

Recenzja rozprawy doktorskiej pani Aleksandry Ewy Boguckiej pt. „*Analiza ilościowa białek związanych z jakością oocyta w ludzkim płynie pęcherzykowym za pomocą metod spektrometrii mas bez znakowania: rozwinięcie metodologii odpowiedniej do badań klinicznych*”. Praca przygotowana pod opieką prof. dr hab. Stanisława Ołdzieja w Laboratorium Struktury Biopolimerów Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed.

Przedmiotem pracy doktorskiej było opracowanie i przetestowanie kompletnej i wielowariantowej metodyki analizy ilościowej białek obecnych w proteomie ludzkiego płynu pęcherzykowego (hFF). Ocena jakości oocytów ludzkich z wykorzystaniem biomarkerów molekularnych jest nowatorskim podejściem diagnostycznym mogącym w istotny sposób udoskonalić procedury wspomaganego zapłodnienia, czyli zagadnienia medycznego mającego bez wątpienia coraz większe znaczenie społeczne. Z tego też względu oryginalny temat podjęty przez Doktorantkę dotyczy bardzo ważnego zagadnienia o potencjalnym znaczeniu praktycznym. Co więcej, doktorantka podjęła się zadania trudnego i być może nieefektownego, ale z pewnością mającego decydujące znaczenie dla jakości i wiarygodności wyników analiz proteomicznych. Dlatego wybór tematu rozprawy budzi moje uznanie. Należy również zwrócić uwagę, że projekt doktorski przeprowadzono w ramach kilku grantów badawczych, co stanowi potwierdzenie dużego znaczenia tematyki podjętej przez Doktorantkę.

Rozprawa doktorska pani Aleksandry Ewy Boguckiej ma formę zbioru opublikowanych powiązanych tematycznie artykułów naukowych, uzupełnionych wprowadzeniem, omówieniem wyników i podsumowaniem, a także wymaganym streszczeniem. Cała rozprawa została przygotowana w języku angielskim, a jej tytuł to *Label-free mass spectrometry quantification of proteins linked to the oocyte quality in human follicular fluid: development of suitable methodology for clinical studies*. W skład cyklu wchodzi trzy publikacje doświadczalne opublikowane w latach 2017-2021:

- [praca I] **Lewandowska, A.E.**; Macur, K.; Czaplewska, P.; Liss, J.; Łukaszuk, K.; Ołdziej, S. Qualitative and Quantitative Analysis of Proteome and Peptidome of Human Follicular Fluid Using Multiple Samples from Single Donor with LC-MS and SWATH Methodology. *J. Proteome Res.* 2017, 16, 3053-3067. doi:10.1021/acs.jproteome.7b00366
- [praca II] **Lewandowska, A.E.**; Macur, K.; Czaplewska, P.; Liss, J.; Łukaszuk, K.; Ołdziej, S. Human Follicular Fluid Proteomic and Peptidomic Composition Quantitative Studies by SWATH-MS Methodology. Applicability of High PH RP-HPLC Fractionation. *J. Proteomics* 2019, 191, 131–142. doi:10.1016/j.jprot.2018.03.010

[praca III] **Lewandowska, A.E.**; Fel, A.; Thiel, M.; Czaplewska, P.; Łukaszuk, K.; Wiśniewski, J.R.; Ołdziej, S. Compatibility of Distinct Label-Free Proteomic Workflows in Absolute Quantification of Proteins Linked to the Oocyte Quality in Human Follicular Fluid. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 7415. doi:10.3390/ijms22147415

Do druku pn. „*Doctoral Thesis*”, jako załącznik 1 (*Attachment 1*) zostały dołączone publikacje tworzące zbiór. Ponadto, jako załącznik 2 (*Attachment 2*), zostały przedstawione oświadczenia współautorów prac określające ich udział w powstaniu publikacji tworzących zbiór. Poważną wadą przedstawionej dokumentacji jest brak materiałów uzupełniających (*Supplementary Materials*) do publikacji tworzących cykl. Rozumiem problemy praktyczne związane z prezentacją takich danych, jednak Doktorantka powinna znaleźć sposób na ich dołączenie do dokumentacji (np. w formie nośnika elektronicznego). Brak jakiegokolwiek rozwiązania tej kwestii uniemożliwia Recenzentowi zapoznanie się z bardzo ważną częścią osiągnięcia Doktorantki (z przyczyn oczywistych recenzja powinna dotyczyć tylko materiałów formalnie stanowiących zawartość rozprawy).

#### ***Omówienie najważniejszych elementów zawartych w pracach tworzących zbiór.***

**Praca I.** W pracy tej autorzy przedstawili wyniki analizy proteomu (HMW; high-molecular weight) i peptydomu (LMW; low-molecular weight) płynu pęcherzykowego (hFF, *human follicular fluid*) zebranego z 12 próbek oocytów pobranych do procedury zapłodnienia *in vitro* (IVF) – po trzy oocyty od czterech donorów. Głównym przedmiotem pracy było opracowanie procedury analizy proteomicznej wykorzystującej system mikroHPLC sprzężony ze spektrometrem mas z analizatorem hybrydowym potrójny kwadrupol/analizator czasu przelotu (ToF) działającym w trybie analizy niezależnej od danych (DIA; *data independent analysis*) typu SWAT. Opracowana procedura analityczna umożliwiła identyfikacje łącznie 158 białek obecnych w hFF. Ponadto, badacze wykazali różnice ilościowe w składzie białkowym hFF zarówno pomiędzy różnymi próbkami pochodzącymi od tego samego dawcy, jak i pomiędzy próbkami pochodzącymi od różnych dawców. Jak sugerują autorzy, wskazuje to na „biomarkerowy potencjał” białek obecnych w hFF.

Uwaga krytyczna. Chociaż zadaniem recenzenta rozprawy doktorskiej opartej o wcześniej opublikowane prace nie jest ponowna recenzja tych prac, nie mogę jednak nie zwrócić uwagi na oczywisty błąd w wyborze testów statystycznych użytych do oceny istotności różnic między porównywanymi grupami próbek – zastosowanie w tym konkretnym kontekście testu t było niepoprawne. Ponadto, w pracy brakuje informacji o różnicach między powtórzeniami technicznymi analizy tego samego preparatu. Nie wiemy więc czy zaobserwowane różnice

między hFF z różnych oocytów od tego samego donora są porównywalne z różnicami między powtórzeniami technicznymi tego samego preparatu hFF. W tej sytuacji sugerowany potencjał diagnostyczny porównania różnych preparatów hFF od tego samego dawcy pozostaje nie udowodniony.

**Praca II.** W pracy tej autorzy przedstawili wyniki analiz proteomicznych preparatów hFF wykorzystujących biblioteki peptydów uzyskane za pomocą różnych procedur analitycznych. O jakość analiz proteomicznych prowadzonych techniką SWAT-MS, m.in. o liczbie zidentyfikowanych białek, decyduje kompletność referencyjnej biblioteki peptydów wykorzystywanej do annotacji peptydów w poszczególnych analizach. Maksymalizacja tzw. „pokrycia proteomu” wymaga zastosowania kombinacji różnych technik przygotowania (m.in. trawienia enzymami proteolitycznymi) i frakcjonowania złożonej próbki przed analizą w spektrometrze mas. W prezentowanej pracy autorzy zastosowali 9 różnych procedur przygotowania próbek HMW i 7 różnych procedur przygotowania próbek LMW, uzyskując odpowiednio 10 i 8 bibliotek peptydów (łącznie z bibliotekami stanowiącymi sumę wszystkich „pod-bibliotek”). Zastosowanie tych bibliotek w analizie SWAT-MS umożliwiło identyfikację 400 białek.

Uwaga krytyczna. Istotny element pracy metodycznej jaką są szczegóły zastosowanych procedur przygotowania i frakcjonowania próbek wykorzystanych do uzyskania bibliotek peptydów zawarte są jedynie w suplemencie do publikacji (*Supplementary Data*), który nie został włączony do rozprawy doktorskiej.

**Praca III.** W pracy tej autorzy porównali możliwości identyfikacji białek hFF za pomocą dwóch różnych systemów analizy proteomicznej: użytego wcześniej chromatografu mikroHPLC sprzężonego ze spektrometrem mas z hybrydowym analizatorem TripleQuad/ToF oraz chromatografu nanoLC sprzężonego ze spektrometrem mas z hybrydowym analizatorem kwadrupol/Orbitrap. Oba podejścia analityczne umożliwiły łączną identyfikację ponad 1000 białek (frakcja HMW) w każdym systemie. Duża liczba identyfikacji za pomocą pierwszego systemu była możliwa dzięki wcześniejszej optymalizacji bibliotek peptydowych. Taka optymalizacja bibliotek jest czasochłonnym i pracochłonnym etapem procedury, jednak w przypadku masowych analiz planowanych przez zespół autorów jest niewątpliwie racjonalnym etapem badań. Drugim elementem przedstawionej pracy było zastosowanie dwóch wspomnianych wcześniej systemów analitycznych do wykrycia różnic ilościowych w składzie hFF zależnych od stadium rozwojowego oocytów. Przeprowadzona

analiza umożliwiła identyfikację szeregu białek, których poziom zmienia się wraz z rozwojem oocytów.

Uwaga krytyczna. Pewne wątpliwości budzi celowość bezpośredniego porównywania rzeczy nieporównywalnych, tj. systemu mikroHPLC-TripleQuad/ToF działającego w trybie DIA oraz systemu nanoLC-Q/Orbitrap działającego w trybie DDA. Do lektury tej części Pracy III, która dotyczyła związków między stanem proteomu hFF a stadium rozwoju oocytów podszedłem z największym zainteresowaniem. I nie mogę ukryć, że spotkało mnie tu duże rozczarowanie wynikające ze sposobu prezentacji danych. Niestety, zarówno charakterystyka kliniczna materiału jak i wyniki przeprowadzonych analiz o charakterze „biologicznym” zostały potraktowane marginalnie i umieszczone w suplemencie pracy (*Supplementary Materials*), który nie znalazł się w rozprawie doktorskiej (w tekście pracy różnice między grupami oocytów zostały przedstawione jedynie w kontekście różnic między systemami analitycznymi). W pełni rozumiem, że głównym celem pracy było „rozwińnięcie metodologii”, jednak potraktowanie po „macoszemu” aspektu klinicznego/biologicznego wyników pozostawia duży niedosyt u takiego jak ja czytelnika zainteresowanego przede wszystkim znaczeniem biologicznym danych proteomicznych.

Wszystkie prace tworzące cykl zostały opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym (dwie prace w czasopiśmie z Q1 i jedna w czasopiśmie z Q2 w swoich dziedzinach; łączny IF czasopism, w których opublikowano prace stanowiące rozprawę doktorską wynosi ok. 14). Praca [I] opublikowana w roku 2017 była do tej pory cytowana 17 razy, a praca [II] opublikowana w roku 2019 była do tej pory cytowana 11 razy, co świadczy o ich dobrym odbiorze. Wskaźniki te stanowią niezależne potwierdzenie wysokiej wartości merytorycznej badań stanowiących treść pracy doktorskiej Kandydatki. Należy również dodać, że Doktorantka jest współautorem czterech innych prac pełnotekstowych opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym (łączny IF czasopism, w których opublikowano te prace to ponad 12). Wszystkie prace, których autorem i współautorem jest Doktorantka były do tej pory cytowane ponad 43 razy, a jej indeks H wynosi 3 (wg. ISI WoS, dostęp 11 marca 2022)

### ***Indywidualny udział Doktorantki w pracach tworzących zbiór.***

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 wszystkich publikacji zawartych w zbiorze Doktorantka jest pierwszym autorem. Zgodnie oświadczeniem Doktorantki była ona odpowiedzialna za eksperymentalną część pracy, tj. opracowanie procedury analitycznej i przeprowadzenie analiz proteomicznych, oraz przygotowanie wyjściowych manuskryptów prac. Oświadczenie to jest spójne z oświadczeniami współautorów. Należy więc uznać, że indywidualny wkład Doktorantki w prace wieloautorskie stanowiące przedmiot rozprawy doktorskiej spełnia kryteria określone w ustawie.

***Ocena tekstu stanowiącego wprowadzenie i omówienie publikacji tworzących zbiór będących rozprawą doktorską.***

- 1) Część *Introduction* stanowi doskonale wprowadzenie do tematyki pracy i mogłaby być wykorzystana wprost jako ciekawa i dobrze napisana praca przeglądowa.
- 2) Część *Aim* poprawnie określa cel i przedmiot prowadzonych prac (i jest dobrze uzasadniony w części *Introduction*).
- 3) Część *Results and Discussion* skrótowo ale czytelnie przedstawia wyniki zawarte publikacjach tworzących zbiór.
- 4) Część *Conclusions and Future Perspectives* zawiera 12 zdań/punktów. Dziesięć punktów ma pełne uzasadnienie w prezentowanych danych, jednak 2 budzą pewne wątpliwości:

*“Both workflows have a high degree of compatibility in obtained results; therefore, the choice of a suitable methodology for a large-scale clinical study directed at elucidation of oocyte quality biomarkers should be dictated by the available resources and anticipated depth of the analysis”*. Komentarz: Autorzy rzeczywiście wykazali wystarczającą wysoką korelację pomiarów ilościowych badanych białek w obu zastosowanych podejściach proteomicznych (Rycina 4B na stronie 33). Tym niemniej niesatysfakcjonująca była liczba wspólnych białek różnicujących grupy oocytów wykazana oboma technikami (tylko jedno białko wykazujące taki sam charakter różnic w obu podejściach analitycznych).

*“Both workflows have been successfully tested in small-scale clinical studies, and potential candidates for proteins associated with oocyte maturity and blastocyst development have been determined and could be further validated in future studies”*. Komentarz: Prace tworzące zbiór z pewnością w istotny sposób rozszerzają wiedzę na temat składu molekularnego hFF (m.in. identyfikacja kilkudziesięciu białek nie opisanych wcześniej w żadnej pracy dotyczącej tego typu materiału biologicznego). Jednak biologiczny/kliniczny aspekt wyników uzyskanych przez Doktorantkę nie został w mojej opinii przedstawiony/wyeksponowany w tych pracach w wystarczający sposób.

## **Podsumowanie.**

Wybrana przez Doktorantkę tematyka dotyczyła bardzo niewdzięcznego i „niemedialnego” problemu – opracowania optymalnych protokołów analitycznych do badań proteomicznych. Chociaż jakość analiz proteomicznych i wiarygodność uzyskanych wyników zależy od jakości protokołów przygotowania próbki, ten element procedury badawczej jest często niedoceniany (a nawet nieświadomiany) przez „końcowych odbiorców” wyników tych analiz. Dlatego z uznaniem należy podejść do tego wyboru. Recenzowana rozprawa doktorska składa się z cyklu publikacji o wysokiej wartości merytorycznej, w których umieszczono wyniki o znaczeniu aplikacyjnym (procedury analityczne do „masowych” badań diagnostycznych). Na podkreślenie zasługuje zwiększająca się doskonałość metodyczna kolejnych prac, dokumentowana coraz większą liczbą identyfikowanych białek (i korektą błędów związanych z wyborem narzędzi statystycznych). 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 Aleksandry Ewy Boguckiej 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 Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o kontynuowanie postępowania i nadanie Jej stopnia doktora.

Jednocześnie, mając na względzie wysoką ocenę rozprawy (patrz Podsumowanie), wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pani Aleksandry Ewy Boguckiej.



prof. dr hab. Piotr Widłak

15 marca 2022