



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

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Szymona Macioszka pt.:

*„Poszukiwanie zależności pomiędzy składem metabolicznym tkanki a farmakoterapią nowotworu podścieliskowego przewodu pokarmowego na przykładzie modelu mysiego”*

wykonanej w Zakładzie Biofarmacji i Farmakokinetyki Katedry Biofarmacji i Farmakodynamiki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem Prof. dr hab. Michała J. Markuszewskiego oraz Prof. dr. Agnieszki Wozniak z Laboratory of Experimental Oncology, Department of Oncology Katolickiego Uniwersytetu w Leuven, Belgia.

W ocenianej rozprawie doktorskiej przedstawione zostały badania nad nowotworami podścieliskowymi przewodu pokarmowego (GIST). Materiałem badanym była tkanka nowotworowa pozyskana od mysiego ksenograftu ludzkiego GIST, a jako metody badawcze wykorzystane zostały takie nowoczesne techniki wielkoskalowe jak metabolomika i transkryptomika. Część eksperymentalna obejmowała zarówno aspekty analityczne, tj. opracowanie metody przygotowania tkanki GIST do niecelowanej analizy metabolicznej przy pomocy LC-MS; jak również badania aplikacyjne polegające na ocenie zmian w metabolomie i transkryptomie tkanki nowotworowej wywołanych leczeniem imatynibem, z uwzględnieniem rodzaju mutacji w genie *KIT*. Przeprowadzone badania pozwoliły na wskazanie zmian w poziomie metabolitów tkanki nowotworowej pod wpływem zastosowanej farmakoterapii, z uwzględnieniem różnic w zależności od rodzaju mutacji. Uzyskane wyniki nie tylko potwierdziły zmiany w znanych szlakach metabolicznych powiązanych z rozwojem choroby nowotworowej, ale pozwoliły również na wskazanie innych procesów, np. metabolizmu puryn i pirymidyn, które mogą mieć znaczenie w odpowiedzi na leczenie.

W skład ocenianej rozprawy doktorskiej wchodzi trzy spójne tematycznie oryginalne publikacje anglojęzyczne, w których Doktorant jest pierwszym autorem. Prace te zostały opublikowane w czasopismach wysoko sklasyfikowanych (kategoria Q2) w najnowszym zestawieniu bazy *Journal Citation Reports* opublikowanym w 2022 roku przez Clarivate Analytics. Sumaryczna

wartość współczynnika oddziaływania (z ang. *impact factor*) tych prac to prawie 15 punktów oraz 340 punktów MEIN. Należy podkreślić, że jedna z tych prac była już cytowana 3 razy, natomiast pozostałe nie były jeszcze cytowane, ale zostały opublikowane dopiero kilka miesięcy temu.

Główne elementy obejmującej 104 strony rozprawy to wprowadzenie, cel pracy, część doświadczalna, podsumowanie i wnioski oraz bibliografia. W części doświadczalnej umieszczone są wspomniane wcześniej publikacje Doktoranta wraz z materiałami dodatkowymi (tzw. suplementy). Ponadto, na początku rozprawy umieszczone są: spis treści, wykaz skrótów oraz streszczenia rozprawy w języku polskim i angielskim. Ostatnie części to oświadczenia współautorów publikacji odnośnie udziału każdego z nich w badaniach i tworzeniu prac wchodzących w skład rozprawy oraz wykaz pozostałych publikacji Doktoranta.

W części teoretycznej rozprawy Doktorant przedstawia m.in. istotne informacje nt. metabolomiki i metabolitów, wskazując na czynniki decydujące o składzie metabolitów w organizmie. Przybliży początki badań metabolomicznych, zaznaczając, że ich pierwsze zastosowania w obszarze biomedycyny dotyczyły poszukiwania biomarkerów i toksykologii. Ponadto charakteryzuje dwa podstawowe podejścia do badania metabolomu, tj. analizy celowane i niecelowane. W odniesieniu do metod analitycznych wykorzystywanych do oznaczania metabolomu wskazana jest spektrometria mas w połączeniu z różnymi technikami separacyjnymi. Cenną metodą wykorzystywaną w tego typu badaniach jest też spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), która mogłaby zostać wymieniona we wstępie, pomimo iż nie była stosowana w przedstawionych w rozprawie badaniach. W tej części wprowadzenia umieszczony jest także czytelny schemat przedstawiający etapy eksperymentu badawczego opierającego się na niecelowanych badaniach metabolomicznych. Następnie scharakteryzowane są nowotwory GIST z uwzględnieniem danych demograficznych, częstości występowania w poszczególnych miejscach przewodu pokarmowego oraz charakterystycznych mutacji związanych z tym rodzajem nowotworu. W kontekście tematyki rozprawy, ważnym aspektem poruszonym w jej części teoretycznej jest terapia GIST. Przedstawione są obowiązujące w Europie wytyczne dotyczące postępowania terapeutycznego w GIST, ze szczególnym uwzględnieniem algorytmów postępowania w przypadku terapii imatynibem. Lek ten został zatwierdzony do leczenia GIST w 2001 roku. Omówiony jest mechanizm jego działania, a Doktorant porusza również ważny aspekt oporności na ten lek, który występuje u części pacjentów. Ponadto dokładnie przedstawia dotychczas poznane zmiany na poziomie genów determinujące powstawanie oporności na imatynib. Ostatnia część wprowadzenia poświęcona jest możliwościom, jakie daje zastosowanie metabolomiki w badaniach nad nowotworami. Dokładnie opisane są procesy

biochemiczne charakteryzujące komórki nowotworowe, których odzwierciedleniem są zmiany w poziomie konkretnych metabolitów. Zmiany te mogą być śledzone przy pomocy metabolomiki, co w konsekwencji może prowadzić do identyfikacji biomarkerów chorób nowotworowych, wskazania nowych celów terapeutycznych, jak również śledzenia czy przewidywania odpowiedzi na leczenie. Doktorant przytacza najważniejsze osiągnięcia metabolomiki w tych aspektach w obszarze onkologii. Wstęp teoretyczny dostarcza istotnych informacji zarówno z punktu widzenia tematyki rozprawy, jak i wykorzystanych metod badawczych.

Cel pracy został przedstawiony w postaci celu głównego oraz szeregu celów pośrednich. Celem głównym było opracowanie optymalnej metody do analizy profilu metabolomicznego tkanki guza GIST oraz zastosowanie jej do oceny wpływu mutacji oraz działania imatynibu na metabolizm tkanki nowotworowej. Biorąc pod uwagę przeprowadzone badania, cel główny mógłby być bardziej precyzyjny, wskazując, że opracowanie metody dotyczyło przygotowania próbki. Cel w brzmieniu jak powyżej sugeruje, że optymalizacja mogła dotyczyć także parametrów metody LC-MS. Cele pośrednie precyzyjnie określają poszczególne etapy badań prowadzące do realizacji celu głównego.

Część doświadczalną rozprawy stanowią publikacje będące jej podstawą. Są one wymienione na początku tego rozdziału. Każda z prac poprzedzona jest jednostronicowym komentarzem, w którym przedstawione są uzyskane w danej pracy wyniki badań wraz z płynącymi z nich wnioskami.

W pierwszej pracy przedstawione zostały badania, których celem było opracowanie metody przygotowania tkanki nowotworowej GIST do niecelowanej analizy metabolomicznej techniką LC-MS. Próbki tkanki były przygotowywane wg czterech różnych protokołów zaczerpniętych z literatury, a każdy z nich pozwalał na uzyskanie dwóch frakcji metabolitów, polarnej i niepolarnej. Frakcja polarna była analizowana z wykorzystaniem chromatografii HILIC, a niepolarna chromatografii w układzie faz odwróconych. Przy wyborze najlepszej metody ekstrakcyjnej pod uwagę była brana ilość wykrywanych metabolitów oraz powtarzalność pomiaru. Najlepsze parametry uzyskano stosując metodę opartą na dwuetapowej ekstrakcji przy pomocy takich rozpuszczalników jak eter tert-butyloowo-metylowy, metanol i woda. Należy podkreślić, że część analityczna tych badań została starannie zaplanowana i zrealizowana. Oprócz próbek badanych przygotowane i przeanalizowane zostały ślepe próby, czyli tzw. blanki ekstrakcyjne oraz próbki QC do kontroli procesu analitycznego. Za nowatorskie uważam wykorzystanie w tych badaniach metod planowania eksperymentów (ang. *Design of Experiments*, DoE) do wskazania, które etapy protokołu analitycznego są najbardziej wrażliwe i ich przeprowadzanie powinno być wykonywane z nadzwyczajną starannością. Metody DoE są często wykorzystywane do optymalizacji protokołów analitycznych dedykowanych do pojedynczych metabolitów, jednak ich

zastosowanie do oceny czy optymalizacji metod niecelowanych jest nowością. Dzięki DoE autorzy pracy wykazali, że objętość MTBE ma krytyczny wpływ na powtarzalność procedury ekstrakcji i warto zwrócić uwagę na precyzję pipetowania tego rozpuszczalnika w trakcie przygotowania próbek do badań. Oprócz parametrów branych pod uwagę przez Doktoranta i współpracowników do oceny różnych protokołów przygotowania próbek, badacze wykorzystują również wyniki uzyskane dla standardów analitycznych, które są dodawane do badanych próbek. Mogą to być znakowane izotopowo analizy występujące w badanych próbkach lub takie związki, które naturalnie w próbce nie występują. Czy podczas planowania tych badań Doktorant brał pod uwagę możliwość zastosowania standardów do oceny efektywności i powtarzalności różnych protokołów analitycznych? Jakie są wady i zalety wykorzystania standardów wewnętrznych do oceny protokołów analitycznych w przypadku niecelowanych badań metabolomicznych?

W kolejnych badaniach, które zostały opublikowane w czasopiśmie *Translational Oncology*, mysie ksenografty z nowotworem GIST charakteryzującym się mutacją w genie KIT były poddane leczeniu imatynibem, a grupą kontrolną były myszy nieleczone. Od badanych zwierząt pobrano tkanki GIST, które poddano badaniom transkryptomycznym i metabolomicznym z wykorzystaniem techniki GC-MS. Uzyskane wyniki badań pozwoliły na wskazanie potencjalnie nowego mechanizmu przeciwnowotworowego działania imatynibu, jakim jest jego wpływ na biosyntezę puryn, co zostało wykazane na poziomie transkryptomu i metabolomu. Analiza próbek na dwóch poziomach omicznych jest niewątpliwie dużą wartością tych badań, jednak wydaje się, że dobrym ich uzupełnieniem byłaby analiza funkcjonalna łącząca wyniki badań metabolomicznych i transkryptomicznych. Czy wg wiedzy Doktoranta dostępne są narzędzia bioinformatyczne, które pozwalają na wykonanie tego typu analiz? Ponadto, skoro we wcześniej przedstawionych badaniach zoptymalizowana została metoda przygotowania próbki GIST do badań metabolomicznych techniką LC-MS, dlaczego nie wykorzystano jej w tych badaniach?


W badaniach przedstawionych w ostatniej publikacji z cyklu uwzględniono cztery modele ludzkiego ksenograftu różniące się mutacjami w genie KIT. Podobnie jak w poprzedniej pracy, zwierzęta z daną mutacją zostały podzielone na dwie grupy, tj. leczone i nieleczone imatynibem. Należy podkreślić, że wybrane mutacje charakteryzują się różną odpowiedzią na zastosowane leczenie. Pobrane od zwierząt tkanki GIST zostały poddane badaniom metabolomicznym z wykorzystaniem komplementarnych technik LC-MS i GC-MS. Uzyskane wyniki badań wskazują na znaczne różnice w metabolomie tkanki nowotworowej w zależności od rodzaju mutacji. Ponadto, zmienność metabolomu w związku z zastosowanym leczeniem była większa w przypadku mutacji podatnych na leczenie imatynibem. Uzyskane wyniki dowodzą, że metabolomika ma duży potencjał by wskazać procesy biochemiczne związane z opornością na leczenie imatynibem. Ponadto pokazują,

że metody analityczne stosowane w badaniach metabolomicznych są komplementarne i wskazane jest prowadzenie badań z wykorzystaniem różnych platform.

Podsumowanie przeprowadzonych badań oraz wnioski wyciągnięte przez Doktoranta na ich podstawie zamieszczone są w odrębnym rozdziale. Część wniosków przedstawiona jest w postaci punktów, które odpowiadają na konkretnie pytania postawione w celach pracy. Odpowiedź na pozostałe cele pracy znajduje się w opisowym podsumowaniu uzyskanych wyników. Doktorant wskazuje, że niecelowane analizy metabolomiczne przyczyniają się do lepszego zrozumienia mechanizmów odpowiedzi i oporności guzów GIST na działanie imatynibu. Ponadto zauważa, że integracja danych uzyskanych na różnych poziomach omicznych pozwoliła na uzyskanie pełniejszego obrazu zmian molekularnych związanych z występowaniem choroby nowotworowej.

Spis literatury obejmuje 74 pozycje, z czego ponad 60% stanowią prace opublikowane w ostatnim dziesięcioleciu, a prawie 90% to pozycje z ostatnich 20 lat. Są to publikacje anglojęzyczne. Załączone oświadczenia współautorów publikacji naukowych będących podstawą rozprawy wskazują na znaczący wkład Doktoranta w ich powstanie. Pan mgr Szymon Macioszek brał udział w tworzeniu koncepcji badań, ich wykonywaniu, analizie wyników oraz przygotowywaniu prac. W momencie składania rozprawy, oprócz publikacji ją stanowiących, Doktorant był współautorem jeszcze 11 prac. Są to zarówno prace badawcze, jak również prace przeglądowe czy rozdziały w książkach. Wśród nich znajdują się prace opublikowane w tak prestiżowych czasopismach jak Trends in Analytical Chemistry. Biorąc pod uwagę etap kariery naukowej, dorobek publikacyjny Doktoranta jest imponujący.

Oceniając całość rozprawy, uważam, że zarówno przeprowadzone badania jak i przygotowany maszynopis reprezentują bardzo wysoki poziom. Uzyskane wyniki badań mają dużą wartość merytoryczną, a rozprawa została przygotowana z dbałością o walory estetyczne. Ponadto brak w niej błędów stylistycznych czy edytorskich. Na uwagę zasługuje wartość poznawcza przeprowadzonych badań, gdyż mogą przyczynić się do wskazania mechanizmów powstawania oporności nowotworu podścieliskowego przewodu pokarmowego na leczenie imatynibem. Stwierdzam, iż zgodnie z art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023 poz. 742), oceniana rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane tego typu dziełom. W związku z czym zwracam się do Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o dopuszczenie Pana mgr Szymona Macioszka do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia naukowego doktora.

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



Pieczętka jednostki organizacyjnej recenzenta

Michał Ciborowski

Imię i nazwisko recenzenta

Prof. dr hab. / Profesor

Tytuł/stopień naukowy/stanowisko recenzenta

Imię i nazwisko doktoranta: Szymon Macioszek

Tytuł pracy doktorskiej: "Poszukiwanie zależności pomiędzy składem metabolitów

tlanki a farmakoterapię nowotworu podścieliskowego przewodu pokarmowego  
WNIOSK O WYRÓŻNIENIE PRACY DOKTORSKIEJ na publikację w "Ochle  
nyskiego"

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

Uzasadnienie:

Oceńnię wyprawa doktorska poszuka naszą wiedzę  
dotyczy mechanizmów molekularnych, które mogą być  
odpowiedzialne za oporność na leczenie immunoterapią  
u osób pacjentów z nowotworem podścieliskowym przewodu  
pokarmowego. Ponadto, przeprowadzone badania pozwoliły na  
wskazanie optymalnej metody przypodobania tlanki nowotworu  
podścieliskowego przewodu pokarmowego do kultur metabolomicznych.  
Przeprowadzone badania mają zatem ogromną wartość  
poznawczą i praktyczną. Należy także podkreślić, że wyprawa  
ta powstała na podstawie trzech anglojęzycznych prac  
badawczych, które zostały opublikowane w bardzo dobrych  
czasopiśmie, wysoko klasyfikowanych w swoich dziedzinach.

KIEROWNIK

Laboratorium Metabolomiki  
Centrum Badań Klinicznych

Ciborowski  
prof. dr hab. Michał Ciborowski

podpis i pieczętka recenzenta

### **Zasady wyróżniania pracy doktorskiej**

uchwalone przez Radę WF z OML w dniu 16.09.2014 r.

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) wnioski 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.