



Gdańsk, 2017-07-30

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. JAGODY JÓŻWIK-PRUSKIEJ zatytułowanej

**„Oznaczanie wybranych metabolitów w moczu dzieci autystycznych z wykorzystaniem
metod chromatograficznych”**

Autyzm jest zaburzeniem lub zespołem zaburzeń neurorozwojowych, który charakteryzuje się nieprawidłowościami w sferach funkcjonowania człowieka: interakcji społecznych, komunikacji oraz występowaniem ograniczonych wzorców zachowania i aktywności. Dostępne dane literaturowe nie pozostawiają wątpliwości, że częstość występowania autyzmu w ostatnich kilkunastu latach wyraźnie rośnie. W Polsce liczbę osób dotkniętych autyzmem szacuje się na ok. 30 tysięcy a wg Głównego Urzędu Statystycznego w roku 2010 dzieci autystyczne stanowiły 4,3% uczniów niepełnosprawnych w szkołach podstawowych. Współcześnie, autyzm wykrywany jest głównie na podstawie obserwacji zachowań dziecka, co na wczesnym etapie rozwoju jest stosunkowo trudne i może być obarczone subiektywną oceną. Zastosowanie analizy z wykorzystaniem metod chromatograficznych do oznaczania konkretnych związków małowcząsteczkowych, metabolitów, czy całych profili metabolomicznych w moczu może być pomocnym narzędziem

umożliwiającym odpowiednio wczesną identyfikację dzieci wysokiego ryzyka a w konsekwencji umożliwić skuteczne działania terapeutyczne.

Oceniana praca doktorska mgr inż. Jagody Jóźwik-Pruskiej wykonana pod kierunkiem profesor Politechniki Łódzkiej dr hab. inż. Joanny Kałużnej-Czaplińskiej w Instytucie Chemii Ogólnej i Ekologicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej jest bardzo dobrym i cennym przykładem kompleksowego podejścia do badań złożonych procesów biologicznych.

Przedstawiona praca jest podsumowaniem badań Autorki nad ilościowym oznaczaniem trzech wybranych metabolitów, β -kazomorfiny, tryptofanu i 6-metoksyharmalanu w moczu dzieci chorych na autyzm a także poszukiwania zależności pomiędzy oznaczonymi poziomami związków a parametrami epidemiologicznymi takimi jak płeć, BMI, wiek ze szczególnym uwzględnieniem diet suplementacyjnych. Praca doktorska zrealizowana we współpracy z ośrodkiem NAVICULA Centrum Diagnostyki i Terapii Autyzmu w Łodzi jest też bardzo dobrym przykładem współpracy między uczelnią a instytucją ochrony zdrowia, w której ostateczne korzyści nastawione są na poprawę zdrowia chorych dzieci. Wyniki badań Doktorantki zostały opublikowane w renomowanych czasopismach takich jak: *Journal of Chromatography B* (5-letni Impact Factor 2,729), *Trends in Analytical Chemistry* (IF_{5Y} = 7,474), *Biomedical Chromatography* (IF_{5Y} = 1,729), *Critical Reviews in Analytical Chemistry* (IF_{5Y} = 2,576), *Trends in Food Science and Technology* (IF_{5Y} = 6,695) i *Metabolic Brain Disease* (IF_{5Y} = 2,525). Uzyskane wyniki badań zawarte w pracy doktorskiej były także prezentowane na krajowych i międzynarodowych sympozjach specjalistycznych. Dysertacja potwierdza dobrą wiedzę i umiejętności kandydatki do stopnia naukowego doktora nauk chemicznych.

Rozprawa doktorska mgr inż. Jagody Jóźwik-Pruskiej jest niezwykle obszerna, obejmuje bowiem aż 200 stron. Część teoretyczna, zajmuje około 60 stron i zawiera bardzo szczegółowe informacje dotyczące badanej problematyki. Kompleksowo zostały opisane

zagadnienia związane z autyzmem jak m.in.: definicje autyzmu, jej przyczyny i występowanie, objawy oraz zaburzenia współwystępujące w autyzmie, znane i stosowane narzędzia diagnostyczne stosowane we wczesnym rozpoznaniu autyzmu oraz przykładowe terapie stosowane w autyzmie. Osobno został także opisany biochemiczny szlak serotoninowy oraz jego potencjalna rola w autyzmie. Na zakończenie tej części dysertacji Autorka przedstawiła zwięzłe informacje na temat zastosowania technik chromatograficznych w badaniach pacjentów z zaburzeniami autystycznymi ze szczególnym uwzględnieniem technik chromatograficznych łączonych ze spektrometrią mas.

Cel pracy został zwięzłe i jasno przedstawiony a realizacja głównego celu została szczegółowo rozpisana na konkretne zadania badawcze obejmujące m.in: opracowanie metod analitycznych umożliwiających oznaczanie β -kazomorfiny i 6-metoksyharmalanu w próbkach moczu z zastosowaniem techniki HPLC; oznaczanie tryptofanu w próbkach moczu z wykorzystaniem GC-MS; wielowymiarową analizę statystyczną.

Część doświadczalna napisana jest bardzo dokładnie i z uwzględnieniem kolejnych aspektów pracy eksperymentalnej jak m.in.: pobieranie próbek rzeczywistych do badań; przygotowanie próbek do badań; zastosowana metodyka rozdzielania i oznaczania wybranych metabolitów przy użyciu metod chromatograficznych; wybór i zastosowanie testów statystycznych. Omówienie wyników i ich dyskusja są napisane szczegółowo i bardzo rzetelnie. Udokumentowane zostały w 38 tabelach, na 54 rycinach i 6 schematach. Doktorantka wykazała się wiedzą z zakresu analizy danych oraz biochemii, którą z powodzeniem wykorzystwała w dyskusji otrzymanych wyników. Na piśmiennictwo trafnie dobrane i umieszczone w pracy składa się aż 350 (!) pozycji literaturowych co świadczy o tytanicznej wręcz pracy Autorki rozprawy.

Niewątpliwymi osiągnięciami Doktorantki opisanymi w rozprawie jest opracowanie odpowiednio czułych i selektywnych metod jakościowego i ilościowego oznaczania

β -kazomorfiny i 6-metoksyharmalanu z użyciem techniki HPLC w próbkach moczu dzieci autystycznych oraz zastosowanie narzędzi statystycznych do oceny poziomu tych metabolitów i istniejących zależności z parametrami klinicznymi chorych. Podobnie wymienić należy monitorowanie stężeń tryptofanu w populacji dzieci chorych na autyzm i ocena poziomów tryptofanu w zależności od zastosowanej suplementacji. Interesujący jest wynik analiz tryptofanu w populacji badanych dzieci i jego porównanie do danych zawartych w bazie Human Metabolome Database (HMD). Wreszcie najcenniejszym wnioskiem z przeprowadzonych badań, jak postuluje Autorka, jest wykazanie obecności 6-metoksyharmalanu w populacji osób chorych na autyzm i braku jego występowania w grupie kontrolnej osób zdrowych co mogłoby mieć znaczenie etiopatologiczne po potwierdzeniu w kolejnych badaniach.

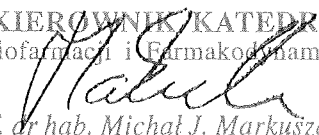
Praca doktorska mgr inż. Jagody Jóźwik-Pruskiej jest bardzo wartościowa badawczo i ma niewątpliwe walory praktyczne. Chcąc być jednak rzetelnym recenzentem, muszę zwrócić jeszcze uwagę na następujące aspekty pracy. W części teoretycznej w rozdziale dotyczącym przyczyn występowania autyzmu na str. 42 powinno być: „Uważa się, że ekspozycja na niektóre z tych związków, ...”. Nie można wszystkim ksenobiotykom przypisywać roli związków neuropatologicznej a tylko konkretnym o udowodnionej toksyczności. Należy też być bardzo ostrożnym w stwierdzeniach, takich jak na str. 59, a dotyczących potencjalnej roli melatoniny w procesach nowotworowych. Praca doktorska wymaga od autora szczególnej uwagi w przedstawianiu aktualnego stanu wiedzy naukowej tak aby postronni czytelnicy mieli pewność, że przedstawione w niej informacje nie budzą wątpliwości czy kontrowersji w świecie naukowym. Do takich naukowo kontrowersyjnych zaliczyłbym tezę przedstawioną na str. 59 o coraz częściej postulowanej roli melatoniny w zapobieganiu i leczeniu chorób nowotworowych. W części doświadczalnej pracy czy rozważając wyniki analiz z zastosowaniem SPE wzięto pod uwagę efekt prekoncentracji (zateżania) próbki jaki może stać za wyglądem piku β -kazomorfiny na chromatogramie przedstawionym na rys. 14? W tabeli

17 przedstawiono zestawienie parametrów chromatograficznych co jest przydatne, ale cennym byłoby umieszczenie również informacji dotyczącej sprawności analiz w postaci szerokości pików czy wysokości pól teoretycznych. Czy czasy retencji analitu w tabeli 17 odnoszą się do izokratycznego czy gradientowego typu analiz? W walidacji metod analitycznych nie ma informacji o tym jak przygotowane były roztwory podstawowe (jakie medium)? Na ilu próbkach wykonane były badania stabilności i czy były to próbki tzw. „spoolowane”? Przedstawiono w pracy wyniki badania stabilności dla przechowywania w lodówce przez okres 1 tygodnia a zgodnie ze schematem 5 badania prowadzono także przechowując próbki w zamrażarce. Jakie były wyniki testów zamrażania? Brak jest w pracy informacji, chociażby przybliżonych o sposobie prowadzonej suplementacji wśród dzieci (jaka dawka, jak często podawana i przez jaki okres). To może mieć istotne znaczenie dla analiz wyników badań moczu w grupie z i bez suplementacji. W przypadku wszystkich wniosków z analiz statystycznych porównujących populacje dzieci chorych, którym podawano suplementację oraz tych bez suplementacji jest problem nierównej liczności grup. Najczęściej grupa dzieci z suplementacją diety jest znacząco niższa niż ta nieprzyjmująca suplementacji: w przypadku analiz β -kazomorfiny to 15 vs 122 dla witamin z grupy B i Mg oraz 29 vs 108 dla kwasów omega-3; w przypadku oznaczania tryptofanu to 19 vs 217 dla witamin z grupy B i Mg oraz 45 vs 191 dla kwasów omega-3; a w badaniu 6-metoksyharmalanu to 9 vs 123 dla witamin z grupy B i Mg, 32 vs 100 dla kwasów omega-3 i tylko 3 vs 129 dla melatoniny. Tak duże różnice w liczności grup stwarzają pewien problem w obliczeniach statystycznych, zwiększając ryzyko niewłaściwej interpretacji zarówno w kierunku możliwego braku zależności jak i jej występowania (*vide* porównanie β -kazomorfiny w grupie chorych i zdrowych na str.118). Autorka zdaje sobie chyba sprawę z tej kwestii, co jest odnotowane w przypadku porównania wyników 6-metoksyharmalanu i suplementacji melatoniną (str. 149). Nie mniej ten sam problem istnieje w przypadku pozostałych porównań i pytanie jest, czy Doktorantka próbowała zastosować inne metody obliczeniowe bądź podejścia statystyczne, aby potwierdzić albo

zweryfikować uzyskane wnioski. Jaki był wzorzec wewnętrzny w oznaczeniach tryptofanu metodą GC-MS (str. 125-127)?

Powyższe uwagi i pytania nie wpływają na wartość merytoryczną pracy, którą oceniam bardzo wysoko. Praca doktorska pani mgr inż. Jagody Józwik-Pruskiej ma istotne walory oryginalności naukowej. Jest połączeniem wiedzy i umiejętności chemika analityka z aplikacyjnym nastawieniem na metodykę badań bioanalitycznych. Przygotowanie Doktorantki w zakresie analizy chemicznej, jakościowej i ilościowej, budzi uznanie jak również umiejętna analiza uzyskanych wyników i wyważona interpretacja biochemiczna.

Biorąc powyższe pod uwagę oraz fakt spełnienia wymagań ustawowych wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej o dopuszczenie mgr inż. Jagody Józwik-Pruskiej do publicznej obrony tez przedstawionych w dysertacji.

KIEROWNIK KATEDRY
Biofarmacji i Farmakodynamiki

prof. dr hab. Michał J. Markuśzewski