

dr hab. n. med. Przemysław Tomasik
Zakład Biochemii Klinicznej,
Wydział Lekarski, Instytut Pediatrii
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

Kraków, 6 czerwca 2018 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Mariusza Fleszara pt.: *„Hepcydyna i wybrane metabolity przemian tlenu azotu w chorobie Alzheimera i otępieniu naczyniopochodnym”*

Celem badań opisanych w rozprawie *„Hepcydyna i wybrane metabolity przemian tlenu azotu w chorobie Alzheimera i otępieniu naczyniopochodnym”* było opracowanie nowych metod wykorzystujących spektrometrię mas do oznaczania hepcydyny i metabolitów szlaku powstawania tlenu azotu w surowicy krwi oraz ocena praktycznego wykorzystania tych metod w diagnostyce pacjentów z otępieniem o różnej patogenezie. Rozprawa doktorska licząca 174 strony powstała w oparciu o badania metodyczne, badania w materiale biologicznym uzyskanym od pacjentów z demencją oraz od krwiodawców jako grupy kontrolnej. Na przeprowadzenie eksperymentów uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu (nr: 367/2017).

Układ pracy jest typowy i przejrzysty.

Wstęp obejmuje 23 strony, na które składa się omówienie: i) patogenezy i dotychczas poznanych, klasycznych mechanizmów prowadzących do rozwoju otępienia oraz predyspozycji genetycznych chorób otępiennych, ii) fizjologicznej i patofizjologicznej roli hepcydyny oraz prekursorów i metabolitów szlaku prowadzącego do powstania tlenu azotu, iii) zasady działania laboratoryjnej spektrometrii mas, oraz iv) możliwości wykorzystania w medycznej diagnostyce, szczególnie w peptydomice i metabolomice tej techniki pomiarowej.

Zawarte we wstępie informacje tworzą adekwatne tło w odniesieniu do szczegółowej problematyki podjętych przez Doktoranta działań badawczych. Wstęp napisany jest poprawnie, bardzo ładnym, fachowym językiem polskim, pojedyncze żargonowe określenia potwierdzają tylko bardzo dobrą znajomość tematu i swobodę wypowiedzi. W wystarczającym stopniu pomaga zrozumieć istotę prezentowanych badań. Widać, że Doktorant znakomicie orientuje się w fachowej literaturze dotyczącej metodyki podjętych badań, jak również w diagnostyce

obrazowej i laboratoryjnej opisywanych zaburzeń otępiennych. Dziesięć zamieszczonych we wstępie schematów i rycin znacząco ułatwia zrozumienie omawianych problemów. Jedyne uwagi dotyczą drobnych błędów formalnych: deregulacja syntezy hepcydyny rzeczywiście prowadzi do zaburzeń homeostazy żelaza, ale zależność ta jest dwukierunkowa i bezpieczniej byłoby użyć określenia towarzyszy. Zdanie „czasowe wysycenie transferyny skutkuje pojawieniem się niezwiązanego żelaza” nie jest zrozumiałe.

Cele pracy, ujęte w dwa podpunkty, opisują precyzyjnie kierunki podjętych przez Doktoranta działań. Punkty te bezsprzecznie uzupełniają się podnosząc wartość założonych badań. Głównym celem badań było opracowanie nowych metod, opartych o spektrometrię mas, oznaczania hepcydyny i prekursorów oraz produktów szlaku prowadzącego do powstania tlenku azotu. Przydatność kliniczną opracowanych metod Doktorant zamierzał ocenić przy użyciu opracowanych przez siebie procedur analitycznych w materiale pobranym od grupy pacjentów z otępieniem. Należy podkreślić, że wybór takiej grupy jest bardzo przemyślany ponieważ ostatnio pojawiły się w piśmiennictwie doniesienia o możliwej roli hepcydyny i związków chemicznych szlaku powstawania tlenku azotu w patogenezie otępienia.

Rozdział **Materialy** precyzyjnie definiuje na 6 stronach maszynopisu badaną populację osób z otępieniem oraz użytą grupę kontrolną. Dane antropometryczne i kliniczne przedstawiono czytelnie w dwóch tabelach. Mam wrażenie, że w tabeli pierwszej pomyłono liczby w drugim i trzecim wersie.

W kolejnym rozdziale zatytułowanym **Metody** Doktorant na 11 stronach opisuje pozyskiwanie materiału, w którym wykonywał oznaczenia, wybrane skale neuroobrazowania i skale ocen zaburzeń funkcji poznawczych, pomocne przy podziale pacjentów z otępieniem na podgrupy, metodę oceny stopnia odżywienia pacjentów, a w kolejnych trzech punktach procedury użyte w opracowywaniu i testowaniu nowych metod oznaczania hepcydyny, argininy, cytruliny, symetrycznej i asymetrycznej dimetyloargininy oraz dimetyloaminy.

Metodyka badań napisana jest bardzo szczegółowo. Obejmuje precyzyjne opisy kolejnych etapów opracowania metody laboratoryjnej – uzyskanie kalibratorów o odpowiednich stężeniach w stosunku do oczekiwanych wyników w próbkach badanych, procedurę przygotowania próbek badanych, ogólne warunki rozdziału badanych analitów przy użyciu spektrometru masowego oraz sposób walidacji metod. Metodykę zamyka precyzyjny opis testów statystycznych zastosowanych do analizy wyników. Zwraca uwagę bardzo bogaty warsztat naukowy użyty do wykonania eksperymentów. Z punktu widzenia techniki wykonanych eksperymentów, praca jest na bardzo wysokim, powiedziałbym na światowym

poziomie. Jednak podział standardowego rozdziału **Materiał i metody** na dwa osobne budzi pewne wątpliwości. A przynajmniej umieszczenie w dziale **Metody** skal neuroobrazowania i oceny zaburzeń funkcji poznawczych. Dane te chyba nie były zbierane przez Doktoranta i powinny raczej mieścić się, w skromniejszej formie, w opisie grupy badanej, w charakterystyce klinicznej.

Doprecyzowania wymaga opisane sposobu postępowania z materiałem biologicznym. Doktorant, jak sam wspomina, pozyskał próbki, w których wykonywane już były analizy. Pytanie czy próbki te były dzielone i do aktualnych badań wykorzystano część, która nie była nigdy rozmrażana, czy oznaczenia wykonywano w pozostałościach, które były już rozmrażane, co w istotny sposób mogłoby wpłynąć na jakość próbek i oczywiście jakość uzyskanych wyników.

Sprzeciw budzi notoryczne używanie przez Doktoranta słowa „upochadnianie” zamiast derywatywacja. Spolszczenie wywodzi od słowa „pochodna” a nie „pochadna”. Tak więc po polsku „upochodnianie”. Na korzyść Doktoranta przemawia fakt, że słowo „upochadnianie” używane jest w podręcznikach Politechniki Gdańskiej oraz w licznych publikacjach, w tym Instytutu Leków, a nawet PAN-u.

Opis wyników pracy, podzielony jest, stosownie do przedstawionych celów dysertacji na 2 główne podrozdziały. Obejmuje 49 stron maszynopisu, które uzupełnione są 24przejrzystymi wykresami oraz 31 prawidłowo skonstruowanymi tabelami.

Pierwsza część szczegółowo prezentuje kolejne próby uzyskania optymalnej metody ilościowego oznaczania hepcydyny oraz substratów i metabolitów szlaku przemian prowadzących do powstania tlenu azotu. W efekcie jako najlepszą metodę wskazano ekstrakcję hepcydyny techniką ciecz-ciecz z wykorzystaniem acetonitrylu jako odczynnika odbiałczającego i oznaczanie stężenia w ekstraktach przy pomocy ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem masowym. Ekstrakcja ww. techniką zapewnia wyjątkowo wysokie wartości odzysku, rzędu 78% co jest ewenementem. W przypadku substratów i metabolitów szlaku przemian prowadzących do powstania tlenu azotu Doktorant opracował metodę ekstrakcji i upochodniania tych związków pozwalającą na jednoczesne i bardzo szybkie, co jest istotne w rutynowej diagnostyce, wykonanie oznaczeń przy użyciu ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem masowym. W istocie część ta stanowi przegląd prób i instrukcję wykonania ww. oznaczeń przy użyciu najlepszej obecnie możliwej metody. W mojej opinii jest to wyjątkowo wartościowa część pracy.

Druga część wyników to prezentacja praktycznego wykorzystania opisanych powyżej metod w grupie pacjentów z otępieniem, głównie chorujących na chorobę Alzheimera.

Doktorant wykorzystując nowo opracowane przez siebie metody przebadł dużą liczbę pacjentów uzyskując ogromną ilość danych. Zostały one wykorzystane w bardzo bogatej analizie badanych parametrów w różnych kombinacjach. Uzyskane wyniki potwierdzają:

- a. Prawidłowo ustawiony zakres pomiarowy opracowanych metod, a w konsekwencji
- b. Użyteczność laboratoryjną opracowanych przez Doktoranta metod ekstrakcji, derywatywacji i oznaczania analitów
- c. Świetną znajomość wskaźników opisujących użyteczność diagnostyczną oznaczanych parametrów
- d. Bardzo dużą biegłość w statystycznej obróbce wyników i w końcu
- e. Użyteczność kliniczną uzyskiwanych, przy pomocy nowo opracowanych metod, wyników, które pozwalają na różnicowanie zaburzeń otępiennych w zależności od ich etiologii

Jedynym zastrzeżeniem może być zbyt duże uproszczenie występujące w tytule jednego z podrozdziałów „Opracowanie metod analizy metabolitów tlenu azotu”. To uproszczenie występuje zresztą w różnych formach w kilku miejscach pracy. Tak naprawdę Autor oznacza metabolity szlaku przemian prowadzących do powstania tlenu azotu jak również substrat dla tego szlaku, czyli argininę.

Dyskusję wyników zawarto na 24 stronach maszynopisu. Rozdział ten poświęcono omówieniu własnych wyników Doktoranta oraz ich porównaniu z informacjami pochodzącymi ze światowego piśmiennictwa. Jest on napisany w sposób logiczny, wyczerpujący i poprawny, a momentami nawet w sposób erudycyjny. Umiejętność doboru poszczególnych pozycji literatury, sposób ich cytowania oraz wyciągane w trakcie dyskusji oraz w podsumowaniu wnioski świadczą o dobrym opanowaniu warsztatu naukowego oraz o dogłębnej wiedzy fachowej Doktoranta.

Można śmiało stwierdzić, że są to badania, a przynajmniej ich część metodyczna na najwyższym światowym poziomie. Z przeprowadzonych oznaczeń wynika, iż przy użyciu parametrów biochemicznych takich jak hepcydyna, arginina i metabolity szlaku prowadzącego do powstania tlenu azotu można zróżnicować otępienie naczyniopochodne od choroby Alzheimera. Jednak pełna analiza przydatności klinicznej tych oznaczeń, jak sam Autor zauważył w dyskusji, jest ograniczona ze względu na dobór grupy kontrolnej oraz brak pełnych danych klinicznych o

osobach zakwalifikowanych do tej grupy. Autor precyzyjnie charakteryzuje kliniczną użyteczność omawianych parametrów, jednak w zakresie diagnostyki pacjentów z postawionym już rozpoznaniem. Godne podkreślenia jest, że wnioski płynące ze wspomnianych rozważań wyznaczają ciekawe obszary dla kontynuacji tych badań naukowych. Mianowicie bardzo interesująca byłaby prospektywna ocena badanych w omawianej dysertacji parametrów jako markerów prognostycznych, wczesnego wykrywania zaburzeń otępiennych, zanim ujawnią się kliniczne czy radiologiczne objawy choroby. Takie testy można by zastosować jako badania przesiewowe.

Wnioski. Osiem wniosków odzwierciedla złożony charakter badań Autora. Wnioski wynikają z wnikliwej analizy popartej właściwą argumentacją zawartą w przeprowadzonej wcześniej dyskusji i podsumowaniu wyników badań. Są one logiczne i poznawcze, a także koherentne z założeniami i celami postawionymi na początku pracy. W mojej opinii najbardziej istotne są te, które dotyczą możliwości zróżnicowania przyczyn choroby otępiennej przy użyciu badanych przez Autora parametrów biochemicznych.

Dysertację doktorską zamyka streszczenie w języku polskim oraz angielskim, spis rycin i tabel oraz wykaz piśmiennictwa liczący 319 pozycji, adekwatnie dobranych w kontekście omawianych zagadnień. Zawiera on prace aktualne, a także nie pomija istotnych pozycji historycznych. Doktorant powinien był dołożyć nieco więcej staranności, aby do końca utrzymać wysoki poziom swojej monografii, ponieważ w paru miejscach (cytowania nr 24, 81, 97, 98, 133, 202, 227, 234) brak jest tytułu czasopisma, a dodatkowo sporadycznie pojawiają się błędy w zapisie autorów prac, skrótach tytułów czasopism itp.

Reasumując, imponujący jest ogrom pracy, jaki Doktorant włożył w swoje badania, a także wartość naukowa przedstawionych wyników. Praca bez wątpienia zasługuje na wyróżnienie.

Przedstawiona rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.), a nawet znacznie je przekracza, w związku z tym, z przyjemnością, przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie mgr Mariusza Fleszara do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

3765589
dr hab. Przemysław Tomasik
pediatra, Spec. diagnostyki laboratoryjnej
Kraków, ul. Skwerowa 46
tel. 887 729 907