

Recenzja rozprawy doktorskiej pana **Piotra Sosnowskiego** „*Obrazowanie tkanek metodą spektrometrii mas MALDI-MSI*”.

Praca dotyczy nowatorskiej metody badawczej – obrazowania molekularnego z wykorzystaniem spektrometrii mas, która w ostatnich latach zdobywa ogromne zainteresowanie w obszarze nauk biomedycznych. Metoda ta umożliwia połączenie wiedzy o profilu molekularnym preparatu z informacją o jego strukturze przestrzennej (np. morfologii i histologii w przypadku badań na materiale tkankowym). Dla uzyskania pożądaných wyników niezbędne jest tu jednak opracowanie optymalnej metodologii badawczej, która musi być czasami precyzyjnie dopasowane do typu analizowanego materiału.

Przedmiotem rozprawy doktorskiej było opracowanie i zoptymalizowanie kolejnych etapów metodologii doświadczenia MALDI-IMS (w tym przygotowania preparatu biologicznego i metody nanoszenia chemicznej matrycy), oraz przetestowanie opracowanej metodologii w trakcie analizy profilu peptydów w trzech typach tkanek szczura: mózgu, serca i przysadki. Wybrana tematyka projektu była w pełni oryginalna, a wyniki projektu mogą być zastosowane w praktyce.

Przedstawiona rozprawa doktorska składa się z sześciu głównych części: (1) Cel pracy, (2) Przegląd literatury, (3) Część eksperymentalna, (4) Badania własne, (5) Podsumowanie, (6) Literatura cytowana. Ponadto, wyniki badań stanowiących część doktoratu (analiza peptydów przysadki) zostały opublikowane w formie oryginalnej pracy naukowej, której pierwszym autorem jest Doktorant (Sosnowski P, Zera T, Wilenska B, Szczepanska-Sadowska E, Misicka A: Imaging and identification of endogenous peptides from rat pituitary embedded in egg yolk. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2015;29:327-35).

W rozdziale 1 (Cel pracy) Doktorant zwięźle przedstawia szczegółowe cele projektu i uzasadnia ich wybór. Uwaga: wydaje się, że w tym rozdziale niepotrzebnie została przedstawiona szczegółowa informacja na temat zwierząt wykorzystywanych w projekcie – lepszym miejscem na przedstawienie tych informacji byłby rozdział 3 (przy opisie metod badawczych).

Rozdział 2 (Przegląd literatury) stanowi tzw. wstęp teoretyczny, w którym Doktorant zwięźle przedstawił podstawowe informacje na tematy mające bezpośredni związek z przedmiotem

pracy. Ten rozdział liczy 28 stron i zawiera 9 rysunków i 6 tabeli dobrze ilustrujących omawiane zagadnienia. Uwagi:

- 1) chociaż generalnie rozdział napisany jest poprawnym językiem, doktorant nie ustrzegł się kilku błędów terminologicznych, niezręcznych sformułowań czy używania żargonu laboratoryjnego, przykładowo: „nowotwór kolczystokomórkowy głowy i karku” (str. 30; powinno być „rak płaskonabłonkowy głowy i szyi”), „co powoduje desorbcję cząsteczki z tkanki z jednoczesnym zapisem informacji co do dystrybucji sygnału” (str. 7) czy „kokrystalizują” (str. 13),
- 2) Rysunek 5 nie jest dobrą ilustracją zasady działania reflektromu – schemat sugeruje, że do detektora jednocześnie docierają różne jony, co nie jest prawdą.

W rozdziale 3 (Cześć eksperymentalna) doktorant opisuje metody badawcze wykorzystane w pracy. Przedstawione opisy są wystarczające i umożliwiają odtworzenie przeprowadzonych doświadczeń.

W rozdziale 4 (Badania własne) Doktorant opisuje wyniki przeprowadzonych badań. Rozdział liczy 50 stron, oraz zawiera 6 tabel i 51 rysunków (te ilustracje stanowią podstawową treść tego rozdziału). Badania przeprowadzone przez Doktoranta umożliwiły opracowanie optymalnego składu i metody nanoszenia chemicznej matrycy, co zostało podsumowane w Tabeli 6. Metodyka opracowana przez Doktoranta została następnie wykorzystana do przeprowadzenia analizy MALDI-IMS endogennych peptydów obecnych w preparatach szczurzego mózgu, serca i przysadki. Najbardziej oryginalnym i naukowo cennym fragmentem badań Doktoranta była analiza profilu peptydów przysadki szczura. Najciekawszym wynikiem przedstawionym w pracy doktorskiej jest w mojej opinii wykazanie obecności w przysadce zmodyfikowanego fragmentu endorfiny zawierającego w pozycji 26 alaninę. Szczegółowa analiza składu peptydów była możliwa dzięki przeprowadzeniu fragmentacji *in situ* jonów molekularnych, co w metodzie MALDI-IMS zawsze stanowi spore wyzwanie dla eksperymentatora. Sukces w przeprowadzeniu tych doświadczeń dobrze świadczy o kompetencjach i umiejętnościach Doktoranta. Potwierdzeniem wysokiej jakości naukowej tego elementu pracy doktorskiej jest publikacja wyników w postaci oryginalnej pracy naukowej.

Uwagi: W rozdziale Badania własne Doktorant przyjął koncepcję, zgodnie z którą w każdym podrozdziale zawarte jest wprowadzenie (rodzaj wstępu teoretycznego uzasadniającego

podjęcie tematu), przedstawienie wyniku i omówienie jego znaczenia. W mojej opinii jest to wybór dyskusyjny – „wprowadzenie” pokrywa się z zawartością „Przeglądu literatury”, a omówienie znaczenia uzyskanych wyników mogłoby być treścią odrębnego, obecnie nie istniejącego rozdziału „Dyskusja” (bo trudno za taki uznać podrozdziały 3.5.4 czy 3.6.5). Natomiast samo przedstawienie i omówienie uzyskanych wyników (szczególnie w części dotyczącej analizy mózgu i serca) jest zbyt lakoniczne i pozostawia szereg niedomówień (np. brak odniesień do Rysunków 20, 22 i 23). Inne uwagi:

- 3) legenda rycin jest zbyt lakoniczna i nie zawsze pozwala na zrozumienie przedstawionych wyników, np. co przedstawia dolny i górny spektrogram na Rysunku 19?
- 4) przedstawione spektrogramy mają zbyt dużą rozdzielczość, co utrudnia odczytanie wartości liczbowych; w przypadku porównania widma średniego z różnych obszarów serca (Rysunek 27) przedstawione widma powinny mieć tę samą skalę i zakresu m/z (przynajmniej ich części wspólne);
- 5) sformułowanie „zatonienie tkanki w formalinie” (str. 71) i „usuwanie formaliny poprzez kąpiele w ksylenie” jest oczywistym błędem rzeczowym – w przypadku preparatów FFPE, które zapewne ma na myśli Doktorant chodzi o zatonienie w lub usunięcie parafiny;
- 6) niektóre podrozdziały w rozdziale 4 mają błędną numerację (dotyczy podrozdziałów 3.5 i 3.6);
- 7) zawarte w podrozdziale 3.6.5 konkluzje na temat porównania wyników analizy MALDI-IMS *in situ* oraz analizy ekstraktów tkankowych naniesionych na płytkę MALDI są nieporozumieniem – podstawową zaletą ekstraktów tkankowych jest możliwość ich wykorzystania w innych typach analiz (np. LC-MS), o czym Doktorant nie wspomina.

W rozdziale 5 (Podsumowanie) Doktorant skrótowo przedstawia cechy metod badawczych wykorzystanych w pracy, oraz podsumowuje uzyskane wyniki i możliwe wykorzystanie praktyczne. W mojej opinii pierwsza część tego rozdziału jest w tym miejscu pracy doktorskiej „nadmiarowa”, a samo podsumowanie zyskałoby na czytelności gdyby Doktorant w punktach przedstawił swoje najważniejsze osiągnięcia.

Rozdział 6 (Literatura cytowana) dane bibliograficzne cytowanych prac. Autor odnosi się do 131 rozsądnie dobranych źródeł, które dobrze dokumentują zagadnienia omawiane w pracy.

Podsumowanie.

Recenzowana praca doktorska dotyczy interesującego zagadnienia o sporym znaczeniu praktycznym. Praca jest dobrze zaplanowana i kompetentnie zrealizowana. Co ważne, praca zawiera bardzo istotny element biologiczny, wymagający od Doktoranta uzyskania swoistej wiedzy i umiejętności. Uważam, że Doktorant wykazał się samodzielnością i umiejętnościami praktycznymi pozwalającymi na uzyskanie oryginalnych i wartościowych wyników w nowej dla Niego dziedzinie nauki. Tak więc pomimo wymienionych wyżej uwag krytycznych pozytywnie oceniam rozprawę doktorską pana Piotra Sosnowskiego.

Wniosek końcowy:

W mojej opinii przedstawiona rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 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, pos.595 z późn. zm.).

W związku z tym wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o kontynuowanie postępowania o nadanie panu Piotrowi Sosnowskiemu stopnia doktora.



prof. dr hab. Piotr Widłak

Centrum Onkologii - Instytut, Gliwice

31 grudnia 2015

Prof. dr hab. Zbigniew Szewczuk
Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
tel.: +48-71-3757212
e-mail: zbigniew.szewczuk@chem.uni.wroc.pl

Wrocław, 2016-01-07

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr. Piotra Sosnowskiego
pt: „Obrazowanie tkanek metodą spektrometrii mas
MALDI-MSI”

Obrazowanie tkanek z wykorzystaniem spektrometrii mas (MSI) jest nowoczesną metodą diagnostyczną pozwalającą badać dystrybucję przestrzenną różnego rodzaju cząsteczek w badanym skrawku tkanki. W metodzie tej zazwyczaj stosuje się spektrometry mas wykorzystujące "miękką" metodę jonizacji laserowej wspomaganą matrycą (MALDI), umożliwiającą analizę różnych biopolimerów, w tym peptydów i białek. Najważniejszymi zaletami MALDI-MSI jest wysoka czułość i selektywność pomiaru mas jonowych. W przeciwieństwie do innych metod obrazowania, MSI umożliwia jednoczesną analizę wielu biomarkerów molekularnych różniących się masą cząsteczkową. Należy więc oczekiwać, że w niedługim czasie metoda ta stanie się jedną z podstawowych metod diagnozowania preparatów tkankowych. Niestety, stosunkowo mała powtarzalność wyników otrzymanych w różnych laboratoriach badawczych każe przypuszczać, że współcześnie stosowane techniki MSI są jeszcze ciągle niedoskonałe, wymagają dopracowania i ujednoczenia ich procedur.

Dlatego w wielu ośrodkach badawczych na świecie prowadzi się intensywne badania nad udoskonalaniem metodologii MSI w zakresie przygotowania próbek i przeprowadzania analizy, w sposób umożliwiający ich powszechne wykorzystanie w diagnostyce medycznej. W badania te włączył się mgr Piotr Sosnowski, który w ramach swojej pracy doktorskiej przeprowadził serię dobrze zaplanowanych badań poświęconych opracowaniu warunków obrazowania peptydów w tkankach zwierzęcych metodą MALDI-MS. Tematykę badawczą przedstawioną w pracy doktorskiej autorstwa mgr. Piotra Sosnowskiego uważam za bardzo aktualną i ciekawą oraz posiadającą potencjalne walory użytkowe. Recenzowana praca została wykonana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego pod kierunkiem

prof. dr hab. Aleksandry Misickiej-Kęsik, która jest niekwestionowanym autorytetem w dziedzinie chemii peptydów.

Rozprawa obejmuje 111 stron wraz z bibliografią. Składa się z *wykazu skrótów* (2 strony), *celu pracy* (2 strony), *przeglądu literatury* (40 stron), *badania własnych* (51 stron), *podsumowania* (4 strony). Rozprawę kończy *literatura cytowana*. Układ rozprawy jest więc typowy dla prac chemicznych, a proporcje poszczególnych rozdziałów są odpowiednie dla rozpraw doktorskich. Brakować może jedynie streszczenia rozprawy.

Celem recenzowanej rozprawy było opracowanie warunków obrazowania endogennych peptydów w tkankach wybranych narządów szczura metodą MALDI-MSI. Realizacja tego zadania wymagała od Doktoranta opracowania i optymalizacji zarówno metody przygotowania materiału biologicznego jak i nanoszenia matrycy na badane preparaty z wykorzystaniem drukarki chemicznej oraz samego obrazowania tkanek za pomocą spektrometru mas MALDI-TOF. W mojej opinii cel oraz zakres pracy został przedstawiony prawidłowo i jest zgodny z tematem rozprawy. Z kolejnych rozdziałów wynika, że Doktorant dysponuje wiedzą na temat spektrometrii mas i obrazowania tkanek, a podjęte przez Niego zadania badawcze zostały zrealizowane w sposób racjonalny i konsekwentny.

W *przeglądzie literaturowym* rozprawy (bazującym na 131 pracach naukowych) Autor omówił sposób pobierania tkanek, ich obróbkę oraz metody aplikacji matrycy, oraz przedstawił podstawowe informacje na temat metod jonizacyjnych stosowanych w MSI i analizatorach mas. Następnie skupił się na metodach fragmentacji peptydów. Informacje zawarte w tej części rozprawy zostały omówione krótko i w sposób bardzo prosty. Miejscami jednak zbyt uproszczone opisy działania spektrometrów mas prowadzą do niejednoznaczności (np. opis działania analizatorów ICR na str. 24). Osobny rozdział Autor poświęcił wybranym przykładom zastosowania MALDI-MSI. W mojej opinii przegląd literaturowy bardzo dobrze przygotowuje czytelnika do zrozumienia złożoności metodologii MALDI-MSI i potrzeby ich udoskonalania.

W rozdziale *Część eksperymentalna* Doktorant przedstawił stosowaną aparaturę i materiały, a następnie przedstawił zoptymalizowane procedury nadruku matrycy, oplukiwania tkanek oraz obrazowania peptydów i białek w badanych tkankach. Należy sądzić, że czynności przygotowawcze i eksperymenty chemiczne zostały prawidłowo zaprojektowane i starannie wykonane.

Z dalszych części rozprawy wynika, że Doktorant osiągnął zamierzone cele badawcze: przeprowadził optymalizację procedury nadruku matrycy i opłukiwania tkanek. Następnie wykorzystał uzyskane wyniki do opracowania metody i przeprowadzenia obrazowania peptydów oraz białek w skrawkach szurzego mózgu, przysadki mózgowej i serca oraz analizował ekstrakty z przysadki. Zastosowana metoda pozwoliła na zidentyfikowanie licznych peptydów w badanych tkankach.

Ważnym sukcesem mgr. Sosnowskiego było zastosowanie żółtka jaja kurzego do osadzenia skrawka przysadki mózgowej na płytce. Okazało się, że żółtko nie powoduje efektu delokalizacji cząsteczek, a zawarte w nim naturalne lipidy nie interferują z analizowanymi peptydami. Z dużym uznaniem odnoszę się do tego odkrycia i uważam, że metodę zaproponowaną przez mgr. Sosnowskiego będzie można z powodzeniem wykorzystać do obrazowania różnorodnych tkanek zwierzęcych i ludzkich. Można oczekiwać, że w przyszłości zaproponowana przez mgr. Sosnowskiego metoda będzie wykorzystana do porównywania profili molekuł u osobników zdrowych i chorych, co umożliwi odkrycie markerów chorobowych.

Innym ważnym osiągnięciem mgr. Sosnowskiego było wykorzystanie drukarki chemicznej ChIP-1000 do nakładania matrycy na badaną tkankę, co pozwoliło na skuteczną ekstrakcję cząsteczek peptydów z materiału odzwierzęcego i wzrost intensywności sygnału warunkujący powtarzalne sekwencjonowanie metodą MS/MS.

Niewątpliwie, ocena wartości naukowej i niezawodności zaproponowanych metod powinna uwzględniać powtarzalność otrzymanych wyników. Dlatego przydatna byłaby informacja dotycząca ilości przeprowadzonych analiz i porównanie uzyskanych wyników. Piki odpowiadające jonom białkowym są bardzo szerokie. Dlatego trudno wyciągnąć jednoznaczne wnioski z uzyskanych widm masowych. Należy jednak podkreślić, że Autor zdaje sobie sprawę z niedoskonałości stosowanych metod, czego wyraz dał w krytycznej interpretacji uzyskanych wyników i proponowanych rozwiązaniach. Świadczy to o dojrzałości naukowej Doktoranta.

Recenzowana rozprawa została napisana w sposób przystępny. Na uwagę zasługują estetycznie wykonane rysunki i wykresy. W tekście *Rozprawy* znalazłem stosunkowo niewiele błędów i braków. Z obowiązku recenzenta przytoczę kilka wybranych uwag:

- Autor podał na widmach masowych wartości m/z z bardzo dużą dokładnością - do czterech miejsc po przecinku. W mojej opinii nie jest zasadne podawanie tak

dokładnych wartości, które zostały odczytane z bardzo szerokich pików (np. wartość m/z 48061.4733 przedstawiona na widmie na rysunku 27).

- Nie rozumiem sensu podania w tabeli 7 wartości "[M+H]⁺" dla jonów posiadających ładunek 2+.
- Trudno zgodzić się z informacją na temat ECD podaną na str. 26: "Jednakże w przeciwieństwie do CID, znacznie większa ilość wiązań ulega rozpadowi co powoduje uzyskanie trudniejszego w interpretacji, ale zawierającego więcej informacji widma fragmentacyjnego."
- Nie wszystkie stosowane skróty zostały umieszczone w Wykazie na str. 1-3 (np. "FWHM"), a niektóre (np. "żywicę OCT" na str. 12) wyjaśniono niezrozumiale. Z drugiej strony niepotrzebnie umieszczono w nim wzór chemiczny chloroformu.

Należy jednak podkreślić, że powyższe mankamenty nie mają istotnego wpływu na poziom merytoryczny pracy.

Pan mgr Sosnowski jest współautorem dwóch prac opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Należy podkreślić, że w jednej z tych publikacji (opublikowanej w *Rapid Commun. Mass Spectrom.*) Piotr Sosnowski jest pierwszym autorem, co dowodzi Jego wiodącej roli w przeprowadzonych badaniach. Ponadto Doktorant jest współautorem patentu i zgłoszenia patentowego oraz siedmiu komunikatów konferencyjnych. O wysokiej jakości prezentacji konferencyjnych świadczy przyznanie mgr. Piotrowi Sosnowskiemu trzech nagród za zajęcie I miejsca w konkursach na najlepszy komunikat oraz jedno stypendium konferencyjne. W mojej opinii, dorobek naukowy Doktoranta w pełni odpowiada wymaganiam stawianym pracom doktorskim. Należy też dodać, że Pan mgr Sosnowski odbył krótkoterminowy staż naukowy STSM w ramach europejskiego systemu kooperacji nauki i technologii COST, na Uniwersytecie Wiedeńskim.

Podsumowując moją recenzję stwierdzam, że pracę doktorską mgr. Piotra Sosnowskiego oceniam pozytywnie. Autor wykazał się dużą wiedzą z zakresu chemii oraz metod obrazowania za pomocą spektrometrii mas peptydów i białek preparatów zwierzęcych. Opisane w rozprawie eksperymenty chemiczne zostały przeprowadzone poprawnie. W pracy przedstawiono wiele wartościowych wyników, które wnoszą istotny wkład w metodologię obrazowania tkanek. Założone cele pracy zostały osiągnięte. Dorobek naukowy mgr. Piotra Sosnowskiego odpowiada wymaganiam stawianym kandydatom do stopnia naukowego doktora nauk chemicznych.

Wobec powyższego stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr. Piotra Sosnowskiego pt. „Obrazowanie tkanek metodą spektrometrii mas MALDI-MSI” spełnia wymagania określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami) i wnoszę o dopuszczenie mgr. Piotra Sosnowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.