

# **Autoreferat**

dr n. med. Maciej Suski

Katedra Farmakologii  
Wydział Lekarski  
Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum

Kraków, 2019

### 1. Imię i Nazwisko:

Maciej Suski

### 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

- 2007 – 2011      Studia Doktoranckie na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum;  
Promotor: Prof. dr hab. Ryszard Korbut;  
Dyplom doktora nauk medycznych – luty 2012;  
Rozprawa doktorska pt: „Zmiany w proteomie mitochondriów wątroby i nerek w przebiegu miażdżycy – badania z użyciem mysiego modelu apoE-knockout” (wyróżnienie *summa cum laude*)
- 2002 – 2007      Studia Magisterskie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego;  
Opiekun naukowy: Prof. dr hab. Ryszard Korbut;  
Dyplom magistra – czerwiec 2007;

### 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

- 2008 – obecnie      Katedra Farmakologii Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum, początkowo jako pracownik naukowo – techniczny, a od października 2015 roku jako adiunkt
- 2012 – 2015      Ośrodek Genomiki Medycznej OMICRON Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum jako adiunkt

### 4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego: **cykl prac** pod tytułem:

**„Kinaza aktywowana AMP (AMPK) w chorobach cywilizacyjnych.  
Wykorzystanie metod proteomiki w odkrywaniu nowych mechanizmów schorzeń i markerów ich farmakologicznej korekty.”**

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy),

1. **Suski M, Kiepus A, Wiśniewska A, Kuś K, Skalkowska A, Stachyra K, Stachowicz A, Gajda M, Korbut R, Olszanecki R. Anti-atherosclerotic action of GW9508 - free fatty acid receptors activator – in apoE-knockout mice. 2019, Pharmacol Rep., DOI: 10.1016/j.pharep.2019.02.014 Impact Factor: 2.787; MNiSW: 25**
2. **Suski M, Wiśniewska A, Stachowicz A, Olszanecki R, Kuś K, Białas M, Madej J, Korbut R. The influence of AICAR - direct activator of AMP-activated protein kinase (AMPK) - on liver proteome in apoE-knockout mice. 2017, Eur J Pharm Sci., 104:406-416. Impact Factor: 3.466; MNiSW: 35**
3. **Suski M, Olszanecki R, Chmura Ł, Stachowicz A, Madej J, Okoń K, Adamek D, Korbut R. Influence of metformin on mitochondrial subproteome in the brain of apoE knockout mice. 2016, Eur J Pharmacol., 772:99-107. Impact Factor: 2.896; MNiSW: 30**

4. *Stachowicz A, Suski M, Olszanecki R, Madej J, Okoń K, Korbut R. Proteomic analysis of liver mitochondria of apolipoprotein E knockout mice treated with metformin. 2012, J Proteomics., 77:167-75.*

Impact Factor: 4.088; MNiSW: 40

- c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Myszy z wyłączonym genem dla apolipoproteiny E (apoE-knockout) są jednym z najbardziej uznanych eksperymentalnych modeli miażdżycy. Model ten, na przestrzeni lat, od swojego naukowego debiutu w 1992 roku, stał się obiektem niezwykle intensywnej eksploracji badawczej na całym świecie, a prace z jego wykorzystaniem liczy się obecnie w tysiącach pozycji. Mnogość doniesień naukowych pozwoliła nie tylko na szczegółową morfologiczną charakterystykę progresji aterosclerozy, dokumentując jej wysoką homologię z patologią obserwowaną u ludzi, ale również udowodniła przydatność modelu apoE<sup>-/-</sup> do szczegółowych badań nad potencjalnymi nowymi strategiami przeciwmiażdżycowymi. Obserwacje fenotypu myszy apoE<sup>-/-</sup> stopniowo rozszerzano poza obszar układu sercowo naczyniowego, wskazując na możliwe wykorzystanie tego modelu w badaniach nad wielonarządowymi konsekwencjami rozwoju miażdżycy. Dotyczy to szczególnie narządów zużywających duże ilości tlenu, których perfuzja jest ograniczona na skutek rozrostu blaszek miażdżycowych. Zaobserwowano m.in. rozwój zmian o charakterystyce umiarkowanego niealkoholowego stłuszczenia wątroby, uszkodzenie mikrokrążenia nerkowego i kłębuszków nerkowych oraz zmiany neurodegeneracyjne w mózgu, przypominające wczesne etapy choroby Alzheimera (m.in.: zmniejszenie gęstości synaps i dendrytów, zmiany behawioralne czy upośledzenie plastyczności neuronalnej). Co warto podkreślić, mamy zatem do czynienia z ciekawą sytuacją, kiedy postępująca miażdżycza upośledza funkcje nerek czy wątroby, które na zasadzie dodatniego sprzężenia zwrotnego nasilają rozwój choroby naczyniowej.

Prace ostatnich lat wskazują na przewlekły, sub-kliniczny stan zapalny jako wspólny element w etiologii m.in. miażdżycy, otyłości, cukrzycy typu drugiego, chorób metabolicznych i autoimmunologicznych, ale również depresji czy zmian o charakterze neurodegeneracyjnym, które łącznie zalicza się do współczesnych chorób cywilizacyjnych. Uszkodzenia narządowe są końcowym, najpoważniejszym powikłaniem tych chorób, zaś mechanizmy odpowiedzialne za pojawianie się szkód narządowych nie są do końca poznane. Coraz więcej danych wskazuje jednak, że w ich rozwoju dużą rolę odgrywa dysfunkcja mitochondriów. Wyjątkowo liczne mitochondria w dobrze perfundowanych narządach to nie tylko „elektrownie” zaopatrujące komórki w ATP, ale także kluczowe organella regulujące procesy śmierci komórek. W miarę rozwoju miażdżycy coraz większą rolę odgrywają bowiem procesy związane z nadmiernym nasileniem różnych form śmierci komórek – apoptozy, autofagii, czy nekrozy oraz zaburzona regulacja cyklu komórkowego (ograniczenie zdolności do regeneracji, przedwczesne starzenie się), których regulacja na poziomie komórki krzyżuje się w mitochondriach.

Farmakologiczna korekcja zaburzeń ich funkcji mogłoby stanowić nowy, obiecujący kierunek leczenia i profilaktyki tego schorzenia. Spośród potencjalnych molekularnych celów takiej interwencji szczególnie interesująca wydaje się kinaza aktywowana AMP (AMPK) z uwagi na jej plejotropową

aktywność komórkową. Uważana za kluczowy sensor równowagi metabolicznej i regulator homeostazy mitochondriów stanowi jedno z najważniejszych ogniw odpowiedzi komórkowej na ich dysfunkcję. Podstawową rolą aktywowanej AMPK w odpowiedzi na zaburzenia homeostazy metabolicznej komórki jest indukcja szlaków wytwarzających ATP (m.in. indukcja glikolizy,  $\beta$ -oksydacji, biogenezy mitochondriów czy autofagii) przy jednoczesnym wygaszaniu procesów konsumujących energię (takich jak: hamowanie syntezy białek, kwasów tłuszczowych, triglicerydów czy cholesterolu).

Proteomika to dziedzina nauki zajmująca się badaniem struktury, funkcji i wzajemnych zależności pomiędzy białkami w systemach biologicznych. Początkowo zorientowana na pojedyncze białka i procesy komórkowe, na przestrzeni ponad dwudziestu lat swojego dynamicznego rozwoju osiągnęła zdolność identyfikacji i ilościowego oznaczania tysięcy białek jednocześnie, oferując unikatową możliwość wglądu w niemal kompletny proteom komórki. Metodologiczny postęp związany był z rozwojem spektrometrii mas, która przesunęła poziom analizy proteomicznej z całych białek na ich fragmenty – peptydy. Możliwa stała się zatem nie tylko identyfikacja mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój chorób ale również śledzenie zmian białek towarzyszących strategiom leczniczym, wskazujących na kluczowe komórkowe szlaki naprawy.

Cykl moich badań rozpoczyna opis wpływu metforminy – pośredniego aktywatora AMPK – na białka mitochondriów wątroby i mózgu myszy  $apoE^{-/-}$  (Stachowicz et al., 2012, Suski et al. 2016). W obydwu przypadkach wstępna morfometryczna ocena narządów wykazała korzystne zmiany wywołane aktywacją AMPK: zmiany o charakterze rozlanego stłuszczenia wątroby oraz występowanie binukleacji hepatocytów w grupie myszy, którym podawano metforminę były mniejsze. W mózgu zaś pod wpływem podaży metforminy zaobserwowano zmniejszenie ilości tzw. czarnych neuronów (tj. uszkodzonych, dysfunkcyjnych komórek nerwowych) do poziomu obserwowanego u dzikich myszy C57BL/6J.

Na poziomie molekularnym podaż metforminy wywołała zmiany w stężeniu białek mitochondrialnych wątroby i mózgu. Metodą elektroforezy dwuwymiarowej połączonej z tandemową spektrometrią mas (2DE-LC-MS/MS) w wątrobie identyfikowaliśmy 25 białek, których mitochondrialne stężenia zmieniły się pod wpływem podaży metforminy (Stachowicz et al., 2012). Można podzielić je, pod względem ich molekularnej funkcji na: enzymy biorące udział w metabolizmie (szczególnie  $\beta$ -oksydacji kwasów tłuszczowych, jak: indukcja dehydrogenazy acylo-koenzymu A czy hydratazy enoilo-koenzymu A czy nieorganicznej pirofosfatazy), białka związane ze stresem oksydacyjnym (m.in.: indukcja peroksyredoksyny 6, anhydrozy węglanowej 3, spadek stężenia HSP60) oraz te zaangażowane w oddychanie komórkowe (spadek ilości podjednostek mitochondrialnego łańcucha oddechowego). Nowym znaleziskiem była ponad 300% indukcja N-metylotransferazy glicynowej (GNMT) w grupie metforminy. Jego klasyczna funkcja komórkowa to katalizowanie reakcji metylacji glicyny i utrzymywanie tą drogą stałego stosunku S-adenozylometioniny (SAME) i S-adenozylhomocysteiny (SAH), co przeciwdziała nadmiernej metylacji białek i DNA. Co ciekawe, GNMT wydaje się być przyczynowo związana z rozwojem uszkodzeń wątroby: myszy pozbawione GNMT rozwijają stłuszczenie wątroby, zaś u pacjentów z marskością wątroby wykazano zmniejszenie ekspresji tego białka. Pogłębiona analiza danych literaturowych wskazuje na jego zaskakującą wielofunkcyjność zależną od potranslacyjnej modyfikacji (tzw.: *moonlighting protein*). Opisano, iż pod wpływem fosforylacji GNMT zmienia swoją przestrzenną konformację i wędruje do jądra

komórkowego, gdzie działa jako czynnik transkrypcyjny dla szeregu genów kodujących enzymy zaangażowane w detoksyfikację wątroby. Opisana w naszych badaniach indukcja i mitochondrialna lokalizacja GNMT była oryginalnym odkryciem badawczym, mogącym reprezentować ważny mechanizm indukowany przez metforminę dla przeciwdziałania stłuszczeniu wątroby.

Mitochondria biorą udział w regulacji homeostazy wapnia, śmierci komórkowej, neurogeniezie i plastyczności synaptycznej – procesach ważnych dla prawidłowego funkcjonowania układu nerwowego, zaś ich dysfunkcja jest przyczynowo związana z nieprawidłową czynnością mózgu oraz rozwojem zaburzeń nastroju. Analiza ilościowa zmian stężeń mitoproteomu w mózgach myszy apoE<sup>-/-</sup> pozwoliła na identyfikację 25 białek zmienionych pod wpływem podaży metforminy (Suski et al. 2016). Funkcjonalnie większość z nich ogniskowała się wokół mitochondrialnego metabolizmu (m.in. indukcja acetylotransferazy acetylo-koenzymu A czy dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego), oraz regulacji procesów apoptozy. W drugim przypadku obserwowane zmiany pozostały niejednoznaczne w interpretacji: spadkowi ilości białka wiążącego kwasy tłuszczowe 3 (FABP3), jednego z markerów apoptozy i dysfunkcji mitochondriów towarzyszyły zmiany wskazujące na pro-apoptyczną aktywność metforminy, w tym indukcja czynnika indukującego apoptozę (AIF) oraz białka VDAC2 przy jednoczesnym spadku ilości  $\alpha$ -enolazy i statminy w mitochondriach. Obydwa te białka zaangażowane są w stabilizacji błon mitochondrialnych i utrzymaniu ich prawidłowego potencjału elektrochemicznego. Biorąc pod uwagę opisywaną w literaturze pro-apoptyczną aktywność metforminy, wyniki oznaczeń proteomicznych w mitochondriach myszy apoE<sup>-/-</sup> korespondują z danymi morfometrycznymi i wspierają hipotezę, według której metformina może wspierać mechanizmy komórkowe ukierunkowane na usuwanie dysfunkcyjnych komórek poprzez regulację funkcji mitochondriów, zawiadujących sygnałami „życia i śmierci” komórki.

Opisane wyżej prace oparte na metodach proteomicznych wskazały na nowe, mitochondrialne mechanizmy przeciwdziałania dysfunkcji narządowej wywołane aktywacją kinazy aktywowanej AMP. Niosły jednak ze sobą dwa zasadnicze ograniczenia interpretacyjne: po pierwsze metformina aktywuje AMPK pośrednio, poprzez zahamowanie kompleksu I w mitochondriach i następczy spadek produkcji ATP. Nie można zatem wykluczyć, że niektóre ze zmian w mitochondriach wywołanych przez metforminę były regulowane bez udziału AMPK. Po drugie, zaskakująca mitochondrialna lokalizacja niektórych ze zidentyfikowanych białek wskazała, iż rozszerzenie oznaczeń ilościowych o otaczający mitochondria cytozol, jak również o domenę transkryptomu byłaby wartościowym poszerzeniem badań, jednocześnie oferując walidację zmian obserwowanych w mitoproteomie.

Odpowiedzią na powstałe wątpliwości było zaplanowanie eksperymentu w modelu apoE<sup>-/-</sup>, w którym AMPK została aktywowana swoim bezpośrednim aktywatorem (AICAR), oraz zastosowanie nowej metody izobarycznego znakowania peptydów (*isobaric tags for relative and absolute quantitation*, iTRAQ) do ilościowych oznaczeń białek mitochondriów i cytozolu w wątrobie myszy apoE<sup>-/-</sup>, poszerzony dodatkowo o pomiar ekspresji mRNA (RT<sup>2</sup> Profiler PCR array) dla walidacji wyników proteomicznych (Suski et al. 2017). Odejście od technik żelowych na rzecz oznaczeń chromatograficznych podniosło czułość oznaczeń (ilość precyzyjnie zmierzonych białek), lecz co ważniejsze również i jakość uzyskiwanych wyników. Dodatkowo zaoferowało możliwość jednoczesnego oznaczania kilku próbek jednocześnie (multipleksowanie), zwiększając przepustowość oznaczeń oraz stopień ich standaryzacji. W toku przeprowadzonych analiz udało się zidentyfikować i

oznaczyć ilościowo 667 białek (256 w mitochondriach oraz 411 w cytozolu), spośród których 116 wykazało zmiany w ekspresji regulowane aktywacją AMPK. Walidacja na poziomie transkryptomu nie tylko udokumentowała stan długotrwałej aktywacji kinazy (wzrost ekspresji genów dla *PGC1-α* i *Cyp2e1* przy jednoczesnym spadku *Srebf1* i *ChREBP*), ale równocześnie potwierdziła obserwacje proteomiczne. Zgodnie z założeniami, podobnie do metforminy, aktywacja AMPK bezpośrednim aktywatorem wywołała zmiany w stężeniach wielu białek zaangażowanych w różnorakie procesy komórkowe, w tym działanie przeciwapoptotyczne i przeciwzapalne oraz szeroki wpływ na bioenergetykę komórki. Wśród tychże ważną grupę stanowiły alternatywne mechanizmy uzyskiwania energii, takie jak indukcja komponent cyklu Krebsa wraz z powiązаныmi z nim szlakami przemian metabolicznych, umożliwiającą wykorzystanie różnorodnych bio-molekuł do produkcji ATP (m.in. aminokwasów). Obserwacje te wzmocniło odnalezienie markerów nasilonej degradacji białek w wątrobach myszy *apoE<sup>-/-</sup>* wywołanych poprzez podaż AICAR. Drugim, niezwykle ciekawym i oryginalnym znaleziskiem w tym obszarze była indukcja kinazy adenylowej 2 (AK2) w mitochondriach, co ciekawe, przy jednoczesnym zmniejszeniu jej cytozolowej obecności. Białko to, poprzez katalizę odwracalnej reakcji inter-konwersji nukleotydów adeninowych ( $ATP + AMP = 2ADP$ ), jest zaangażowane nie tylko w regulację wzajemnej relacji ADT/ATP, ale również uczestniczy w celowanym transferze ATP z miejsc powstawania do miejsc jego utylizacji. Szczególnym przykładem takiej komunikacji jest proces stresu retikulum endoplazmatycznego, w którym podaż mitochondrialnego ATP do retikulum mediowana przez AK2 ma za zadanie dostarczenie energii dla enzymów zaangażowanych w usuwanie nadmiaru uszkodzonych bądź źle sfaldowanych białek. Co ważne, w naszych danych odnotowaliśmy również indukcję markerów dowodzących przeciwdziałaniu dysfunkcji retikulum u myszy, którym podawano AICAR. Zatem, wspomniane obserwacje wskazują na retikulum endoplazmatyczne jako na nowy, nieopisywany dotąd cel mechanizmów kompensacyjnych w wątrobie myszy *apoE<sup>-/-</sup>* wywołanych aktywacją AMPK. Drugim ciekawym sub-komórkowym obszarem aktywności AMPK w naszych danych były peroksysomy, których markery ilościowe i funkcjonalne uległy represji pod wpływem aktywacji AMPK. Organella te posiadają zdolność do autonomicznej replikacji, zatem homeostaza komórkowa realizowana jej poprzez regulację tempa ich biogenezy i degradacji. Co ważne, procesom peroksysomalnej  $\beta$ -oksydacji (indukowanej przy zwiększonej liczbie peroksysomów oraz ułatwionej dostępności kwasów tłuszczowych w stłuszczonej wątrobie) towarzyszy wytwarzanie znacznych ilości reaktywnych form tlenu (ROS). Nasze wyniki potwierdzają obserwowaną w literaturze rolę AMPK w regulacji procesów kontrolowanego usuwania peroksysomów na drodze celowanej autofagii (tzw. pexofagii), mającej na celu ograniczenie oksydacyjnego uszkodzenia wątroby.

Nasze wyniki uzyskane w eksperymentach prowadzonych w wykorzystaniem modelu *apoE<sup>-/-</sup>*, jak również analiza bogatej literatury dotyczącej aktywności kinazy aktywowanej AMP w różnych komórkach i narządach dowodzą jej wyjątkowej roli regulującej metabolizm komórkowy. Jednocześnie coraz więcej danych literaturowych wskazuje, że metabolizm komórek układu immunologicznego, a w szczególności makrofagów zmienia się znaczenie w zależności od stanu ich aktywacji, zależnego od otaczającego mikrośrodowiska. Do weryfikacji potencjału przeciwmiażdżycowego w regulacji metabolicznej makrofagów wykorzystaliśmy syntetyczny związek GW9508, będący aktywatorem receptorów dla nienasyconych kwasów tłuszczowych FFAR1/FFAR4, którego jednym z kluczowych

efektorów komórkowych jest kinaza aktywowana AMP (*Suski et al. 2019*). Publikowane aktualnie doniesienia wskazują, że aktywacja pro-zapalna makrofagów kieruje ich metabolizm na szlak tlenowej glikolizy (tzw. efekt Warburga), podczas gdy sygnały pro-rezolucyjne wzmacniają fosforylację oksydacyjną jako główne źródło energii. Co więcej, zależności te mają charakter dwukierunkowy: indukcja określonych zmian metabolicznych moduluje fenotyp i aktywność makrofagów. Biorąc pod uwagę kluczową rolę tych komórek zarówno w czasie inicjacji jak i propagacji aterogenezy, atrakcyjna wydaje się hipoteza badawcza, według której farmakologiczna interwencja w aktywność makrofagów (w tym metaboliczną) może skutkować pożądanymi zmianami ich fenotypu i profilu aktywacji, stanowiąc potencjalny nowy mechanizm przeciwmiażdżycowy. Zgodnie z przewidywaniami, podaż aktywatora GW9508 wykazała działanie ateroprotekcyjne w modelu apoE<sup>-/-</sup>, zmieniając jednocześnie strukturę morfologiczną blaszek miażdżycowych: depozyt makrofagów znacząco zmalał (ok. 20%), zaś udział komórek mięśni gładkich wykazał tendencję wzrostową (ok. 30%), co łącznie można zinterpretować jako stabilizacja blaszki miażdżycowej. Następnie, aby oszacować udział fenotypów pro- i przeciw-zapalnego w redukcji całkowitej ilości makrofagów opracowaliśmy metodę morfometrycznego fenotypowania tych komórek w blaszkach. Wyniki wskazały na spadek ilości makrofagów aktywowanych pro-zapalnie (F4/80-iNOS - pozytywne) w blaszkach, przy zachowaniu udziału populacji sprzyjającej gojeniu (F4/80-arginaza 1 - pozytywne).

Podsumowując, do najważniejszych osiągnięć poznawczych cyklu prac należą:

1. Aktywacja AMPK wywołuje głębokie zmiany jakościowe i ilościowe w białkach zaangażowanych w różnorakie procesy komórkowe, które mogą być kompleksowo śledzone za pomocą nowoczesnych metod proteomiki różnicowej. Analiza ilościowa białek w zakresie wyodrębnionych sub-struktur komórkowych oferuje unikatową możliwość wglądu w procesy komórkowe inicjowane w różnych obszarach komórki oraz w sposoby ich wzajemnej integracji.
2. Analiza składu białkowego wskazuje, że zmianie fenotypu czy stanu aktywacji komórek towarzyszą modyfikacje ich funkcji metabolicznych, jak również, zwrótnie, „metaboliczne re-programowanie” komórek wywołuje różnicowanie ich funkcji. Kinaza aktywowana AMP leży na skrzyżowaniu takich szlaków regulacyjnych komórki.
3. Kinaza aktywowana AMP jest kluczowym regulatorem metabolizmu komórkowego, a plejotropowe efekty jej pobudzenia mogą zostać wykorzystane jako skuteczna strategia przeciwmiażdżycowa, zarówno w obszarze układu sercowo – naczyniowego, jak również w przeciwdziałaniu uszkodzeniu innych narządów (w tym wątroby i mózgu), które towarzyszy aterogenezie.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Moje zainteresowania naukowe skupiają się wokół trzech głównych, równolegle rozwijanych obszarów tematycznych: proteomika w schorzeniach cywilizacyjnych o podłożu zapalnym (w szczególności miażdżyca i depresja), angiotensyny i inne biologicznie aktywne peptydy w ich aktywności krążeniowej i tkankowej, wreszcie aplikacja nowoczesnych metod proteomiki różnicowej w badaniach klinicznych. Wspólną osią wymienionych obszarów jest metodologia prowadzonych badań oparta o oznaczenia wykorzystujące układ wysokosprawnej chromatografii cieczowej połączonej spektrometrią mas (LC-MS). Moje doświadczenie z wykorzystaniem tej metody rozpoczęły badania w ramach magisterium, dotyczących ilościowych pomiarów metabolizmu morfiny w obecności współanalgetyków, które zaowocowały pierwszymi publikacjami:

**Suski M, Bujak-Gizycka B, Madej J, Olszanecki R, Korbut R.** Evaluation of morphine metabolism in presence of amantadine and dextromethorphan in human serum by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC/MS) method. *Folia Med Cracov.* 2008;49(3-4):111-21.

**Suski M, Bujak-Gizycka B, Madej J, Kacka K, Dobrogowski J, Woron J, Olszanecki R, Korbut R.** Co-administration of dextromethorphan and morphine: reduction of post-operative pain and lack of influence on morphine metabolism. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2010 Aug;107(2):680-4.

**Bujak-Gizycka B, Kacka K, Suski M, Olszanecki R, Madej J, Dobrogowski J, Korbut R.** Beneficial effect of amantadine on postoperative pain reduction and consumption of morphine in patients subjected to elective spine surgery. *Pain Med.* 2012 Mar;13(3):459-65.

Zespół Katedry Farmakologii UJCM posiada wieloletnie, bogato udokumentowane doświadczenie w badaniach nad miażdżycą, bazujące na opisie zmian miażdżycowych i ich farmakologicznej korekty w eksperymentalnym modelu aterogenezy (myszy apoE-knockout, apoE<sup>-/-</sup>). Mój udział w tych badaniach, polegający na wykonywaniu oznaczeń biochemicznych, zaowocował współautorstwem kilku prac badawczych, opisujących przeciwmiażdżycowe działanie wybranych leków z grup: beta-blokerów, składowych układu renina-angiotensyna czy antybiotyków:

**Kus K, Gajda M, Pyka-Fosciak G, Toton-Zuranska J, Pawlowska M, Suski M, Niepsuj A, Nowak B, Wolkow P, Olszanecki R, Jawien J, Korbut R.** The effect of nebivolol on atherogenesis in apoE-knockout mice. *J Physiol Pharmacol.* 2009 Dec;60(4):163-5.

**Pawlowska M, Gajda M, Pyka-Fosciak G, Toton-Zuranska J, Niepsuj A, Kus K, Bujak-Gizycka B, Suski M, Olszanecki R, Jawien J, Korbut R.** The effect of doxycycline on atherogenesis in apoE-knockout mice. *J Physiol Pharmacol.* 2011 Apr;62(2):247-50.

**Jawien J, Toton-Zuranska J, Gajda M, Niepsuj A, Gebaska A, Kus K, Suski M, Pyka-Fosciak G, Nowak B, Guzik TJ, Marcinkiewicz J, Olszanecki R, Korbut R.** Angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist ameliorates progress of atherosclerosis in apoE-knockout mice. *J Physiol Pharmacol.* 2012 Feb;63(1):77-85.

Wprowadzenie w eksperymentach ma modelu apoE<sup>-/-</sup> metod proteomiki, dzięki jej unikalnej właściwości wysoko-przepustowości pomiarów (analiza ekspresji tysięcy białek jednocześnie), pozwoliły na poszerzenie horyzontu badań w modelu apoE<sup>-/-</sup> poza obszar naczyń, do narządów i ich sub-struktur komórkowych (mitochondria). Oś metodyczną była tutaj pierwsza z wdrożonych przeze



mnie metod analizy ilościowej białek – elektroforeza dwuwymiarowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas (2DE-LC-MS/MS).

Serię publikacji w oparciu o nową metodologię rozpoczęły badania wykonywane w ramach pracy doktorskiej, które skupiły się na analizie roli mitochondriów w uszkodzeniu wątroby i nerek towarzyszących rozwojowi miażdżycy, opisane w pracach:

**Suski M, Olszanecki R, Madej J, Totoń-Żurańska J, Niepsuj A, Jawień J, Bujak-Giżycka B, Okoń K, Korbut R.** *Proteomic analysis of changes in protein expression in liver mitochondria in apoE knockout mice.* *J Proteomics.* 2011 May 16;74(6):887-93.

**Suski M, Olszanecki R, Stachowicz A, Madej J, Bujak-Giżycka B, Okoń K, Korbut R.** *The influence of angiotensin-(1-7) Mas receptor agonist (AVE 0991) on mitochondrial proteome in kidneys of apoE knockout mice.* *Biochim Biophys Acta.* 2013 Dec;1834(12):2463-9.

W niniejszych pracach, po raz pierwszy zastosowano metody proteomiki do zbadania zmian w ekspresji białek mitochondriów nerek i wątroby towarzyszących rozwojowi uszkodzeń narządowych w miażdżycy oraz do oceny wpływu agonisty receptora Mas – peptydomimetyku Ang 1-7 (związku AVE0991) na mitochondria. Uzyskano interesujący, złożony opis zmian w ekspresji białek mitochondrialnych, zaangażowanych w regulację wzajemnie przeplatających się procesów pro- i anty-oksydacyjnych, szlaków apoptotycznych i metabolicznych towarzyszących rozwojowi miażdżycy. Peptydomimetyk angiotensyny-(1-7) wpłynął na zmiany ekspresji białek w mitochondriach o charakterze kompensacyjnym, ukierunkowanym na poprawę funkcji organelli.

Opracowana metodologia dowiodła swojej użyteczności i stała się osią nowych projektów badawczych Zespołu Katedry Farmakologii UJ CM, których tematyką objęto badania z wykorzystaniem eksperymentalnych modeli miażdżycy i depresji – chorób uważanych za schorzenia cywilizacyjne o postulowanej wspólnej etiologii zapalnej. W projektach zaproponowano zbadanie wpływu substancji charakteryzujących się działaniem mitochondrialnym, nakierowanym na poprawę funkcji tych organelli m.in. na drodze usuwania toksycznych mediatorów stresu oksydacyjnego powstających w mitochondriach. Badania te zaowocowały publikacjami prac:

**Głombik K, Stachowicz A, Ślusarczyk J, Trojan E, Budziszewska B, Suski M, Kubera M, Lasoń W, Wędzony K, Olszanecki R, Basta-Kaim A.** *Maternal stress predicts altered biogenesis and the profile of mitochondrial proteins in the frontal cortex and hippocampus of adult offspring rats.* *Psychoneuroendocrinology.* 2015 Oct;60:151-62.

**Stachowicz A, Głombik K, Olszanecki R, Basta-Kaim A, Suski M, Lasoń W, Korbut R.** *The impact of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) activation by Alda-1 on the behavioral and biochemical disturbances in animal model of depression.* *Brain Behav Immun.* 2016 Jan;51:144-53.

**Stachowicz A, Olszanecki R, Suski M, Głombik K, Basta-Kaim A, Adamek D, Korbut R.** *Proteomic Analysis of Mitochondria-Enriched Fraction Isolated from the Frontal Cortex and Hippocampus of Apolipoprotein E Knockout Mice Treated with Alda-1, an Activator of Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase (ALDH2).* *Int J Mol Sci.* 2017 Feb 17;18(2).

**Głombik K, Stachowicz A, Trojan E, Olszanecki R, Ślusarczyk J, Suski M, Chamera K, Budziszewska B, Lasoń W, Basta-Kaim A.** *Evaluation of the effectiveness of chronic antidepressant drug treatments in the hippocampal mitochondria – A proteomic study in an animal model of depression.* *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2017 Aug 1;78:51-60.

Głombik K, Stachowicz A, Trojan E, Ślusarczyk J, **Suski M**, Chamera K, Kotarska K, Olszanecki R, Basta-Kaim A. *Mitochondrial proteomics investigation of frontal cortex in an animal model of depression: Focus on chronic antidepressant drugs treatment. Pharmacol Rep. 2018 Apr;70(2):322-330.*

Zastosowanie metod proteomiki do ilościowego zbadania białek mitochondrialnych w mózgu w modelach miażdżycy (apoE-knockout) i depresji (szczury stresowane prenatalnie) ujawniło wiele różnic w składzie białkowym tych organelli, wskazując na upośledzenie metabolizmu, neuroplastyczności, neurogenezy oraz biogenezy mitochondriów jako wspólny mitochondrialny profil dysfunkcji sub-struktur mózgowych. Co ważne, zastosowane interwencje farmakologiczne wywołały korzystne zmiany w stężeniach wielu białek mitochondrialnych związanych funkcjonowaniem organelli, dowodząc ich roli w etiologii zapalnej miażdżycy i depresji, jako swoistego skrzyżowania zarówno dla dróg uszkodzenia jak i naprawy.

Kontynuacja badań proteomicznych w modelu apoE-knockout objęła również swoją tematyką jeden z niezależnych czynników ryzyka miażdżycy - stłuszczenie wątroby, w rozwoju którego, podobnie do aterogenezy, od lat postuluje się kluczową rolę dysfunkcji mitochondriów. Model apoE<sup>-/-</sup> oferuje możliwość badania stłuszczenia wątroby w swojej ograniczonej, sub-klinicznej formie, jednocześnie pozwalając na śledzenie odległych konsekwencji zmian funkcji wątroby na rozwój miażdżycy. Wyniki tych badań opisują prace:

Stachowicz A, Olszanecki R, **Suski M**, Wiśniewska A, Totoń-Żurańska J, Madej J, Jawień J, Białas M, Okoń K, Gajda M, Głombik K, Basta-Kaim A, Korbut R. *Mitochondrial aldehyde dehydrogenase activation by Alda-1 inhibits atherosclerosis and attenuates hepatic steatosis in apolipoprotein E-knockout mice. J Am Heart Assoc. 2014 Nov 12;3(6):e001329*

Wiśniewska A, Olszanecki R, Totoń-Żurańska J, Kuś K, Stachowicz A, **Suski M**, Gębska A, Gajda M, Jawień J, Korbut R. *Anti-Atherosclerotic Action of Agmatine in ApoE-Knockout Mice. Int J Mol Sci. 2017 Aug 4;18(8).*

Wskazują one na skuteczność strategii farmakologicznej korekty funkcji mitochondriów (jak aktywacja antyoksydacyjnych enzymów w mitochondriach lub receptorów imidazolinowych zlokalizowanych w błonach mitochondrialnych) w przeciwdziałaniu rozwoju stłuszczenia wątroby towarzyszącemu aterogenezie w modelu apoE-knockout. Zmiany w mitochondriach obejmują czynniki związane z wątrobowym metabolizmem kwasów tłuszczowych, cholesterolu i lipoprotein, a także zmiany w ekspresji białek mitoproteomu związanych z utlenianiem kwasów tłuszczowych, białek regulujących stres oksydacyjny, apoptozę i reakcje zapalne.

Drugim obszernym polem mojej działalności naukowej w Katedrze są zagadnienia związane z patofizjologią układu renina – angiotensyna w chorobach układu krążenia i jego farmakologiczną korektą. Wykonywane w Zespole Katedry Farmakologii UJCM prace w tym zakresie bazowały na opracowanej przez Zespół metodyce pomiaru tempa i kierunków dróg metabolicznych przemian peptydów angiotensynowych z wykorzystaniem spektrometrii mas. Kompleksowy, jednoczesny pomiar *ex vivo* kilkunastu peptydów – metabolitów angiotensyny I – pozwala na zbadanie farmakologicznej aktywności wybranych substancji działających na tkankowe składowe układu renina – angiotensyna w

aorcie (m.in. poprzez ocenę stosunku peptydów angiotensynowych o postulowanym przeciwstawnym działaniu biologicznym: angiotensyna II versus angiotensyna 1-7). Owocem badań były publikacje:

Olszanecki R, Bujak-Gizycka B, Madej J, **Suski M**, Wołkow PP, Jawień J, Korbut R. Kaempferol, but not resveratrol inhibits angiotensin converting enzyme. *J Physiol Pharmacol.* 2008 Jun;59(2):387-92.

Bujak-Gizycka B, Olszanecki R, **Suski M**, Madek J, Stachowicz A, Korbut R. Angiotensinogen metabolism in rat aorta: robust formation of proangiotensin-12. *J Physiol Pharmacol.* 2010 Dec;61(6):679-82.

Olszanecki R, **Suski M**, Gebska A, Toton-Zuranska J, Kus K, Madej J, Bujak-Gizycka B, Jawien J, Korbut R. The influence of angiotensin-(1-7) peptidomimetic (AVE 0991) and nebivolol on angiotensin I metabolism in aorta of apoE-knockout mice. *J Physiol Pharmacol.* 2013 Jun;64(3):317-20.

Jednocześnie prowadzone były prace mające na celu adaptację metody spektrometrycznego pomiaru stężeń angiotensyn do nowych układów komórkowych (m.in. izolowane monocyty, hodowle pierwotne mięśni gładkich) i tkankowych (m.in. nerka i żołądek), oraz rozszerzenie spektrum oznaczeń o inne biologicznie aktywne peptydy (m.in. bradykinina). Opublikowane prace:

Olszanecki R, Madej J, **Suski M**, Gebska A, Bujak-Gizycka B, Korbut R. Angiotensin metabolism in rat stomach wall: prevalence of angiotensin-(1-7) formation. *J Physiol Pharmacol.* 2009 Mar;60(1):191-6.

Bujak-Gizycka B, Olszanecki R, Madej J, **Suski M**, Gębska A, Korbut R. Metabolism of bradykinin in aorta of hypertensive rats. *Acta Biochim Pol.* 2011;58(2):199-202.

**Suski M**, Gębska A, Olszanecki R, Stachowicz A, Uracz D, Madej J, Korbut R. Influence of atorvastatin on angiotensin I metabolism in resting and TNF- $\alpha$ -activated rat vascular smooth muscle cells. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2014 Dec;15(4):378-83.

Rutkowska-Zapała M, **Suski M**, Szatanek R, Lenart M, Węglarczyk K, Olszanecki R, Grodzicki T, Strach M, Gąsowski J, Siedlar M. Human monocyte subsets exhibit divergent angiotensin I-converting activity. *Clin Exp Immunol.* 2015 Jul;181(1):126-32.

Pawlik MW, Kwiecien S, Ptak-Belowska A, Pajdo R, Olszanecki R, **Suski M**, Madej J, Targosz A, Konturek SJ, Korbut R, Brzozowski T. The renin-angiotensin system and its vasoactive metabolite angiotensin-(1-7) in the mechanism of the healing of preexisting gastric ulcers. The involvement of Mas receptors, nitric oxide, prostaglandins and proinflammatory cytokines. *J Physiol Pharmacol.* 2016 Feb;67(1):75-91.

Rozwój wiedzy i postępy badań w tematyce peptydów aktywnych biologicznie umożliwiły zawiązanie współpracy Katedry Farmakologii UJ CM z grupą badawczą Prof. Stefana Zorada z Instytutu Endokrynologii Eksperymentalnej Słowackiej Akademii Nauk oraz z zespołem Prof. Lenki Maletínskiej z Instytutu Chemii Organicznej i Biochemii Czeskiej Akademii Nauk. Tematyką badań objęto m.in. rolę oksytocyny w regulacji metabolizmu w eksperymentalnym modelu otyłości i insulinooporności (szczury Zucker). Wspólne projekty badawcze zaowocowały publikacjami:

Krskova K, Eckertova M, Kukan M, Kuba D, Kebis A, Olszanecki R, **Suski M**, Gajdosechova L, Zorad S. Aerobic training lasting for 10 weeks elevates the adipose tissue FABP4,  $G\alpha$ , and adiponectin expression associated by a reduced protein oxidation. *Endocr Regul.* 2012 Jul;46(3):137-46.

Gajdosechova L, Krskova K, Segarra AB, Spolcova A, **Suski M**, Olszanecki R, Zorad S. Hypooxycytocinaemia in obese Zucker rats relates to oxytocin degradation in liver and adipose tissue. *J Endocrinol.* 2014 Feb 10;220(3):333-43.

Špolcová A, Mikulášková B, Kršková K, Gajdošechová L, Zórad Š, Olszanecki R, **Suski M**, Bujak-Giżycka B, Železná B, Maletínská L. Deficient hippocampal insulin signaling and augmented Tau phosphorylation is related to obesity- and age-induced peripheral insulin resistance: a study in Zucker rats. *BMC Neurosci.* 2014 Sep 25;15:111.

Balazova L, Krskova K, **Suski M**, Sisovsky V, Hlavacova N, Olszanecki R, Jezova D, Zorad S. Metabolic effects of subchronic peripheral oxytocin administration in lean and obese zucker rats. *J Physiol Pharmacol.* 2016 Aug;67(4):531-541.

Trzecim polem mojej naukowej aktywności była adaptacja technik proteomicznych do projektów badawczych o charakterze klinicznym (tzw. proteomika kliniczna). Zadania analityczne w tym zakresie umożliwił rozwój instrumentarium badawczego, pozwalający na odejście od technik żelowych (w których różnicę w ekspresji bada się na poziomie białka – elektroforeza) na rzecz złożonych separacji chromatograficznych połączonych ze spektrometrią mas, gdzie oznaczenia ilościowe wykonuje się na poziomie peptydów. Opracowane dwie platformy analityczne (automatyczne i półautomatyczne frakcjonowanie próbek), oparte na izobarycznym znakowaniu peptydów (iTRAQ) pozwoliły na wykonywanie oznaczeń stężeń setek białek obecnych w próbce jednocześnie. Dodatkowo, opracowane metody analityczne musiały zostać poszerzone o dedykowane protokoły przygotowania próbek do analizy proteomicznej, uwzględniającej specyficzność materiału klinicznego. Wspomniane prace o charakterze wdrożeniowym i optymalizacyjnym zostały następnie wykorzystane we współpracy naukowej z kilkoma zespołami badawczymi Wydziału Lekarskiego UJ CM w realizowanych wspólnie projektach dotyczących oznaczeń m.in. białek osocza, bioptatów sub-struktur mięśnia sercowego, bioptatów nowotworu jelita grubego czy skrzepów fibrynowych generowanych ex-vivo:

**Suski M**, Siudut J, Ząbczyk M, Korbut R, Olszanecki R, Undas A. Shotgun analysis of plasma fibrin clot-bound proteins in patients with acute myocardial infarction. *Thromb Res.* 2015 Apr;135(4):754-9.

Klimek-Piotrowska W, Krawczyk-Ożóg A, **Suski M**, Kapusta P, Wołkow PP, Hołda MK. Comparative iTRAQ analysis of protein abundance in the human sinoatrial node and working cardiomyocytes. *J Anat.* 2018 Jun;232(6):956-964.

**Suski M**, Bokiniec R, Szwarz-Duma M, Madej J, Bujak-Giżycka B, Kwinta P, Borszewska-Kornacka MK, Revhaug C, Baumbusch LO, Saugstad OD, Pietrzyk JJ. Prospective plasma proteome changes in preterm infants with different gestational ages. *Pediatr Res.* 2018 Jul;84(1):104-111.

**Suski M**, Bokiniec R, Szwarz-Duma M, Madej J, Bujak-Giżycka B, Borszewska-Kornacka MK, Książek T, Grabowska A, Revhaug C, Baumbusch LO, Saugstad OD, Pietrzyk JJ, Kwinta P. Plasma proteome changes in cord blood samples from preterm infants. *J Perinatol.* 2018 Sep;38(9):1182-1189.

Zasada M, **Suski M**, Bokiniec R, Szwarz-Duma M, Borszewska-Kornacka MK, Madej J, Bujak-Giżycka B, Madetko-Talowska A, Revhaug C, Baumbusch LO, Saugstad OD, Pietrzyk JJ, Kwinta P. An iTRAQ-Based Quantitative Proteomic Analysis of Plasma Proteins in Preterm Newborns With Retinopathy of Prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018 Nov 1;59(13):5312-5319.

Zbadanie składu białkowego skrzepów fibrynowych uzyskanych z osocza pacjentów cierpiących na różnorakie zaburzenia ze strony układu krzepnięcia było oryginalnym pomysłem badawczym, zaplanowanym jako nowatorski sposób na poszukiwanie mechanizmów warunkujących obserwowaną klinicznie różnicę w strukturze i właściwościach skrzepów. Identyfikując jednocześnie ograniczenia

techniczne posiadanej aparatury, rozpoczęliśmy pracę nad dalszym rozwojem metodologii ilościowych oznaczeń białek w skrzepach fibrynowych we współpracy z Instytutem Biochemii Maxa Plancka w Martinsried. Zaowocowały one skokowym wzrostem możliwości analitycznych metody proteomicznej analizy składu białkowego skrzepów oraz jej skuteczną implementacją badawczą:

*Stachowicz A, Siudut J, **Suski M**, Olszanecki R, Korbut R, Undas A, Wiśniewski JR. Optimization of quantitative proteomic analysis of clots generated from plasma of patients with venous thromboembolism. Clin Proteomics. 2017 Nov 28;14:38.*

*Stachowicz A, Zabczyk M, Natorska J, **Suski M**, Olszanecki R, Korbut R, Wiśniewski JR, Undas A. Differences in plasma fibrin clot composition in patients with thrombotic antiphospholipid syndrome compared with venous thromboembolism. Sci Rep. 2018 Nov 23;8(1):17301.*

Opisane badania były pierwszymi opisującymi kompleksową analizę składników skrzepu fibrynowego w osoczu, wskazującą na różnice w składzie białek pomiędzy pacjentami z zakrzepowym zespołem antyfosfolipidowym, zakrzepicą i zdrowymi ochotnikami. Nasze wyniki sugerują możliwą rolę funkcjonalną zmian białek w skrzepach, związaną ze zwiększoną ilością składników dopełniacza i białek płytek krwi w skrzepach, jak również obniżonych stężeń białek. Opisane wyniki wskazują, iż strategia proteomicznego opisu składu białkowego skrzepu może być przydatna do identyfikacji białek osocza o potencjalnej przydatności klinicznej jako biomarkerów w chorobach zakrzepowych.

*Maciej Suski*