

Toruń, dnia 5 września 2016 r.

dr hab. Renata Gadzała-Kopciuch, prof. UMK  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika  
Wydział Chemii  
ul. Gagarina 7  
87-100 Toruń

### Recenzja

rozprawy doktorskiej autorstwa mgra 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”  
wykonanej w Zakładzie Chemii Analitycznej  
w Zespole Analiz Toksykologicznych i Farmaceutycznych  
pod kierunkiem prof. dra hab. n. med. Wojciecha Piekoszewskiego

Obecnie do poszukiwania biomarkerów różnych jednostek chorobowych coraz częściej wykorzystuje się nowoczesne narzędzia analityczne, które umożliwiają ilościowe i jakościowe oznaczenie wybranych analitów. Informacje uzyskane dzięki technikom analitycznym pozwalają niejednokrotnie na znacznie precyzyjniejszą diagnostykę chorych a także umożliwiają skuteczniejsze prowadzenie badań profilaktycznych. To właśnie w naukach „omicznych”, takich jak: genomika, transkryptomika, proteomika, czy metabolomika, wykorzystywane są techniki chromatograficzne połączone ze spektrometrią mas, które dążą do wyjaśnienia jednostkowych procesów biologiczno-chemicznych składających się na funkcjonowanie organizmu. Wieloletnie badania dowodzą, że zaburzenia tych procesów są związane, między innymi, ze zmianami stężeń związków lipidowych, które mogą być wynikiem schorzeń spowodowanych ubocznym działaniem leków (tzw. schorzenia jatrogenne). To właśnie lipidomika (wchodząca w zakres metabolomiki), a ściślej ujmując identyfikacja i ilościowe określenie stężeń związków lipidowych w badaniu zaburzeń lipidowych, znalazły się w kręgu zainteresowań Pana mgra Kamila Jurowskiego. Tematykę badawczą umiejscowiono ściśle w obrębie zagadnień, które od lat realizowane są przez Promotora i Jego Zespół. Oceniana rozprawa to kolejny, cenny etap w metodycznie prowadzonych badaniach, które pozwalają na wytypowanie potencjalnych biomarkerów lipodystrofii. Chcąc uzyskać odpowiedź na niewyjaśnione do tej pory zagadnienia, Doktorant wytyczył sobie główny cel badań, którym było zastosowanie technik chromatograficznych połączonych ze spektrometrią mas oraz metod biochemicznych do szczegółowego zbadania zaburzeń lipidowych wywołanych jatrogennym wpływem leku z grupy inhibitorów proteazy HIV-1.

Jako przedstawiciel tej grupy leków wybrany został Sakwinawir. Wybór technik analitycznych, jakie zaproponował Doktorant do realizacji wytyczonych celów badawczych jest bardzo trafny, co zapewniło uzyskanie pełnej informacji zarówno jakościowej, jak i ilościowej wybranych związków lipidowych. Dzięki temu możliwe jest szczegółowe poznanie składu lipidowego komórek tłuszczowych w stanie fizjologicznym.

Układ ocenianej rozprawy doktorskiej jest klasyczny, co oznacza, że wyodrębniono w niej część literaturową oraz doświadczalną. Pierwsza część pracy stanowi około 30% objętości całej rozprawy (42 strony). To bardzo dobrze przygotowane wprowadzenie, które dla każdego analityka stanowiłoby ogromne wyzwanie ze względu na konieczność znajomości zagadnień z zakresu biochemii i medycyny. Pierwszy rozdział to *Wprowadzenie* pozwalające zapoznać się ogólnie z problematyką poruszaną w pracy. Można tu również odnaleźć uzasadnienie ważkości i konieczności podjęcia badań w tej tematyce. Kolejny rozdział stanowi kompendium wiedzy odnośnie zespołu nabytego upośledzenia odporności (AIDS), który wywołany jest przez ludzkiego wirusa HIV. Zebrane informacje dotyczące historii leczenia AIDS poczynając od nukleozydowego inhibitora odwrotnej transferazy, aż po aktualnie wprowadzoną intensywną terapię leczenia antywirusowego (HAART; inaczej ARW - antyretrowirusowa), są potwierdzeniem konieczności poszukiwania rozwiązań mających na celu opracowanie nowych leków. Omówienie tych zagadnień pozwoliło na przedstawienie w bardzo przejrzysty i zrozumiały sposób mechanizmu katalitycznego działania proteazy HIV-1, co było niezbędne do poznania zasady działania inhibitorów. Trzeci rozdział porusza zagadnienia dotyczące zaburzeń metabolicznych związanych ze zmianami stężenia związków lipidowych (lipodystrofia/lipoatrofia, dyslipidemia, insulinooporność) wynikających z ryzyka wystąpienia objawów ubocznych po wprowadzeniu do leczenia AIDS inhibitorów preoteazy HIV-1. Następnie Pan mgr Kamil Jurowski scharakteryzował lipidomikę i przedstawił osiągnięcia literaturowe w wykorzystaniu różnych technik analitycznych w celu określenia i charakterystyki funkcji strukturalnych, sygnałowych i metabolicznych związków lipidowych. To cenny rozdział, który daje obraz możliwości wykorzystania właściwych narzędzi analitycznych w części doświadczalnej.

Merytorycznie nie mam żadnych uwag do części literaturowej, która została przygotowana z ogromną starannością a poruszane zagadnienia wyczerpująco wyjaśnione. Jednoznacznie stwierdzam, że została ona przygotowana bardzo kompetentnie na tle osiągnięć i badań prowadzonych przez innych naukowców (literatura to 255 pozycji z przedmiotu pracy).

Dokonując oceny części doświadczalnej na początku należy odnieść się do sprecyzowanych w rozdziale piątym celów pracy. Nadrzędnym celem rozprawy

doktorskiej, jak już wspomniano powyżej, było cytuję: *zastosowanie technik chromatograficznych i spektrometrii mas oraz metod biochemicznych do zbadania zaburzeń lipidowych wywołanych jatrogennym wpływem leku z grupy inhibitorów proteazy HIV-1*. W przypadku metod biologicznych badania *in-vitro* były przeprowadzone na unieśmiertelnionej linii ludzkich preadipocytów (CHUB-S7), które uznano za dobry model w zakresie biologii komórek tłuszczowych. Uważam, że cel pracy został sformułowany nieprecyzyjnie, gdyż zastosowanie technik chromatograficznych i spektrometrii mas z wykorzystaniem opisanych procedur dostępnych w literaturze (cytowana literatura od 239-244) w myśl obowiązującej ustawy nie stanowi oryginalnego rozwiązania problemu. Znacznie poprawniejsze byłoby zaproponowanie celu np.: *badanie zaburzeń lipidowych wywołanych jatrogennym wpływem leku z grupy inhibitorów proteazy HIV-1 z wykorzystaniem...*

W części doświadczalnej rozprawy doktorskiej obejmującej 92 strony Pan mgr Kamil Jurowski umieścił informacje o stosowanej aparaturze analitycznej, odczytnikach oraz opisał metodyki stosowane w celu przygotowaniu próbek i końcowego oznaczenia wybranych związków lipidowych. W dalszej części zostały zestawione wyniki z przeprowadzonych badań, które zostały logicznie zaplanowane i systematycznie wykonywane, dzięki czemu możliwe było śledzenie na bieżąco poszczególnych etapów badań, a uzyskane wyniki stanowią cenny materiał badawczy, który niewątpliwie zostanie opublikowany.

W wyniku prac eksperymentalnych wykorzystano metodyki izolowania i oznaczania kwasów tłuszczowych (GC-MS), fosfolipidów (ESI-MS/MS), sfingolipidów (LC-MS/MS), cholesteroli i estrów cholesterolu (ESI-MS/MS) a wyniki uzyskane na podstawie tych pomiarów zestawiono w rozdziale 9. Ogromna ilość uzyskanych danych na podstawie licznych pomiarów analitycznych posłużyła do opracowania porównawczych profili lipidowych dla czterech klas związków lipidowych: kwasów tłuszczowych, fosfolipidów, sfingolipidów cholesterolu i jego estrów. Należy zwrócić szczególną uwagę, że zastosowanie technik chromatograficznych z bardzo czułymi sposobami detekcji umożliwiło uzyskanie informacji jakościowej o poszczególnych związkach lipidowych i określeniu ich zmian ilościowych dla komórek niezróżnicowanych i niezróżnicowanych z dodatkiem Sakwinawiru. Na podstawie ogólnej analizy statycznej Doktorant wytypował potencjalne biomarkery lipodystrofii takie jak: FA 18:0, FA 20:1-c11(n-9), LPC 20:4, PS 40:5, PS 40:6, CE 16:1 i CE 18:1.

Do najważniejszych osiągnięć Doktoranta uzyskanych w wyniku badań zaliczam:

- wytypowanie potencjalnych biomarkerów lipodystrofii,
- otrzymanie szczegółowych informacji na temat składu lipidowego komórek tłuszczowych w stanie fizjologicznym,

- potwierdzenie patomechanizmu lipotoksyczności oraz uzyskanie lipidowego modelu patofizjologii lipodystrofii wywołanej lekami stosowanymi w HAART,
- potencjalne wykorzystanie opracowanych metodyk do poszukiwania biomarkerów lipodystrofii w materiale biologicznym jakim jest surowica krwi.

Podczas oceny merytorycznej rozprawy doktorskiej nasunęły mi się pewne uwagi, spostrzeżenia i rozważania warte przedyskutowania.

1. W części doświadczalnej pojawił się nieznanym dla mnie termin „strategia kalibracji”. Proszę o jego wyjaśnienie.
2. Str. 74, wiersz 4; Dlaczego mamy do czynienia z czterema współczynnikami rozcieńczenia roztworu wzorcowego, podczas gdy na rysunku 26 mamy 5 punktów pomiarowych?
3. Dlaczego w przypadku sporządzania roztworów wzorcowych Doktorant operuje jednostkami ng/ml czy  $\mu\text{g/ml}$ , natomiast na wykresach podawane są jednostki  $\mu\text{mol/ml}$  (str. 78), nmol/ml (str. 81), czy mM (str. 84).
4. Dlaczego podczas opracowania procedury oznaczania wybranych związków nie wyznaczono takich parametrów jak: granica wykrywalności czy granica oznaczalności? Wartości te determinują zakres liniowości, który nie może zaczynać się w punkcie (0,0).
5. Na jakiej podstawie dokonywano wyboru zakresu liniowości dla badanych analitów?
6. Dlaczego nie zastosowano innych narzędzi statystycznych (tj.: test U Manna-Whitneya czy analiza czynników głównych), które pozwoliłyby na sklasyfikowanie poszczególnych profili w obrębie badanych próbek?
7. Czy uzyskane wyniki badań są przedmiotem przygotowywanych artykułów naukowych? W zamieszczonym na końcu pracy dorobku naukowym nie odnalazłam żadnej publikacji ani informacji, które świadczyłyby o ich upowszechnieniu. Jedyna wzmianka dotyczy prezentacji posterowych na konferencjach. Oceniana rozprawa doktorska nie posiada pokrycia w publikacjach, co biorąc pod uwagę tematykę budzi pewne zdziwienie tym bardziej, że w ramach konkursu INTER organizowanego przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej (FNP) Doktorant realizował zbieżny tematycznie projekt nt.: *Badania lipidomiczne i genomiczne patofizjologii lipodystrofii indukowanej SQV lekiem przeciw wirusowi HIV z grupy inhibitorów proteazy HIV-1*.
8. Strona 151; wniosek 1 – *Eksperyment in-vitro oraz badania z wykorzystaniem technik chromatograficznych i spektrometrii mas zostały zaplanowane i przeprowadzone popranie na co m. in. Wykazują parametry metodyki opisanej w części metodycznej (np. współczynniki korelacji liniowej – R)*”. Nie można uznać tego za wniosek.

Ogólnie ujmując, oceniana rozprawa doktorska przygotowana została bardzo starannie pod względem redakcyjnym. Formy graficzne (rysunki, tabele) są czytelne,

opatrzone poprawnymi podpisami. Niestety, Doktorant nie uniknął drobnych potknięć językowych używając niewłaściwej nomenklatury, np. izolacja, czytnik spektrofotometryczny (str. 69), nastrzyk (str. 74), kapilara elektrospreju, sprej, koncentrator próżniowy, napięcie stożka, gaz kolizyjny (str. 76, 79), metanian amonu (str. 79) lub sformułowań np.: „*wysuszone do sucha*” (str. 79) czy „*wykres funkcji kalibracyjnej*” (str. 78). Przytoczone powyżej uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej pracy lecz mają w większości charakter pomocniczy i są przyczynieniem do dyskusji. Biorąc pod uwagę, że od wielu lat istnieje *Słownik chromatografii i elektroforezy* (Z. Witkiewicz, J. Hetper), błędów tych można byłoby uniknąć.

Reasumując stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana mgra Kamila Jurowskiego stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego polegające na poszukiwaniu biomarkerów lipodystrofii wywołanej efektem ubocznego działania leku z grupy inhibitorów proteazy HIV-1. Zagadnienia będące przedmiotem rozprawy są aktualne i mają istotne znaczenie zarówno praktyczne dla wyjaśnienia patofizjologii komórek tłuszczowych w badanym modelu lipodystrofii, jak i poznawcze - uzyskano informacje dotyczące składu lipidowego komórek tłuszczowych w stanie fizjologicznym.

W moim przekonaniu opiniowana rozprawa doktorska spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim w świetle obowiązującej *Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22 września 2011 r. w sprawie szczegółowego trybu przeprowadzania czynności w przewodach doktorskim i habilitacyjnym oraz postępowaniu o nadanie tytułu profesora* i wnioskuję do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

R. Gądoła - Kopicuch