

Recenzja rozprawy doktorskiej pani **Joanny Suraj** pt. „*Opracowanie panelu biomarkerów białkowych oraz ich zastosowanie do wieloparametrowej oceny czynności śródbłónka naczyniowego*”.

Przedmiotem pracy doktorskiej było opracowanie i zweryfikowanie metody bioanalitycznej umożliwiającej ilościową analizę panelu białek o charakterze potencjalnych biomarkerów stanu funkcjonalnego śródbłónka naczyniowego. Szczegółowymi celami projektu były: (i) opracowanie i optymalizacja ilościowej metody analizy panelu wybranych białek za pomocą techniki LC/MS-MRM oraz (ii) weryfikacja przydatności tej metody do analizy potencjalnych biomarkerów stanu funkcjonalnego śródbłónka naczyniowego w kilku modelach doświadczalnych. Śródbłónek naczyniowy jest narządem o olbrzymim znaczeniu dla funkcjonowania całego organizmu, a zaburzenia jego struktury i funkcji są przyczyną lub następstwem wielu chorób. Badanie biomarkerów struktury i funkcji śródbłónka ma więc duże znaczenie, zarówno poznawcze jak i praktyczne (w diagnostyce medycznej). W związku z dużą złożonością struktury i funkcji śródbłónka hipotetyczny biomarker powinien mieć charakter wieloczynnikowego panelu (sygnatury), a zastosowana technika musi umożliwiać wiarygodną ocenę ilościową badanych czynników. Z tego też względu temat podjęty przez Doktorantkę dotyczy bardzo ważnego zagadnienia o wielorakim znaczeniu praktycznym i poznawczym. Należy również zwrócić uwagę, że realizacja projektu wymagała od Doktorantki uzyskania wiedzy i kompetencji umożliwiających wykorzystanie metodologii będącej tzw. *state-of-the-art* współczesnych nauk biomedycznych.

Rozprawa doktorska ma formę cyklu opublikowanych prac uzupełnionych wprowadzeniem (tzw. część teoretyczna i cel pracy) i podsumowaniem (tj. omówieniem wyników i wnioski), a także wymaganym streszczeniem i oświadczeniami współautorów publikacji tworzących cykl. W skład cyklu wchodzi cztery publikacje (jedna przeglądowa i trzy doświadczalne) opublikowane w latach 2015-2019:

[1] Walczak M, **Suraj J**, Kus K, Kij A, Zakrzewska A, Chlopicki S. Towards a comprehensive endothelial biomarkers profiling and endothelium-guided pharmacotherapy. *Pharmacol Rep*. 2015 Aug;67(4):771-7. doi: 10.1016/j.pharep.2015.06.008.

[2] **Suraj J**, Kurpińska A, Olkowicz M, Niedzielska-Andres E, Smolik M, Zakrzewska A, Jaształ A, Sitek B, Chlopicki S, Walczak M. Development, validation and application of a micro-liquid chromatography-tandem mass spectrometry based method for simultaneous quantification of selected protein biomarkers of endothelial dysfunction in murine plasma. *J Pharm Biomed Anal*. 2018 Feb 5;149:465-474. doi: 10.1016/j.jpba.2017.11.023.

[3] **Suraj J**, Kurpińska A, Sternak M, Smolik M, Niedzielska-Andres E, Zakrzewska A, Sacha T, Kania A, Chlopicki S, Walczak M. Quantitative measurement of selected protein biomarkers of endothelial dysfunction in plasma by micro-liquid chromatography-tandem mass spectrometry based on stable isotope dilution method. *Talanta*. 2019 Mar 1;194:1005-1016. doi: 10.1016/j.talanta.2018.10.067.

[4] **Suraj J**, Kurpińska A, Zakrzewska A, Sternak M, Stojak M, Jaształ A, Walczak M, Chlopicki S. Early and late endothelial response in breast cancer metastasis in mice: simultaneous quantification of endothelial biomarkers using a mass spectrometry-based method. *Dis Model Mech*. 2019 Mar 1;12(3). pii: dmm036269. doi: 10.1242/dmm.036269

Publikacja [1] jest pracą przeglądową stanowiącą pewien wstęp teoretyczny do całego cyklu. W pracy tej w przedstawione są podstawowe zagadnienia dotyczące biomarkerów śródbłonna naczyniowego i potencjalne znaczenie technik analitycznych wykorzystujących spektrometrię mas.

W publikacji [2] przedstawiono metodę analizy ilościowej pięciu białek (SDC-1, sVCAM-1, sICAM-1, vWF i ADN) za pomocą tandemowej spektrometrii mas sprzężonej z chromatografią cieczową (LC-MS/MS). Zastosowano strategię *multiple reaction monitoring* (MRM) wykorzystującą jako znaczniki wewnętrzne (*internal standards*, IS) syntetyczne peptydy o zmienionym składzie aminokwasowym (zmiana jednego aminokwasu w stosunku do peptydu docelowego). W pracy zawarta jest kompletna, szczegółowo opisana procedura analityczna, przetestowana m.in. pod kątem liniowości, precyzji i stabilności testu. Opracowany panel biomarkerów został zweryfikowany w trakcie badania poziomu wybranych białek w osoczu myszy. Zastosowany został model doświadczalny, w którym zaburzenia struktury śródbłonna zostały wyindukowane poprzez ekspozycję myszy na dietę wysokotłuszczową (*high fat diet*, HFD). Stwierdzono, że zmianom śródbłonna naczyniowego wyindukowanym przez HFD towarzyszy obniżony poziom ADN i podwyższony poziom vWF w osoczu (w stosunku do zwierząt z grupy kontrolnej, karmionej paszą standardową).

W publikacji [3] przedstawiono metodę analizy ilościowej siedmiu czynników (białka ESM-1, sE-sel, Angpt-2, sFLT-1, PAI-1, t-PA oraz endogenny peptyd ADM) za pomocą techniki LC-MS/MS. Zastosowano strategię MRM wykorzystującą jako znaczniki wewnętrzne syntetyczne peptydy znakowane stabilnie izotopami (*stable isotope labeled standards*, SIS); wykorzystano peptydy o sekwencji aminokwasów identycznej z peptydami docelowymi, w których wybrane lizyny lub argininy zostały zsyntetyzowane z wykorzystaniem izotopów  $^{13}\text{C}$  i  $^{15}\text{N}$ . Porównano dwa podejścia analizy ilościowej wykorzystujące metodę rozcieńczania stabilnych izotopów (*stable isotope dilution*, SID): standardową i zmodyfikowaną (mSID). W

pracy zawarta jest kompletna, szczegółowo opisana procedura analityczna, przetestowana m.in. pod kątem liniowości, precyzji i stabilności testu. Wykazano również podobną wartość metod SID i mSID (z sugestią praktycznego stosowania uproszczonej metody mSID w dalszych badaniach). Opracowany panel biomarkerów został zweryfikowany w trakcie badania poziomu wybranych białek w osoczu myszy. Zastosowany został model doświadczalny, w którym zaburzenia struktury śródbłonna zostały wyindukowane poprzez ekspozycje myszy na czynnik wywołujący systemowy stan zapalny – iniekcję mieszaniny bakteryjnych lipopolisacharydów (LPS). Stwierdzono, że ekspozycja na LPS powoduje podwyższenie poziomu Angpt-2, sFLT-1 i PAI-1 w osoczu (w stosunku do zwierząt z grupy kontrolnej). Ponadto, opracowaną metodę wykorzystano do pomiaru poziomu sześciu w/w czynników w osoczu pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową (CML) leczonych imatynibem i chorych z obturacyjnym bezdechem sennym (OSA), oraz w osoczu osób zdrowych. Stwierdzono, że poziom t-PA, ADM i sFLT-1 ulega obniżeniu u pacjentów z CML, podczas gdy u pacjentów z OSA zwiększeniu ulega poziom Angpt-2 a zmniejszeniu poziom ADM.

W publikacji [4] opracowaną wcześniej metodę LC/MS-MRM wykorzystano do pomiaru poziomu wszystkich 12 czynników w tkankach (osocze, guz nowotworowy i tkanka płuc) myszy, u których doświadczalnie indukowano raka piersi (poprzez ortotropową iniekcję komórek 4T1). Stwierdzono zwiększenie stężenia SDC-1, ESM-1 sVCAM-1, Angpt-2, E-sel, PAI-1, vFW i ADM, oraz zmniejszenie stężenia ADN i sICAM-1 w osoczu myszy z nowotworami. Ponadto, stwierdzono obniżenie poziomu ADN oraz zwiększenie poziomu ADM, FLT-1, Angpt-2, SDC1, VCAM-1 i E-sel w płucach zawierających przerzuty guza nowotworowego, a także zwiększenie poziomu VCAM-1, E-sel, ICAM-1, FLT-1ADM i vWF w tkance guza. Poziom markerów badanych metodą LC/MS-MRM został skorelowany ze zmianami patologicznymi i hematologicznymi, co pozwoliło na stworzenie kompleksowego obrazu zmian systemowych wywołanych rozwijającym się nowotworem. Charakter tych zmian został kompetentnie przedyskutowany w kontekście funkcji śródbłonna naczyniowego.

Wszystkie prace tworzące cykl zostały opublikowane w liczących się czasopismach o zasięgu międzynarodowym (czasopisma z Q1 i Q2 w swoich dziedzinach; łączny IF czasopism, w których opublikowano prace stanowiące rozprawę doktorską wynosi ok. 15). Praca przeglądowa [1] opublikowana w roku 2015 była do tej pory cytowana 16 razy. Mniejsza liczba cytowań pozostałych trzech prac doświadczalnych (łącznie 6 razy) wynika z ich specjalistycznego charakteru i niedługiej daty publikacji (2018-2019). Tak więc zarówno

publikacja powyższych prac w renomowanych czasopismach naukowych jak i ich (spodziewana) rozpoznawalność w środowisku naukowym stanowią niezależne potwierdzenie ich znaczenia i wysokiej wartości merytorycznej.

W przypadku rozprawy doktorskiej opartej o współautorski cykl publikacji istotnym elementem recenzji jest ocena indywidualnego udziału Doktoranta w publikacjach stanowiących rozprawę, którą można przeprowadzić na podstawie oświadczeń współautorów. W przypadku trzech publikacji doświadczalnych [2-4] Doktorantka jest pierwszym autorem, który zgodnie z oświadczeniami był odpowiedzialny za podstawową część pracy, tj. opracowanie, optymalizację i przeprowadzenie analiz LC/MS-MRN, decydujących o oryginalności i wartości tych publikacji. W przypadku publikacji przeglądowej [1] Doktorantka jest drugim autorem uczestniczącym w zbieraniu i opracowaniu publikacji oryginalnych, które zostały omówione w tym artykule. Po analizie oświadczeń współautorów uznaję, że indywidualny wkład Doktorantki w prace stanowiące przedmiot rozprawy doktorskiej spełnia kryteria określone w artykule 13, ustęp 1 i 4, Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki.

Najważniejsze konkluzje z publikacji tworzących cykl zawarte są w rozdziale „Wnioski” stanowiącego część omówienia publikacji. Zgodnie z tymi wnioskami, w ramach pracy doktorskiej opracowano i przetestowano nową metodę ilościową multipleksowej analizy potencjalnych biomarkerów śródbłonka naczyniowego. Opracowaną metodę wykorzystano do analizy tych biomarkerów w szeregu rzeczywistych modeli, w których obserwowane są dysfunkcje śródbłonka naczyniowego. Stwierdzono znaczną heterogenność zaburzeń struktury i funkcji śródbłonka uzależnioną od zastosowanego czynnika etiologicznego. Wszystkie wnioski znajdują pełne uzasadnienie w wynikach przedstawionych w publikacjach tworzących cykl.

Docenić należy kompleksowe i zgodne z „regułami sztuki” podejście metodyczne wykorzystane w doświadczeniach, których efektem jest opracowanie i przetestowanie zaproponowanej metody analitycznej. Dzięki takiemu podejściu proponowana metoda analityczna jest wiarygodna i może być wykorzystana w praktyce diagnostycznej. Należy również zwrócić uwagę, że bardzo duża część pracy włożonej przez Doktorantkę w opracowanie i optymalizację procedury analitycznej pozostaje niewidoczna, gdyż z powodów praktycznych wyniki takich badań nie są umieszczane w publikacjach. Przykładem takich badań, jedynie zasygnalizowanych w omówieniu cyklu (Tabela 4), może być kwestia metodyki wiarygodnego pomiaru ilości białka w próbce.

## Uwagi krytyczne.

Zadaniem recenzenta rozprawy doktorskiej opartej o cykl publikacji nie jest ponowne zrecenzowanie tych prac. Musze jednak zgłosić kilka uwag dotyczących aspektów, które w mojej opinii zostały niewystarczająco uwzględnione w tych pracach.

- 1) Metoda LC/MS-MRM opracowana przez Doktorantkę bazuje na sekwencji aminokwasowej białek myszy (stosowane znaczniki dopasowane są do peptydów mysich). W przypadku znacznej części badanych peptydów ich sekwencja w homologicznych białkach ludzkich jest inna (zazwyczaj jest to różnica jednego aminokwasu). Test mający mieć znaczenie diagnostyczne powinien być dostosowany przede wszystkim do analizy białek ludzkich. Z tego powodu brakuje mi odpowiedniego odniesienia się do tej sprawy (np. poprzez wyjaśnienie, że „znaczniki mysie” mogą być w pełni stosowane w analizie białek ludzkich) w pracy [3], w której takie badanie przeprowadzono (oraz w omówieniu cyklu).
- 2) W metodyce podanej w pracy [2] i [3] mowa jest o „wejściowej” ilości białka całkowitego wykorzystywanej w procedurze analitycznej. Brakuje jednak informacji jaka jest wydajność całej procedury analitycznej, tj. jaka „wyjściowa” całkowita ilość peptydów tryptycznych pozostaje po całej procedurze i jaka ich ilość zostaje nastrzyknięta na LC w 2  $\mu$ l „rzeczywistej” próbki (np. próbki osocza). Doktorantka analizuje co prawda „recovery” metody, jednak przeprowadzone badanie dotyczy wyłącznie wydajności wiązania/elucji do złoża SPE (i zostało przeprowadzone w sztucznym układzie „arteficial plasma”).
- 3) Opracowany test nakierowany jest na „rozpuszczalne” (*soluble*) formy części badanych białek, będące zazwyczaj produktami proteolitycznego trawienia białek „wyjściowych”. Można założyć, że wiedza o tym została wykorzystana przez Doktorantkę w trakcie wyszukiwania peptydów docelowych, jednak w pracach [2] i [3] brak jasnej informacji na ten temat. W pracy [3] te same peptydy docelowe zostały wykorzystane w badaniu białek obecnych w osoczu i w materiale tkankowym (płuco i rak piersi), więc na ich podstawie nie jest możliwe odróżnienie form rozpuszczalnych i wyjściowych. W związku z tym uznanie, że białka wykrywane w tkance są wyłącznie białkami „wyjściowymi” (opisanymi jako VCAM-1 czy E-sel) jest pewną nadinterpretacją. W tkance obecny jest przecież istotny komponent naczyniowy, nie można więc wykluczyć, że część białek wykrywanych w materiale tkankowym to formy rozpuszczalne.

- 4) W pracy [4] opis metodyki jest bardzo lakoniczny i odsyła czytelnika do metodyki opisanej szczegółowo w pracach [2] i [3]. Jest to jednak odesłanie niejednoznaczne, ponieważ w obu tych pracach stosowany jest inny system znaczników wewnętrznych.

Teksty stanowiące omówienie cyklu prac (wstęp i podsumowanie) oraz streszczenie pracy napisane są bardzo czytelnie i poprawnie, bez dostrzegalnych błędów merytorycznych czy językowych (choć pewną irytację może budzić wymienne, i chyba losowe, stosowanie pełnych nazw i skrótów nazw badanych białek). Szkoda jednak, że w prezentowanym omówieniu/podsumowaniu cyklu nie znalazło się miejsce dla szczegółowo opisanej kompletnej procedury analitycznej przedstawionej w formie „laboratory protocol”, umożliwiającej jej bezpośrednie wykorzystanie w laboratorium. Roli tej nie spełnia zbyt ogólnikowa informacja zawarta w Tabeli 2 (w której brakuje m.in. objętości reagentów)

**Podsumowanie.** Recenzowana rozprawa doktorska składa się z cyklu publikacji o wysokiej wartości merytorycznej. Indywidualny udział Doktorantki w pracach tworzących rozprawę stanowi potwierdzenie jej wiedzy i umiejętności prowadzenia pracy naukowej.

**Wniosek końcowy:**

W mojej opinii przedstawiona rozprawa doktorska pani Joanny Suraj w pełni 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. W związku z tym wnoszę do Rady Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego o kontynuowanie postępowania o nadanie pani Joanny Suraj stopnia doktora.

Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pani Joanny Suraj. Praca w mojej opinii spełnia kryteria określone w punkcie I.1, podpunkty a, b, c i d, regulaminu wyróżniania rozpraw doktorskich Wydziału Farmaceutycznego UJCM z 26 marca 2018.



prof. dr hab. Piotr Widlak  
Centrum Onkologii - Instytut, Gliwice

1 lipca 2019