja histopatologiczna oraz metody diagnostyki raka pęcherza. Tą część pracy uważam za dobrze napisaną w której Autorka dysertacji z dużą szczegółowością opisuje każde z poruszonych zagadnień. Następny podrozdział dotyczy analizy metabolomicznej. Na początku została w nim scharakteryzowana niecelowana analiza metabolomiczna z jej głównymi założeniami, typowym przebiegiem procesów badawczych, metodami analitycznymi stosowanymi w metabolomice, razem z ich wadami i zaletami oraz możliwościami analizy danych. Po tej części pracy Pani mgr Julia Jacyna wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z dotychczasową wiedzą na temat wyników uzyskanych w badaniach metabolomicznych nad rakiem pęcherza. Doktorantka słusznie zauważyła, że otrzymane na przestrzeni 13 lat wyniki różnią się od siebie, chociaż wspólnym mianownikiem opisywanym w pracach pozostają zmiany, w metabolizmie aminokwasów, puryn i pirymidyn wraz z zaburzeniami przemian energetycznych. Następny podrozdział to podejście projakościowe w metabolomice. W nim to Autorka dysertacji na początku zamieściła krótki wstęp, po którym zostały umieszczone dwie wydrukowane już prace (o których wcześniej wspomniałem) to jest monografia naukowa zatytułowana „*Quality of Design in Bioanalytics*” (autorzy: J. Jacyna, M. Kordalewska, M. J. Markuszewski, w Handbook of Bioanalytics, ed. Bogusław Buszewski, Irena Baranowska, wyd. Springer, Cham., 2022) oraz praca opublikowana w czasopiśmie JPBA, w 2019 roku „*Design of Experiments in metabolomics-related studies: An overview*” autorstwa J. Jacyna, M. Kordalewska i M. J. Markuszewski. W obu pracach Pani mgr Julia Jacyna jest na pierwszej pozycji w kolejności autorów wskazując na jej wiodącą rolę w napisaniu obu publikacji przeglądowych.

Następny rozdział to „Cel pracy”, w którym Doktorantka w bardzo rozbudowany sposób poprzez realizację celów cząstkowych zamierzała przeprowadzić ocenę profili metabolicznych w przebiegu raka pęcherza moczowego. Do celów cząstkowych należy zaliczyć: a) niecelowaną analizę metaboliczną próbek moczu pacjentów cierpiących na raka pęcherza (BC) i osób zdrowych, przeprowadzoną za pomocą platformy składającej się z trzech komplementarnych metod opartych na spektroskopii  $^1\text{H}$  NMR, spektrometrii mas sprzężonej z chromatografią cieczową LC-MS i chromatografią gazową GC-MS; b) niecelowaną analizę metabolomiczną próbek moczu pacjentów (BC) zebranych przed zabiegiem (jeden raz) i po resekcji guza (jeden dzień i dwa tygodnie po zabiegu), wykonaną za pomocą metody LC-MS i GC-MS; c) wykorzystanie metod projakościowych do wyznaczenia elastyczności (*ang. robustness*) metody przygotowania próbek biologicznych wraz z oszacowaniem wpływu niewielkich zmian w zastosowanej procedurze na profile metabolomiczne. Ostatni z celów cząstkowych miał być zrealizowany poprzez preparacje próbek moczu zgodnie z planem Placketta-Bumana oraz ich analizę za pomocą metody GC-MS z zastosowaniem do otrzymanych wyników zaawansowanych metod analizy statystycznej.

W dalszej części pracy znajduje się rozdział „Część doświadczalna”, w skład której wchodzi trzy publikacje będące przedmiotem niniejszej rozprawy. Pierwsza publikacja zatytułowana „*Urinary metabolomic signature of muscle-invasive bladder cancer: A multiplatform approach*” zgodnie z celem pracy przedstawia badania metaboliczne wykonane za pomocą wcześniej wspomnianych trzech metod analitycznych. W tym miejscu należy dodać,

że pomiary LC-MS były wykonane przy użyciu dwóch układów analitycznych typu RP (reverse phase) oraz HILIC (hydrophilic interaction chromatography), w trybie jonów dodatnich i ujemnych. Badana grupa obejmowała sumarycznie 48 osób (24 pacjentów BC oraz 24 osoby zdrowe) zbalansowanych po względem płci, wieku, wskaźnika BMI oraz palenia tytoniu. W wyniku przeprowadzonych analiz metabolomicznych zostało przeanalizowanych 6 zestawów danych, następnie z nich wyodrębniono 17 metabolitów, które wykazały istotność statystyczną przynajmniej dla jednego zestawu danych. Zbiór potencjalnych biomarkerów był zgodny z danymi literaturowymi, należał do ścieżek metabolicznych związanych głównie z metabolizmem energetycznym, metabolizmem aminokwasów oraz puryn i pirymidyn.

Druga z prac zatytułowana „*Pre- and Post-Resection Urine Metabolic Profiles of Bladder Cancer Patients; Results of Preliminary Studies on Time Series Metabolomics Analysis*” obejmuje badania próbek moczu pacjentów w trzech punktach czasowych przed resekcją guza jeden dzień oraz dwa tygodnie po resekcji. Półilościowa analiza celowana przeprowadzona za pomocą metody LC-MS podobnie jak w poprzednich pomiarach z wykorzystaniem układów RP i HILIC oraz GC-MS wykazała, że spośród 17 metabolitów znalezionych w pierwszej z prac tylko trzy z nich to jest kwas propionowy, erytrytol oraz urydyna potwierdziły potencjał w prawidłowej klasyfikacji pacjentów z BC. Przeprowadzona niecelowana analiza wykazała 25 metabolitów o istotności statystycznej, z których prawie połowa to były metabolity metylowane, a ich rola została po części omówiona w pracy. W tym miejscu mam pytanie o możliwe źródło erytrytolu jako substancji egzogennej.

Trzecia praca zatytułowana „*Evaluation of robustness in untargeted metabolomics: Application multivariate analysis, linear regression and hierarchy modeling*” jest pracą metodologiczną. Jej celem było wykazanie krytycznych dla analizy GC-MS etapów związanych z przygotowaniem próbki. Zastosowanie niniejszego podejścia sprzyja zminimalizowaniu zmienności analitycznej. Do oszacowania wpływu zmiennych Doktorantka zastosowała w pracy plan Placketta-Burmana wraz z trzema podjęciami do danych otrzymanych za pomocą analizy GC-MS, to jest analizę głównych składowych PCA, regresji liniowej obliczonych średnich intensywności sygnału dla metabolitów oraz trzeci sposób, czyli hierarchiczne modelowanie liniowe. W całości wykonano 12 eksperymentów, które pozwoliły na identyfikację istotnych parametrów przygotowania próbek wpływających na otrzymane wyniki analizy. W wyniku przeprowadzonego eksperymentu Doktorantka dowiodła, że trzecie z zastosowanych podejść jest najbardziej efektywne. Wykazała, że do krytycznych etapów przygotowania próbki w analizie GC-MS należy zaliczyć czas całonocnej inkubacji oraz objętość dodanego metanolu. Dodatkowym parametrem, który również mógłby mieć wpływ na intensywność sygnałów byłyby czas odparowywania próbki, ale ten czynnik jak napisała sama Autorka dysertacji, wymaga jeszcze dodatkowych badań. Zdaniem recenzenta zaprezentowane podejście powinno być stosowane przy każdej metodzie z zastosowaniem badań nie tylko metabolomicznych, lecz również analitycznych.

Podsumowując, według przedstawionych przez Doktorantkę oświadczeń Autorka pracy miała wiodący udział w opublikowanych pracach opanowując warsztat laboratoryjny nie tylko badań bioanalitycznych, ale również planowania eksperymentów, analizy statystycznej oraz chemometrycznej. Za największe osiągnięcie niniejszej dysertacji uważam

ostatnią z przedstawionych prac wraz z przedstawieniem metodyki oszacowania elastyczności procedury przygotowania próbek biologicznych. W całościowym dorobku Doktorantka posiada 22 publikacje, z których 18 znajduje się na liście czasopism JCR. Jak można się domyśleć z załączonych podziękowań Doktorantka była beneficjentką grantu NCN „Preludium” oraz brała udział dodatkowo w dwóch projektach. Jest to bardzo rzadko spotykany, duży dorobek publikacyjny i grantowy wskazujący na duże zaangażowanie i wysoką aktywność naukową Pani mgr Julii Jacyny w realizacji zadań badawczych, co bardzo dobrze rokuje na przyszłość.

Prawie na koniec recenzji dodam, że nie mam w zwyczaju wymieniania jakichkolwiek błędów językowych, czy edytorskich, czego i w tym wypadku nie zamierzam czynić, ponieważ nie wpływają one na merytoryczną zawartość pracy.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Julii Jacyny spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określonym w ustawie z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z 18 kwietnia 2003 z późniejszymi zmianami i uzupełnieniami) oraz art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669, z późn. zm.) i wnioskuję o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoki poziom prowadzonych multiplatformowych badań metabolomicznych oraz rozwijaniem metod związanych z jakością analiz wnoszę o wyróżnienie niniejszej dysertacji doktorskiej.

