

Olsztyn, 29.08.2016

Prof. dr hab. Ryszard Amarowicz
Zakład Chemicznych i Fizycznych Właściwości Żywności
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie

***Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr. Kamila Jurowskiego pt.
„Zastosowanie technik chromatograficznych i spektrometrii mas oraz metod
biochemicznych do badania zaburzeń lipidowych wywołanych modelowym lekiem z
grupy inhibitorów proteazy HIV-1”.***

***Praca wykonana została w Zakładzie Chemii Analitycznej – Zespół Analiz
Toksykologicznych i Farmaceutycznych – Wydziału Chemii Uniwersytetu
Jagiellońskiego w Krakowie pod kierunkiem Prof. dr. hab. Wojciecha
Piekoszewskiego.***

***Część badań finansowana była z projektu „Changes in lipid profile in differentiating
human preadypocytes under the anti-HIV protease inhibitor”, który był realizowany
w University Hospital Regensburg, Institute of Clinical Chemistry and Laboratory
Medicine pod opieką Prof.med. Gerda Schmitza.***

Przedstawiona do oceny praca doktorska obejmuje 191 stron druku. Jej treść została poprawnie podzielona na 11 części/rozdziałów. Są to: *Wprowadzenie*, *Rozdziały opisujące AIDS i jego leczenie*, *Zaburzenia lipidowe jako efekty uboczne leczenia AIDS z wykorzystaniem PI HOV-1*, *Lipidomika*, a w dalszej kolejności *Cel badań*, *Aparatura i materiały*, *Metodyka badań biochemicznych*, *Metodyka oznaczeń*

związków lipidowych w badanych próbach, Wyniki i ich omówienie, Posumowanie i wnioski, Literatura, Załączniki, Streszczenie.

Przedłożona do oceny Dysertacja podaje również dorobek naukowy Doktoranta: dane bibliometryczne, wystąpienia na konferencjach oraz publikacje.

Podany na początku Dysertacji wykaz stosowanych akronimów ułatwia czytanie pracy i zrozumienie zawartych w niej treści. Należy jednak zauważyć, że brak w nim kilku skrótów (np. ARW, CRABP-1, DAG, CTP, HDL, IMBX, LPL, PCR, RTV, LPL, TAG, SFC, CE) użytych w samej Dysertacji.

Dokumentację w Pracy stanowią 84 ryciny/rysunki i 4 tabele. Rysunki przygotowane są w profesjonalny sposób. Ich szata graficzna jest bardzo dobra. Rysunki w czytelny sposób przedstawiają uzyskane wyniki. Te odnoszące się do zagadnień teoretycznych ilustrują je i opisują w sposób przejrzysty.

Spis *Literatury* jest bardzo obszerny i obejmuje 255 pozycje, zaktualizowane do 2016. Dobór publikacji jest odpowiedni, uwzględnia wszystkie znaczące prace odnoszące się do tematyki badawczej. Zwracam jednak uwagę, że tytuły czasopism powinny być pisane z dużej litery. Konsekwentnie należało podawać je zawsze w pełnym brzmieniu. Nazwy łacińskie powinny być pisane kursywą.

We *Wprowadzeniu* Doktorant przedstawia podstawowe historyczne informacje dotyczące AIDS/HIV i metod leczenia, ze szczególnym uwzględnieniem znaczenia metody HAART. Następnie Doktorant odnosi się do patomechanizmów i patofizjologii lipodystrofii indukowanej stosowaniem leczenia inhibitorami proteaz HIV-1.

Wychodząc z treści zawartych we *Wstępie* Doktorant w logiczny i klarowny sposób sygnalizuje cel pracy - pełna jego formuła zawarta jest w Rozdziale 5. Drobne uwagi językowe dotyczą pisowni „na całym świecie”. Chcę zauważyć, że zwrot „margines społeczny” w naszym języku ma znaczenie dwuznaczne i nie powinien być użyty.

Rozdział 2 jest przeglądem piśmiennictwa odnoszącym się do AIDS i jego leczenia. Doktorant w typowy dla tego rodzaju pracy opisuje wirus HIV i mechanizm jego oddziaływania na układ odpornościowy. Pragnę zwrócić uwagę na wysoką jakość objaśniającą Rysunków 1 i 2.

Po wstępie „historycznym” dotyczącym leczenia zakażenia HIV Doktorant skupia się na lekach współczesnej terapii i mechanizmach ich działania. Podsumowaniem tego fragmentu Dysertacji jest przejrzysty Rysunek 3. W kolejnym podrozdziale Doktorant szczególną uwagę poświęca inhibitorom proteazy HIV-1. W oparciu o aktualne piśmiennictwo najpierw dokładnie opisuje zasadę działania proteazy, jej budowę molekularną, chemizm katalitycznego działania i organizację genomu proteazy. W kolejnym podrozdziale w kompleksowy sposób przedstawia aktualny stan wiedzy o inhibitorach proteazy HIV-1 i ich zastosowaniu w leczeniu AIDS.

Uwag krytycznych odnoszące się do Rozdziału 2 jest niewiele.

- W pierwszym fragmencie Wstępu (str. 19) powtórzono zdania z Wprowadzenia (str. 16).
- Str. 23 - Poprawniej byłoby „Dzięki wprowadzeniu leków....”
- Str. 24 - Styl zdania „Lek ten nie jest zarejestrowany do rozpoczynania leczenia w Europie” budzi wątpliwości.
- Str. 24 i 25 - Raczej „Istota działania”.
- Str. 27 - Poprawniej byłoby „hydrolizuje wiązanie peptydowe”.
- Str. 27 - Czytelniej powinno być „...tego enzymu (proteaza aspartyłowa)”.
- Gen „gag-pol” jest różnie pisany (str. 27 i 30).
- Str. 33 - Wątpliwy termin „pozbawione zakaźności”
- Str. 34 - Powinno być „PIs”.
- Str. 34 - Powinno być „228,7 mg mezylanu sakwinawiru”.
- Str. 35 - Wątpliwe terminy „tolerancja leczenia”, „toksyczność leczenia”.

Zaburzenia lipidowe jako efekty uboczne leczenia AIDS z wykorzystaniem PI HIV-1 zostały opisane przez Doktoranta w Rozdziale 3. Odnosząc się do danych

literaturowych informuje On w komunikatywny sposób o tkankach tłuszczowych i komórkach tłuszczowych, biochemii adipocytów, adipogenezie i różnicowaniu preadipocytów, lipodystrofii (zaburzeniu lipidowym indukowanym przez PI HIV-1). Wysoko ocenić należy opis zachodzącej w adipocytach biosyntezy fosfolipidów – Chemiczna strona wspomnianej biosyntezy w odpowiedni sposób przedstawiona została na rysunkach 14-17. Doktorant opisuje również wewnątrzkomórkowe konwersje fosfolipidów oraz obecność i biosyntezę w adipocytach sfingolipidów.

W Rozdziale 3 kilka sformułowań wymaga korekty.

- Str. 36 - Powinno być „...lipodystrofii indukowanej przez PI HIV-1”.
- Str. 37 - Powinno być „triacylgliceroli”.
- Str. 39 - Powinno być „estryfikowanych acetylokoenzymem A”.
- Str. 40 - Powinno być „biosynteza wielu fosfolipidów”.
- Str. 41 - Potknięciem językowym jest zwrot „reagować z reagentem”

Znaczenie lipidomiki w obszarze nauk o życiu oraz odniesienie jej do innych „omik” stanowi treść Rozdziału 4. Doktorant w oparciu o dane literaturowe oraz własne przemyślenia bezbłędnie definiuje podstawowe terminy lipidomiki, podkreśla jej znaczenie poznawcze i rosnącą rolę w diagnostyce medycznej. Treści zawarte w drugiej części Rozdziału 4 odnoszą się do przechowywania i przygotowywania próbek do badań lipidomicznych oraz do metod analitycznych wykorzystywanych w analizie lipidom. Według recenzenta ten fragment Dysertacji może być bardzo cenny dla naukowców, którzy zaczynają pracę w obszarze lipidomiki.

Zdaniem recenzenta przy opisie lipidomiki warto było wspomnieć o klasycznej metodzie chromatografii kolumnowej z serią eluentów o rosnącej polarności, która jest jedną z podstawowych metod rozfrakcjonowania lipidów z materiału biologicznego. Wydają się, że powinny też być opisane sposoby detekcji lipidów w HPLC. Odnosząc się do Tabeli 3 pragnę zauważyć, że sporządzenie mieszaniny ekstrakcyjnej trudno zaliczyć do etapu ekstrakcji. W metodzie Blight’a i Dyer’a oraz Folch’a najpierw następuje ekstrakcja lipidów mieszaniną chloroform-metanol, a dopiero potem woda dodawana jest do próby. W metodzie Dligh’a i Dyer’s przed dodaniem wody dodaje

się jeszcze dodatkowo chloroformu. W metodzie Folch'a próbę przemywa się roztworem NaCl, a nie KCl. Stwierdzenie „Pierwszy krok wydaje się ...stosunkowo nieinteresujący” (str. 54) powinno być poprawione.

W Rozdziale 5 Doktorant informuje o celu podjętych przez Siebie badań. Cel ten w logiczny sposób wynika z treści zawartych w poprzednich rozdziałach. Informacja podana przez Doktoranta jest syntetyczna i pełna. Zdaniem recenzenta pierwszy fragment „Celu badań” powinien kończyć się stwierdzeniem. „Do opisu zaburzeń zastosowano profile lipidowe”. Dyskusyjne jest zaliczenie analizy całkowitego stężenia białek do celu pracy. „Cel pracy” powinien się znaleźć w Rozprawie przed stroną 58, którą informuje o „Części doświadczalnej”.

Rozdział 6 podaje opis aparatury materiałów. Zawarty jest w nim dokładna lista sprzętu i urządzeń analitycznych stosowanych w hodowli komórkowej i eksperymencie *in vitro*, w pomiarze białka, w analizie kwasów tłuszczowych, fosfolipidów, sfingolipidów, cholesterolu i jego estrów. Następnie podane są dokładne listy materiałów i odczynników użytych w analizach.

Niewielkie uwagi odnoszące się do powyższego fragmentu pracy:

- Str. 63 – Powinno być „D-biotyna”.
- Str. 63 – Powinno być raczej „HEPES”.

Metodyka badań biochemicznych opisana została dokładnie w Rozdziale 7. Uwzględnia ona linie komórkowe i ich różnicowanie, pomiar całkowitego stężenia białka, warunki przechowywania próbek. Wydaje się, że w opisie powinna się znaleźć informacja o objętości w jakiej prowadzono badania wpływu sakwinawiru na zaburzenia lipidowe. Na stronie 69 poprawniejsze by było stwierdzenie „... wykazujące maksimum absorpcji w obszarze widzialnym przy 562 nm”.

Opis oznaczania związków lipidowych (Rozdział 8) przygotowany został bardzo starannie. Na szczególne podkreślenie zasługuje zaproponowana i użyta

strategia kalibracji, tak w przypadku analizy kwasów tłuszczowych przy użyciu techniki GC-MS, jak i fosfolipidów, sfingolipidów, cholesterolu i jego estrów za pomocą techniki ESI-MS/MS. Wysokie umiejętności analityczne Doktoranta potwierdzają Rysunki 26, 28 i 29 podające przykładowe wykresy kalibracyjne dla FA 16:0; LPC 16:0, LPC 18:0, LPC 22:0 względem LPC 13:0; Cer 16:0, Cer 18:0, Cer 24:1 względem Cer 17:0.

Uwagi odnoszące się do Rozdziału 8:

- Dla możliwości odtworzenia metod powinien być scharakteryzowany sposób ultradźwiękowej homogenizacji (str. 70).
- Niezrozumiały jest zwrot odnoszący się do zastosowania kwasu 13:0 w celu kontroli jakości (str. 70).
- Powinno być „jonizacja strumieniem elektronów” (str. 71).
- Końcowe stwierdzenie na str. 74 powinno brzmieć „Uzyskane chromatogramy charakteryzowały się rozdziałem większości estrów metylowych do linii podstawowej.”.
- Na str. 76 powinna być podana objętość 10 mM octanu amonu użytego do rozpuszczenia próbki.
- Str. 76 - Poprawny zwrot to „Warunki jonizacji w spektrometrze mas...”.
- Str. 77 - Poprawny zwrot to „...sygnałach od jonów...”.
- Str. 78 - powinno być „stężenia eterowych pochodnych”.
- Str. 78 - Proponowałbym „...być uważane za odbiegające od klasycznych procedur analitycznych...”.
- Str. 82 - Powinno być „możliwe było zastosowanie ESI”.

Zdaniem recenzenta w zakończeniu *Części doświadczalnej* powinien się znaleźć opis metod analizy statystycznej. Informacja, że Doktorant do weryfikacji istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi użył testu *t-Studenta* wzmiankowana jest dopiero przy wynikach pracy.

W pracy brak jest informacji na temat ilości powtórzeń w eksperymencie biologicznym oraz w analizach chemicznych.

Rozdział 9 - *Wyniki i ich omówienie* – napisany jest bardzo poprawnie. Doktorant w bardzo czytelny sposób podaje uzyskane wyniki. Dostrzega i opisuje zależności zachodzące pomiędzy poszczególnymi wynikami. Wyniki analiz chemicznych wykorzystuje do opisu zmian na poziomie komórkowym. Załączone wykresy dobrze ilustrują uzyskane wyniki. Na szczególne uznanie zasługuje forma tabelaryczna (rys. 45 i 59) zastosowana do przedstawienia wzajemnych zmian w stężeniach PC, LPC i FA w trakcie różnicowania oraz w trakcie różnicowania pod wpływem SQV.

W Rozdziale 9 znajduję nieliczne odniesienia uzyskanych wyników do danych literaturowych. Zgadzam się jednak z opinią Doktoranta, że przyczyna tego leży w pionierskim charakterze Jego badań.

Niektóre fragmenty Rozdziału 9 wymagają korekt.

- Str. 85 - Zwrot o tym, że forma przedstawienia wyników została narzucona przez Prof. Schmitza uważam niefortunny.
- Str. 85 - Powinno być „Skład FA został uzyskany/oznaczony za pomocą ...”.
- Str. 86 - Styl zdania „określenie wiarygodności przeprowadzenia eksperymentu ...w odniesieniu do danych literaturowych” budzi moje wątpliwości.
- Str. 86 – Poprawnie powinno być „...zmiany grup FA o różnej strukturze w badanych komórkach...”.
- Str. 87 - Tytuł podrozdziału powinien raczej brzmieć „Zmiany jakościowe i ilościowe FA...”.
- Str. 87 - Powinno być „Jakościowy i ilościowy skład FA badanych komórek...”.
- Str. 87 i inne miejsca – Doktorant podaje wyniki z dokładnością do pmol. Jak taka dokładność ma się do limitu detekcji i limit oznaczenia ilościowego dla zastosowanej metody analitycznej?
- Str. 90 – Powinno być „...wynika z użycia go w całości jako substratu ...w całości uległ przemianom ...”.
- Rys. 35, 38, 42 - Brak jednostki stężenia FA na osi.

- Str. 92 – Powinno być „... można uzasadnić wynikami badań Shaw’a ...”
- Str. 94 i inne miejsca – Zwrot „Wpływ SQV na zaburzenia FA” nie jest poprawny.
- W tytule rys. 45 i 59 użycie terminu „korelacja” jest mylące.

W Rozdziale 10 Doktorant podsumowuje pracę i artykułuje wnioski. Zgadzam się z Nim, że przeprowadzone badania miały charakter pionierskich. Wyniki analizowano w szerokim aspekcie, a uzyskano je wykorzystując nowoczesne metody analityczne. Rysunek 74 w czytelny sposób podsumowuje uzyskane wyniki w odniesieniu do zmian istotnych statystycznie, wynikających z wpływu SQV przed i po zróżnicowaniu względem kontroli ujemnej i dodatniej. Wypunktowane przez Doktoranta najważniejsze osiągnięcia niniejszej Pracy Doktorskiej uznaję za trafne. Za szczególnie ważne uważam stwierdzenie, że całościowa analiza potwierdza stymulację przez SQV syntezy większości lipidów przed procesem różnicowania, a z uwagi na tendencję do zmniejszania poziomu po zróżnicowaniu (oprócz PI) świadczy o skutecznym hamowaniu przez SQV procesu różnicowania. Wnioski 2-6 są adekwatne do postanowionych celów badawczych. Ich forma nie budzi moich wątpliwości. Treść pierwszego wniosku moim zdaniem jest dyskusyjna. Poprawna metodologia i wiarygodne metody analityczne są przecież warunkiem niezbędnym w rozwiązaniu problemów naukowych.

Oceniana Dysertacja poza częścią formalną zawiera również informacje o dorobku naukowym Doktoranta. Indeks Hirscha wynoszący 4 oraz ilość cytowań 47 są odpowiednie dla naukowca na tym etapie rozwoju. Doktorant jest współautorem ośmiu publikacji z listy JCR (o wartościach IF od 1,106 do 3,853) i sześciu prac z będących w części B wykazu czasopism naukowych MNiSW oraz dziesięciu rozdziałów w monografiach. Wyniki uzyskane w laboratorium Doktorant prezentował w 11 doniesieniach konferencyjnych. Z przytoczonych powyżej danych wynika, że Doktorant jest aktywny naukowo, a jego publikacje reprezentują wysoki poziom naukowy.

Wniosek końcowy

Reasumując chciałbym zauważyć, że pomimo zgłoszonych uwag i dostrzeżonych błędów oceniana praca wyróżnia się wysokim poziomem naukowym, wykonana została przy wykorzystaniu nowoczesnych i różnorodnych metod badawczych, a uzyskane wyniki zostały przedstawione, przeanalizowane i zinterpretowane w sposób wnikliwy.

W podsumowaniu swojej oceny pragnę stwierdzić, że praca doktorska Pana mgr. Kamila Jurowskiego pt. *„Zastosowanie technik chromatograficznych i spektrometrii mas oraz metod biochemicznych do badania zaburzeń lipidowych wywołanych modelowym lekiem z grupy inhibitorów proteazy HIV-1”* spełnia kryterium oryginalnego rozwiązania problemu naukowego oraz w oczywisty sposób wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydata w danej dyscyplinie naukowej oraz potwierdza Jego umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej - o tych kryteriach mówi Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki, ujednolicona 21.06.2016. Z pełnym przekonaniem przedkładałam zatem do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie wniosek o dopuszczenie Pana mgr. Kamila Jurowskiego do publicznej obrony niniejszej pracy.

Prof. dr hab. Ryszard Amarowicz

