

Prof. dr hab. n. med. Joanna Majerczak  
Katedra Fizjologii Wysiłku i Bioenergetyki Mięśni  
Wydział Nauk o Zdrowiu  
Uniwersytet Jagielloński - Collegium Medicum  
ul. Skawińska 8, 31-066 Kraków  
e-mail: joanna.majerczak@uj.edu.pl

Kraków, 12. 04. 2024 r.

Ocena  
osiągnięcia naukowego  
pt.: „Nowe metody bioanalityczne do badań metabolizmu tryptofanu  
szlakiem kinureninowym”  
oraz dorobku naukowego doktor Ilony Sadok-  
adiunkta w Katedrze Chemii, Instytutu Nauk Biologicznych, Wydziału Medycznego  
Katolickiego Uniwersytetu Medycznego im. Jana Pawła II w Lublinie

Postępowanie w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego, w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki biologiczne został złożony przez dr Ilonę Sadok w Katolickim Uniwersytecie Medycznym w Lublinie 13 września 2023 r. Decyzją Rady Instytutu Nauk Medycznych, Wydziału Medycznego KUL z dnia 25.01.2024 roku powołano komisję habilitacyjną.

Dr Ilona Sadok przedstawiła do oceny m.in. autoreferat w języku polskim, kopie dyplomów, ankietę osiągnięć naukowych, wykaz wszystkich publikacji wraz z danymi bibliometrycznymi, kopie publikacji wchodzących w skład cyklu monotematycznych publikacji pt.: „Nowe metody bioanalityczne do badań metabolizmu tryptofanu szlakiem kinureninowym”.

Poniższa recenzja została przygotowana na podstawie wymogów określonych w ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku, Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.

## 1. Przebieg kariery zawodowej i kariery naukowej

Dr Ilona Sadok 2013 roku ukończyła studia wyższe magisterskie (chemia, specjalność analityka medyczna) na Wydziale Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej. Stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk chemicznych, w dyscyplinie chemia Kandydatka uzyskała w 2017 roku decyzją Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej na podstawie rozprawy doktorskiej pt.: „Zastosowanie elektrod modyfikowanych polimerem i metalem w oznaczeniach woltamperometrycznych”. Promotorem rozprawy doktorskiej była prof. dr hab. Katarzyna Tyszczyk-Rotko, recenzentami dr hab. Beata Krasnodębska-Ostręga i prof. dr hab. inż. Wojciech Wróblewski. Rozprawa doktorska dr Ilony Sadok została wyróżniona przez Radę Wydziału Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

Od początku swojej kariery zawodowej/naukowej dr Ilona Sadok zatrudniona jest w Katolickim Uniwersytecie Lubelskim. W okresie od 2016 do 2018 roku zatrudniona była kolejno jako referent techniczny i starszy referent techniczny w Interdyscyplinarnym Centrum Badań Naukowych, Wydziału Biotechnologii i Nauk o Środowisku, KUL. Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora Kandydatka była zatrudniona na stanowisku asystenta naukowego (2018-2020), następnie adiunkta w Interdyscyplinarnym Centrum Badań Naukowych, Wydziału Biotechnologii i Nauk o Środowisku. Od

2022 roku dr Ilona Sadok jest zatrudniona na stanowisku adiunkta w Katedrze Chemii, Instytutu Nauk Biologicznych, Wydziału Medycznego KUL, gdzie pracuje do dzisiaj.

**Podsumowując:** Kandydatka spełnia przesłankę o której mowa w art. 219, ust. 1, Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z 20 lipca 2018 roku z późniejszymi zmianami dotyczącą wymogu posiadania stopnia naukowego doktora.

## **2. Analiza bibliometryczna dorobku naukowego w oparciu o bazy danych**

W przedłożonym do oceny podsumowaniu dorobku naukowego liczba cytowań ogółem w momencie złożenia dokumentacji (3.09.2023r) wynosiła **412**, a liczba cytowań bez autocytowań wynosiła **391**. Indeks Hirscha wynosi **13**. Obecnie (04. 2024) liczba cytowań wynosi **538**.

Według przedstawionego do oceny spisu publikacji na łączny dorobek naukowy dr Ilony Sadok (2013-2023) składa się autorstwo/współautorstwo:

- a) 37 artykułów naukowych z listy JCR o łącznym *impact factor* wynoszącym **163,71 pkt**, z czego 28 artykułów opublikowanych po uzyskaniu stopnia naukowego doktora (o łącznym IF wynoszącym **131,77**), w tym 8 prac wchodzących w skład monotematycznego cyklu publikacji (*vide* poniżej),
- b) 2 artykuły naukowe opublikowane w czasopismach bez *impact factor* przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

Dorobek ten dopełnia 28 rozdziałów w monografiach (z czego 22 rozdziały nie przekraczają objętościowo 3 stron) oraz 142 streszczenia ze zjazdów (głównie krajowych).

W pracach opublikowanych po uzyskaniu stopnia naukowego doktora zamieszczonych w czasopismach indeksowanych w *Journal Citation Reports* (łącznie 28 publikacji) publikacje zamieszczone w czasopismach wydawnictwa Elsevier stanowią 46% wszystkich prac (łącznie 13 prac), a publikacje zamieszczone w czasopismach wydawnictwa MDPI stanowią 29% (Sensors, Cells, Molecules). Pozostałe 25% publikacji z listy JCR zamieszczono w czasopismach wydawnictw tj. m.in. Springer, Wiley, SAGE.

W publikacjach zamieszczonych w czasopismach JCR, po uzyskaniu stopnia doktora, Kandydatka występuje czternaście razy (50%) jako pierwszy autor, 4 razy (14%) jako autor ostatni.

## **3. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.)**

### **3.1. Ocena osiągnięcia naukowego pt.: „Nowe metody bioanalityczne do badań metabolizmu tryptofanu szlakiem kinureninowym”**

Osiągnięciem naukowym wskazanym przez dr Ilonę Sadok (zgodnie z art. 219 ust 1, pkt 2 i 3 ustawy z dn. 20 lipca 2018 r. (Dz.U. z 2021 poz. 478 ze zm.) jest cykl 8-iu tematycznie powiązanych publikacji

pt.: „Nowe metody bioanalityczne do badań metabolizmu tryptofanu szlakiem kinureninowym” który obejmuje wymienione poniżej publikacje:

1. **Sadok I.**, Gamian A., Staniszevska M., Chromatographic analysis of tryptophan metabolites, *Journal of Separation Science* 40 (2017) 3020-3045, doi: 10.1002/jssc.201700184. (opublikowana przed uzyskaniem tytułu doktora (IF2017 = 2,557; MNiSW = 30 pkt.)
2. **Sadok I.**, Rachwał K., Staniszevska M., Application of the optimized and validated LC-MS method for simultaneous quantification of tryptophan metabolites in culture medium from cancer cells, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 176 (2019) 112805-112816. doi: 10.1016/j.jpba.2019.112805 (IF2019 = 2,983; MNiSW = 100 pkt.)
3. **Sadok I.**, Rachwał K., Staniszevska M., Simultaneous quantification of selected kynurenines analyzed by liquid chromatography mass spectrometry in medium collected from cancer cell cultures, *Journal of Visualized Experiments* 159 (2020) e61031, doi:10.3791/61031 (IF2020 = 1,163; MNiSW = 70 pkt.)
4. **Sadok I.**, Jędruchniewicz K., Rawicz-Pruszyński K., Staniszevska M., UHPLC-ESIMS/MS quantification of relevant substrates and metabolites of the kynurenine pathway present in serum and peritoneal fluid from gastric cancer patients—method development and validation, *International Journal of Molecular Sciences* 22 (2021) 6972-6992, doi: 10.3390/ijms22136972 (IF2021 = 6,208; MEiN = 140 pkt.)
5. **Sadok I.**, Rachwał K., Jonik I., Staniszevska M., Reliable chromatographic assay for measuring of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity in human cancer cells, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 36(1) (2021) 581-592, doi: 10.1080/14756366.2021.1882451 (IF2021 = 5,755; MEiN = 140 pkt.)
6. **Sadok I.**, Staniszevska M., Electrochemical determination of kynurenine pathway metabolites - challenges and perspectives, *Sensors* 21 (2021) 7152 - 7174, doi: 10.3390/s21217152 (IF2021 = 3,847; MEiN = 100 pkt.)
7. **Sadok I.**, Tyszczyk-Rotko K., Mroczka R., Staniszevska M., Simultaneous voltammetric analysis of tryptophan and kynurenine in culture medium from human cancer cells, *Talanta* 209 (2020) 120574 - 120585. doi:10.1016/j.talanta.2019.120574 (IF2020 = 5,339; MNiSW = 100 pkt.)
8. **Sadok I.**, Tyszczyk-Rotko K., Mroczka R., Kozak J., Staniszevska M., Improved voltammetric determination of kynurenine at the nafion covered glassy carbon electrode – application in samples delivered from human cancer cells, *International Journal of Tryptophan Research* 14 (2021) 1-14, doi: 10.1177/11786469211023468 (IF2021 = 4,4; MEiN = 100 pkt.)

Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego zamieszczone zostały w czasopismach z listy JCR, a ich łączny *impact factor* zgodnie z przedłożoną dokumentacją wynosi **32.25 (780 punktów MNiSW/MEiN)**, natomiast łączna liczba cytowań prac cyklu na dzień złożenia dokumentacji wynosiła **87 razy** (wg. Scopus).

Z otrzymanej dokumentacji wynika, że zainteresowania naukowe dr Ilony Sadok od początku jej kariery naukowej związane są z badaniem metabolizmu tryptofanu w próbkach biologicznych i dotyczą prób opracowania nowych metod bioanalitycznych wykorzystywanych w celowanej analizie metabolomicznej (oznaczanie pojedynczego metabolitu istotnego w procesach biologicznych) oraz w analizie profili metabolicznych (oznaczanie metabolitów danego szlaku) ze szczególnym uwzględnieniem szlaku kinureninowego. Publikacje składające się na monotematyczny cykl obejmują a) 2 publikacje poglądowe (publikacja 1 i 6) omawiające metody oznaczania metabolizmu tryptofanu z uwzględnieniem metod chromatograficznych oraz elektrochemicznych; b) 1 publikację metodologiczną z filmem instruktażowym (publikacja 3); c) 5 publikacji oryginalnych.

W publikacjach poglądowych i w autoreferacie Kandydatka opisuje m.in. znaczenie oznaczeń tryptofanu i jego metabolitów a) w materiale biologicznym pochodzącym z hodowli ludzkich komórek nowotworowych oraz b) w płynach ustrojowych. W autoreferacie Habilitantka podkreśla znaczenie metabolizmu tryptofanu w szlaku kinureninowym, zwracając uwagę na rosnące zainteresowanie szlakiem kinureninowym, nie tylko ze względu na to, że 80-95% tryptofanu dostarczanego w diecie jest

przekształcane z powstaniem kinureniny, ale i z tego powodu, iż intermediaty szlaku kinureninowego mają wpływ na wiele fizjologicznych reakcji w organizmie m.in. uczestniczą w odpowiedzi immunologicznej (działanie pro- i przeciwzapalne), mają wpływ na funkcje poznawcze i reakcje metaboliczne. Tryptofan, należący do aminokwasów niezbędnych, w komórkach ssaków podlega przekształcaniu do biologicznie ważnych metabolitów takich jak tryptamina (reakcja dekarboksylacji), kwas indolepirogroonowy (reakcja transaminacji), serotonina (reakcja hydroksylacji) i/lub kinurenina (reakcja utlenianie). Kinurenina powstaje z tryptofanu przy udziale enzymów IDO1-2 (enzym pozawątrobowy) i TDO (enzym wątrobowy) i podlega dalszym przemianom prowadzącym do m.in. a) kwasu kinureninowego (o właściwościach przeciwzapalnych) i b) do kwasu chinolinowego (o właściwościach pro-zapalnych). Kwas chinolinowy jest następnie metabolizowany do kwasu nikotynowego i NAD<sup>+</sup>, który jest m.in. koenzymem wielu ważnych oksydoreduktaz. Właściwości immunomodulacyjne kinureniny są wynikiem jej wpływu na hamowanie proliferacji limfocytów T, obniżenia aktywności komórek NK i komórek dendrytycznych oraz promowaniu różnicowania limfocytów T regulatorowych (Tregs). Zmiany w szlaku kinureninowym przejawiające się zmianą stężeń intermediatów szlaku (np. stosunek kinureniny do tryptofanu), a w konsekwencji ich wpływ prozapalny vs przeciwzapalny czy wpływ neuroprotekcyny vs neurodegeneracyjny występuje w chorobach neurodegeneracyjnych, nowotworowych, czy metabolicznych (m.in. w otyłości, miażdżycy). Zmiany intermediatów w szlaku kinureninowym charakteryzują również proces fizjologicznego starzenia się organizmu.

Analiza tryptofanu i intermediatów szlaku w materiale biologicznym wydaje się być zasadna w celu opracowania nowych terapii i leków. Istotnym zagadaniem staje się zatem dopracowanie metod bioanalitycznych do dokładnego i szybkiego oznaczania tryptofanu i jego metabolitów w próbkach biologicznych (płyny ustrojowe, tkanki, hodowle komórkowe) zarówno w warunkach fizjologicznych jak i patologicznych, co jest przedmiotem przedłożonego cyklu publikacji autorstwa dr Ilony Sadok.

1. Pierwsza z prac cyklu pt.: „*Chromatographic analysis of tryptophan metabolites*” z 2017 roku autorstwa Sadok I., Gamian A., Staniszevska M., w *Journal of Separation Science* (wydawnictwo Wiley) jest publikacją poglądową (liczba cytowanych prac w publikacji wyniosła 164 pozycje). W publikacji omówiono znaczenie tryptofanu dla organizmów żywych oraz metody oznaczania tryptofanu jak i jego metabolitów w materiale biologicznym ze szczególnym uwzględnieniem szlaku kinureninowego. W publikacji zwrócono uwagę na znaczenie oznaczania intermediatów szlaku kinureninowego jako istotnych mediatorów wpływających m.in. na funkcje poznawcze, metaboliczne jak i mające znaczenie w homeostazie immunologicznej i w przebiegu chorób nowotworowych. Głównym celem publikacji było przedstawienie metodologii oznaczania tryptofanu i intermediatów metabolizmu tryptofanu w materiale biologicznym tj. płyny ustrojowe, tkanki i hodowle komórkowe metodami chromatograficznymi (HPLC, LC-MS, LC-MS/MS, GC-MS, GC-MS/MS). W publikacji przedyskutowano kolejno (w oparciu o dane literaturowe) a) metodologię przygotowania próbek do oznaczeń chromatograficznych (m.in. metody odbiałaczania), b) zastosowania różnorodnych standardów wewnętrznych (normalizacji), c) znaczenie oczyszczania analizowanych próbek (SPE) i

porównano skuteczność stosowanych metod analitycznych. W kolejnym rozdziale pracy omówiono zastosowanie metod chromatograficznych w oznaczeniach tryptofanu i jego metabolitów w materiale biologicznym. Praca zakończona jest praktycznymi wskazówkami dotyczącymi wyboru metod chromatograficznych w przypadku oznaczeń tryptofanu i jego metabolitów w próbkach biologicznych. Mianowicie, autorzy konkludują, iż w przypadku gdy niezbędna jest analiza równoczesowa metabolitów tryptofanu metodą z wyboru wydaje się być LC-MS i LC-MS/MS. Jednakże z powodu kosztów oznaczeń i czasochłonnego przygotowania próbek jak i kosztownych standardów wewnętrznych do oznaczeń metodą LC-MS i LC-MS/MS metodą bardziej dostępną dla potrzeb klinicznych wydaje się być chromatografia cieczowa (HPLC) z zastosowaniem różnego rodzaju detektorów (UV, fluorescencyjny).

*Praca ta była cytowana dotąd (Web of Science, 22.03.24) 60 razy (10 autocytowań).*

2. W kolejnej pracy poglądowej z 2021 pt.: *Electrochemical determination of kynurenine pathway metabolites - challenges and perspectives*, autorstwa Sadok I., Staniszewska M., zamieszczonej w czasopiśmie *Sensors* (2021) Habilitantka omawia znaczenie metod elektrochemicznych w oznaczaniu intermediatów szlaku kinureninowego. Celem publikacji było zwrócenie uwagi na zastosowanie czujników elektrochemicznych, które są niskokosztowe, łatwe w użyciu i umożliwiają szybkie oznaczenia interesujących związków w materiale biologicznym. Habilitantka wskazuje, iż zastosowanie czujników elektrochemicznych do badania szlaku kinureninowego nie było dotychczas szeroko stosowane i weryfikowane. Metodą z wyboru (złoty standard) w oznaczaniu metabolitów tryptofanu w próbkach biologicznych jest chromatografia cieczowa połączona ze spektrometrem mas (LC-MS) (zastosowanie metody opisano w publikacji 1). Jednakże, metody elektrochemiczne, ze względu na niskie koszty i łatwość stosowania, wydają się być perspektywiczna metodą oznaczania metabolitów w próbkach biologicznych, stad celowym jest ich udoskonalenie przez m.in. zastosowaniem nowych materiałów elektrodowych oraz opracowanie strategii zwiększenia ich funkcjonalności. Praca ta zawiera opis wyzwań i trudności w oznaczaniu metabolitów tryptofanu w materiale biologicznym z zastosowaniem czujników elektrochemicznych na podstawie dostępnej literatury (103 pozycje literatury).

*Praca ta była cytowana dotąd (Web of Science, 22.03.24) 9 razy (1 autocytowanie).*

3. W pracy pt.: *"Application of the optimized and validated LC-MS method for simultaneous quantification of tryptophan metabolites in culture medium from cancer cells"* *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 176 (2019). Kandydatka przedstawia wyniki analizy 4 głównych intermediatów szlaku kinureninowego tj. Kyn, 3HKyn, 3HAA i XA w mediach zebranych po hodowli ludzkich komórek nowotworowych (raka jajnika i raka piersi). Celem publikacji była optymalizacja warunków pracy spektrometru mas i rozdziału chromatograficznego. W pracy zawarto protokół umożliwiający jednoczesne oznaczanie tych intermediatów z zastosowaniem metody chromatografii cieczowej w połączeniu ze spektrometrem mas typu pojedynczy kwadrupol (LC-MS). Habilitantka uzasadnia wybór metody oznaczania metabolitów szlaku kinureninowego tym, iż wyniki uzyskane z zastosowaniem tej metody są bardziej wiarygodne od tych uzyskanych metodą chromatografii z wykorzystaniem detektorów UV. Praca zawiera wyniki optymalizacji detekcji analitów

w źródle spektrometru mas, rozdziału chromatograficznego, etapu przygotowania próbki, walidacji metody i wyniki analiz próbek. Opracowany protokół posłużył do analizy stężeń metabolitów szlaku kinureninowego wydzielanych przez komórki nowotworowe traktowanych bądź nie (kontrola) produktem glikacji mioglobiny (MB-GA) lub mioglobina o stężeniu 100 ug/mL. Ilościowe oznaczenia stężeń metabolitów zostały wykonane z użyciem krzywych matrycowych wyznaczonych dla każdego metabolitu poprzez analizę serii próbek wyjściowego medium hodowlanego wzbogaconego standardem wewnętrznym oraz różnymi stężeniami analitów. Oznaczone ilości metabolitów były dodatkowo normalizowane na całkowitą ilość białka oznaczanego metodą Bradforda. Badania pozwoliły na opisanie m.in. zróżnicowanej odpowiedzi szlaku kinureninowego komórek raka jajnika w stosunku do komórek raka piersi w odpowiedzi na traktowanie produktem glikacji białek.

*Praca ta była cytowana dotąd (Web of Science, 22.03.24) 17 razy (8 autocytowań).*

4. Praca pt.: *“Simultaneous quantification of selected kynurenines analyzed by liquid chromatography mass spectrometry in medium collected from cancer cell cultures”*, autorstwa Sadok i wsp. (2020) to publikacja zamieszczona w *Journal of Visualized Experiments* zawierająca szczegółowy opis metodyki oznaczania jednoczasowego 4 intermediatów szlaku kinureninowego w mediach zebranych po hodowli ludzkich komórek nowotworowych z wykorzystaniem metody LC-MS. Do publikacji dołączony został film. Praca oparta jest o wyniki przedstawione uprzednio w publikacji zamieszczonej w *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (vide powyżej) z uwzględnieniem uwag dotyczących wykonywanych analiz.

*Praca ta była cytowana dotąd (Web of Science, 22.03.24) 5 razy (4 autocytowania).*

5. Publikacja pt.: *UHPLC-ESIMS/MS quantification of relevant substrates and metabolites of the kynurenine pathway present in serum and peritoneal fluid from gastric cancer patients—method development and validation*, autorstwa Sadok i wsp. (2021) zamieszczona w *International Journal of Molecular Sciences*, zawiera wyniki badań dotyczące oznaczeń metabolitów szlaku kinureninowego w płynach ustrojowych (krew i płyn otrzewnowy) pacjentów z rakiem żołądka. W badaniach wykorzystano metodę LC-MS/MS umożliwiającą analizę wielu metabolitów w relatywnie krótkim czasie. W publikacji przedstawiono protokół jednoczasowego oznaczania 7 metabolitów tj. tryptofanu, kinureniny, 3-hydroksy-L-kinureniny, kwasu kinureninowego, kwasu ksanturenowego, kwasu chilolinowego i nikotynamidu) w 100 uL surowicy. Dodatkowo w pracy opisano protokół oznaczania metabolitów tryptofanu w płynie otrzewnowym - protokół taki nie był dotychczas opracowany. Protokół umożliwia jednoczasowe oznaczenie 9 metabolitów (oprócz wymienionych powyżej 7 metabolitów dodatkowo: kwasu 3-hydroksyantranilowego i kwasu antranilowego). Według Habilitantki oznaczanie stężeń tryptofanu i jego metabolitów w płynie otrzewnowym może być wykorzystane do monitorowania lokalnego zaburzenia metabolizmu tryptofanu w raku żołądka.

*Praca ta była cytowana dotąd (Web of Science, 22.03.24) 16 razy (6 autocytowań).*

6. Publikacja pt.: *„Reliable chromatographic assay for measuring of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity in human cancer cells”* zamieszczona w *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* (2021) stanowi próbę oceny zmian aktywności enzymu IDO1 – enzymu cytoplazmatycznego

szlaku kinureninowego zawierającego hem, który inicjuje katabolizm tryptofanu w szlaku kinureninowym i jest aktywowany przez czynniki pro-zapalne tj. cytokiny. Wysoką aktywność enzymu potwierdzono w raku piersi, jajnika, płuc, trzustki, i wątroby. IDO1 uczestniczy w tworzeniu środowiska immunosupresyjnego poprzez udział w katabolizmie tryptofanu do metabolitów szlaku kinureninowego i może pełnić rolę markera progresji choroby nowotworowej. Względna aktywność enzymu może być wyrażana przez stosunek kinureniny-do-tryptofanu. Celem pracy było zaproponowanie metody bezpośredniego oznaczania aktywności IDO1 w różnych komórkach nowotworowych bazującej na oznaczeniu produkcji L-kinureniny z zastosowaniem HPLC-DAD (*high-pressure liquid chromatography coupled with a diode array detector*). Metoda ta po optymalizacji i walidacji protokołu według autorów może stać się ważnym analitycznym narzędziem do oceny aktywności IDO1 w progresji choroby nowotworowej jak i potencjalnie do badania inhibitorów enzymu (cel terapeutyczny). Jako metodę referencyjną zastosowano UHPLC-MS/MS. W badaniach wykorzystano komórki nowotworowe z linii SK-OV-3 (rak jajnika) oraz MDA-MB-231 (rak piersi) cechujące się różną aktywnością IDO1 tj. wysoką w przypadku komórek linii SK-OV-3 i niższą w przypadku komórek linii MDA-MB-231. W pierwszym etapie przeprowadzono walidację metody HPLC-DAD następnie porównano uzyskane wyniki oznaczania aktywności IDO1 z wynikami uzyskanymi metodą referencyjną (LC-MS/MS) oraz przeprowadzono analizę zmian aktywności IDO1 w komórkach linii SK-OV-3 i MDA-MB-231 w wyniku glikacji. Wyniki badań wskazują m.in. celowość zastosowanej metody (brak istotnej różnicy stężeń metabolitów oznaczanych HPLC-DAD i metoda referencyjną UHPLC-MS/MS, tabela 2) oraz na istotne zróżnicowanie aktywności IDO1 w zależności od rodzaju nowotworu jak i wpływu glikacji na aktywność IDO1 w komórkach linii MDA-MB-231 (rak piersi).

7. Kolejne dwie publikacje cyklu tj. publikacja pt. „*Simultaneous voltammetric analysis of tryptophan and kynurenine in culture medium from human cancer cells,*” zamieszczona w czasopiśmie *Talanta* (publikacja 7) oraz publikacja pt.: *Improved voltammetric determination of kynurenine at the nafion covered glassy carbon electrode – application in samples delivered from human cancer cells,* zamieszczona w *International Journal of Tryptophan Research* (publikacja 8) dotyczą zastosowania woltamperometrii w oznaczaniu tryptofanu i metabolitów szlaku kinureninowego. W publikacjach tych Habilitantka proponuje dwa nowe rozwiązania metodyczne (czujniki elektrochemiczne) umożliwiające selektywne oznaczanie kinureniny w obecności tryptofanu metodą woltamperometrii. Pierwszym z opracowanych czujników była elektroda diamentowa z domieszka boru modyfikowana in situ elektrochemicznie osadzonymi cząstkami bizmutu (BiF-BDDE) (publikacja 7). Aplikacyjność czujnika została wykazana w badaniu tryptofanu i kinureniny w mediach zebranych po hodowli komórek nowotworowych linii SK-OV-3 i MDA-MB-231. Oznaczone stężenia kinureniny czujnikiem były zgodne ze stężeniami tego metabolitu uzyskanymi metodą referencyjną tj. LC-MS. Przewaga oznaczenia kinureniny z zastosowaniem czujnika była związana z brakiem konieczności przygotowania próbki, co upraszcza i skraca w sposób zasadniczy procedurę oznaczenia.

Z kolei w publikacji zamieszczonej w czasopiśmie *International Journal of Tryptophan Research* (publikacja 8) do oceny zawartości kinureniny Kandydatka zastosowała czujnik Nafion/GCE tj. czujnik,

w którym powierzchnia elektrody z węgla została zmodyfikowana szklistą błonką Nafionu, co umożliwia poprawę granicy wykrywalności kinureniny.

Zatem w dwóch ostatnich publikacjach cyklu Habilitantka wykazała możliwość zastosowania czujników elektrochemicznych (BiF/BDDE i Nafion/GCE) do oznaczania kinureniny w próbkach biologicznych (hodowle komórkowe). Jak wskazuje dr Sadok opracowane czujniki elektrochemiczne mogą znaleźć zastosowanie do szybkiej oceny aktywacji szlaku kinureninowego i ilościowego pomiaru kinureniny w próbkach pochodzących z hodowli komórkowej.

*Praca zamieszczona w Talanta była cytowana (Web of Science, 22.03.24) 25 razy (5 autocytoarów).*

*Praca zamieszczona w International Journal of Tryptophan Research była cytowana (Web of Science, 22.03.24) 4 razy (1 autocytoowanie).*

### **Podsumowanie oceny osiągnięcia naukowego pt.: „Nowe metody bioanalityczne do badań metabolizmu tryptofanu szlakiem kinureninowym”**

Wszystkie publikacje (łącznie 8 publikacji, w tym 5 eksperymentalnych, 2 poglądowe, 1 metodologiczna) wchodzące w skład monotematycznego cyklu zostały zamieszczone w czasopismach indeksowanych w *Journal Citation Reports* (Clarivate). Łączna liczba cytowań prac cyklu (Web of Science) wynosi obecnie (22. 03. 24 r.) **139 razy**, z dopuszczalną liczbą (36 razy) autocytoarów (26%). Rosnąca liczba cytowań prac Kandydatki z 87 cytowań prac cyklu (03.09. 2023 r) do 139 cytowań (Web of Science, 22.03.24) świadczy o rosnącym zainteresowaniu środowiska naukowego publikacjami z tego obszaru wiedzy.

Dr Ilona Sadok jest pierwszą autorką we wszystkich publikacjach, a w jednej (publikacja 6) autorem wskazanym do korespondencji. Dr Ilona Sadok deklaruje, że jej udział w przygotowaniu tych publikacji był wiodący i obejmował m.in. tworzenie koncepcji badań, pozyskanie materiału badawczego, udział w przeprowadzeniu badań, udział w analizie i w interpretacji wyników, udział w przygotowaniu oryginalnej wersji manuskryptów oraz ich korekcie. Habilitantka dołączyła do dokumentacji oświadczenia współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie publikacji. Co istotne, dr Ilona Sadok deklaruje, iż jej wkład w część badawczą obejmował m.in.: **a)** wykonanie większości analiz chromatograficznych i elektrochemicznych **b)** koordynowanie prac zespołu w zakresie opracowania i doboru metody analiz chromatograficznych (m.in. HPLC-DAD, LC-MS) i elektrochemicznych w analizie intermediatów szlaku kinureninowego **c)** walidację metod i kontrolę jakości wyników; **d)** interpretację i opracowanie większości wyników.

Należy zwrócić uwagę, iż tematyka i wyniki badań zaprezentowane w cyklu monotematycznych publikacji są spójne. W przedłożonym autoreferacie, który przygotowany jest przejrzyście i starannie, Habilitantka przedstawiła cel naukowy i hipotezy badawcze jak i omówiła wyniki swoich badań.



Z obowiązku Recenzenta chciałabym zwrócić uwagę na następujące kwestie:

1. Wybór i stosowanie standardów wewnętrznych w analizie biochemicznej jest jednym z istotnych elementów wpływających na uzyskane wyniki i ich interpretację. W pracy poglądowej (publikacja 1) dr Ilona Sadok dyskutuje możliwość zastosowania różnych standardów wewnętrznych, jednakże w większości prac oryginalnych stosuje jako standard wewnętrzny (ze względu na koszty) 3-nitrozotyrozynę (np. publikacji 2). 3-nitrozotyrozyna jest markerem stresu nitrozacyjnego i powstaje w procesie nitrowania tyrozyny przez nadtlenoazotyn. Należy zatem wziąć pod uwagę, że w próbkach biologicznych uzyskanych w stanach patologicznych np. przebiegu m.in. chorób zapalnych czy nowotworów wzrost stresu oksydacyjnego/nitrozacyjnego prowadzić może do wzrostu endogennej 3-NT, stąd stosowanie 3-NT jako standardu wewnętrznego w takich przypadkach wydaje się być obarczone błędem. Należy zaznaczyć, iż Habilitantka w publikacji 3 wskazuje na konieczność oceny endogennej 3-nitrotyrozyny, aby uniknąć błędu.
2. W autoreferacie str. 24 paragraf 2, Habilitantka wskazuje, iż komórki nowotworowe linii SK-OV-3 wydzielają więcej kinureniny niż komórki z linii MDA-MB-231 niezależnie od zastosowanych warunków, podczas gdy wyniki przedstawione w publikacji 2 (Rycina 5, str. 9) wskazują odwrotnie tj. komórki linii MDA-MB-231 (komórki raka piersi) stymulowane mioglobina i mioglobina glikowaną zwiększają wydzielanie kinureniny, podczas gdy komórki SK-OV-3 obniżają jej wydzielanie w odpowiedzi na mioglobinę .
3. Podobnie w autoreferacie str. 29 (ostatni paragraf) wyniki aktywności IOD1 w komórkach linii SK-OV-3 (rak jajnika) i MDA-MB-231 (rak piersi) są błędnie przytoczone (porównując z publikacją). Mianowicie w publikacji 4 w Tabeli 2 oraz w tekście (str. 590, publikacja 4) bazalna aktywność IDO1 jest istotnie wyższa w komórkach linii SK-OV-3 w porównaniu do komórek linii MDA-MB-231. W autoreferacie Habilitantka wskazuje aktywność IOD1 na poziomie 0.03 i 15.11 nmol produkcji L-kinureniny/min/mg białka, odpowiednio dla SK-OV-3 (rak jajnika) i MDA-MB-231 (rak piersi) - czyli odwrotnie.
4. Zatem na podstawie ww. wyników (publikacja 4) należałoby wnioskować, iż a) komórki nowotworowe linii SK-OV-3 charakteryzują się wyższą bazalną aktywnością IDO1 w porównaniu do komórek linii MDA-MB-231 co winno być związane b) z wyższą produkcją kinureniny przez te komórki (SK-OV-3) w warunkach stymulacji. Wyniki przedstawione w publikacji 2 (np. Rycina 5 przedstawiająca wydzielanie kinureniny przez komórki SK-OV-3 i MDA-MB-231) wskazują wprawdzie, że efekt stymulacji produkcji kinureniny zależy od rodzaju komórek, ale wydzielanie kinureniny jest wyższe w przypadku stymulowanych komórek MDA-MB-231 ( $p=0.044$ ).
5. Należy dodać, iż powyższe wnioskowanie, a zwłaszcza wniosek o wzroście wydzielania kinureniny przez komórki nowotworowe linii MDA-MB-231 (publikacja 2, Rycina 5), należy traktować ostrożnie, gdyż zastosowana metoda statystyczna (test t-Studenta) do porównań wielokrotnych (grupa kontrolna, grupa MB i grupa MB-GA) jest niewłaściwa. Metodą z wyboru przy porównaniu wydzielania kinureniny przez komórki nowotworowe w różnych warunkach (traktowane lub nie

glikowaną mioglobina) winna być ANOVA lub wyniki testu t-Studenta należy przedstawić po zastosowaniu odpowiednich poprawek.

6. W autoreferacie znalazły się błędy stylistyczne np. stwierdzenie „pojedyncze donosy” zamiast „pojedyncze doniesienia” (str. 18, 30, 35) czy też niefortunne w języku polskim określenie cytując...” pewne wyzwania analityczne nadal wymagają adresacji” (str. 19).

**Wniosek:** Uwagi przedstawione powyżej nie umniejszają wartości cyklu publikacji, stąd przedłożone do oceny osiągnięcia naukowe dr Ilony Sadok pt.: „*Nowe metody bioanalityczne do badań metabolizmu tryptofanu szlakiem kinureninowym*” złożone z 8-ciu publikacji oceniam pozytywnie.

### **3.2. Wybrane publikacje naukowe z wyłączeniem publikacji przedstawionych przez dr Ilonę Sadok jako osiągnięcie naukowe**

Dr Ilona Sadok jest współautorką prac dotyczących **a)** badania profili metabolicznych pacjentów o różnym stopniu zaawansowania raka żołądka oraz oceny potencjału metabolitów szlaku kinureninowego jako biomarkerów zaawansowania choroby nowotworowej (Gęca i wsp. *International Journal of Tryptophan Research* 15; 2022; 1-10; **b)** badania metabolizmu tryptofanu w szlaku kinureninowym we krwi kobiet otyłych z cukrzycą typu 2 w średnim wieku (*Metabolites* 12; 2022; 492-503). Ciekawym aspektem badań Habilitantki są prace z zakresu fizjologii wysiłku tj. analiza stężeń tryptofanu i jego metabolitów po wysiłku o różnej intensywności i czasie trwania u koni (krótkotrwałym o wysokiej intensywności oraz wysiłku wytrzymałościowym) (Kędziński i wsp. *The International Journal of Animal Bioscience* 15; 2021: 100377-100383 oraz Staniszevska i wsp. *Pharmaceuticals* 16:2023; 107-116).

### **4. Udział w stażach naukowych, współpraca z instytucjami naukowymi, szkolenia zawodowe**

Dr Ilona Sadok odbyła 3.5 miesięczny staż naukowy (krajowy) w Katedrze Epizootologii i Klinice Chorób Zakaźnych UP w Lublinie (pod kierunkiem dr Katarzyny Michalak), w czasie którego prowadziła badania z zakresu identyfikacji mikroorganizmów i białek z wykorzystaniem techniki MALDI-TOF. Ponadto odbyła krótkoterminowy (3-tygodniowy) staż naukowy (8-25.05.2019 r.) w ramach programu PROM - w uznanym ośrodku badań proteomicznych tj. w Departament of Proteomics and Signal Transduction, Max-Planck Institute of Biochemistry w Martinsried, Niemcy, gdzie prowadziła analizy z zakresu proteomiki z zastosowaniem systemów LC-MS w zespole prof. Jacka Wiśniewskiego.

**Podsumowanie:** Wprawdzie Kandydatka nie wykazuje w swojej karierze naukowej długoterminowych (>6 miesięcy) staży naukowych, jednakże krótkoterminowa wizyta robocza w Max-Planck Institute of Biochemistry w Martinsried zaowocowała wspólną publikacją autorstwa Wiśniewski J.R., Zettl K., Plicht M., Rysiewicz B., Sadok I., pt.: ‘*Shotgun*’ proteomic analyses without alkylation of cysteine, *Analytica Chimica Acta* 1100 (2020) 131-137. doi: 10.1016/j.aca.2019.12.007. (IF<sub>2020</sub> = 5,997; MNiSW = 100).

## 5. Udział w projektach badawczych i osiągnięcia projektowe

Dr Ilona Sadok w 2018/2019 była kierownikiem projektu Miniatura 2 pt.: „Ocena możliwości zastosowania voltamperometrii w analizie metabolitów tryptofanu (kinurenin)”(2018/02/X/ST4/00187). Habilitantka pełniła również funkcję wykonawcy (2018-2023) w zakończonym projekcie OPUS 13 (2017/25/B/NZ4/01198) pt.: „Udział glikacji i szlaku kinureninowego w modulowaniu środowiska nowotworowego”. Obecnie (2023-2026) jest wykonawcą w projekcie PRELUDIUM 21 pt.: „Lokalne i ogólnoustrojowe metabolity tryptofanu jako biomarkery raka żołądka” (2022/45/N/NZ5/01753). Dr Ilona Sadok pięciokrotnie była wykonawcą w projektach finansowanych przez KUL (subwencja na naukę oraz działalność statutowa), a czterokrotnie pełniła rolę kierownika w tego typu projektach, w tym w jednym z projektów pt.: „Ocena wpływu zagrożeń środowiskowych na poziom stresu u dzikich zwierząt z wykorzystaniem metody LC-MS/MS”, współpracowała z Swedish University of Agricultural Sciences. Habilitantka była również koordynatorem merytorycznym projektu pt.: „Studenckie Koła Naukowe tworzą Innowacje”: „Antybiotykooporność bakterii: globalne wyzwanie - lokalne działanie” (SKN/SP/570395/2023) finansowanego przez MEiN (2023-2024).

## 6. Osiągnięcia dydaktyczne i recenzje w czasopismach naukowych

Dr Ilona Sadok jest pracownikiem badawczym i nie prowadzi zajęć dydaktycznych. Była promotorem 1 pracy licencjackiej oraz recenzentką 4 prac licencjackich i 2 prac magisterskich. Ponadto, sprawowała opiekę nad 2 wolontariuszami i 7 studentami odbywającymi praktykę studencką w Pracowni Zastosowań Metod Separacji i Spektroskopii KUL. Od 2022 roku pełni funkcję kuratora Koła Naukowego Biotechnologii KUL, działającego przy Instytucie nauk Biologicznych Wydziału Medycznego KUL.

Dr Ilona Sadok była recenzentem ok. 37 publikacji w czasopismach międzynarodowych z IF tj. m.in. Food Chemistry (4), International Journal of Molecular Sciences (3), Talanta (1), International Journal of Tryptophan Research (2), Journal of Visualized Experiments (1), Journal of Food and Nutrition Research (1), Toxins (4), International Journal of Environmental Research and Public Health (1), Sensors (1).

Habilitantka trzykrotnie pełniła funkcję Guest Editor w czasopiśmie Sensors (MDPI): a) wydania specjalnego (ISSN: 1424-8220) pt.: „*Electrochemical Sensors for Determination of Biomolecules*” (2021–2022) przy współpracy z prof. Magdalena Staniszewska; b) wydania specjalnego czasopisma (ISSN: 1424-8220) pt.: „*Recent Advances in Electrochemical Sensors for Detection of Biomolecules*” (2023); c) wydania specjalnego (ISSN: 1424-8220) pt.: „*Nanomaterials-Based Electrochemical Sensors*” (2023 r.) przy współpracy z dr Angeliki Brouzgou (University of Thessaly, Grecja).

**Podsumowanie:** jak wynika z dokumentacji Kandydatka jako pracownik badawczy nie ma doświadczenia dydaktycznego. Doświadczenie recenzenckie dr Ilony Sadok oceniam wysoko.

## 7. Osiągnięcia organizacyjne, popularyzujące naukę i członkostwo w towarzystwach naukowych

Dr Ilona Sadok wielokrotnie pełniła funkcję współorganizatora i kierownika warsztatów organizowanych w ramach Nocy Biologów, Lubelskiego Festiwalu Nauki. Uczestniczyła również w promocji badań (wywiady dla Polskiego Radia Lublin i TVP Lublin) realizowanych pod jej kierunkiem przez członków Koła Naukowego Biotechnologii KUL.

Dr Ilona Sadok była członkiem Komitetu Organizacyjnego V Zjazdu Naukowego Polskiego Towarzystwa Biologii Medycznej „Biologia-Medycyna-Terapia” odbywającej się w Centrum Transferu Wiedzy KUL, Lublin, 15-17.09.2022 r. Kandydatka była również członkiem Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego (2013-2019 r.). Obecnie jest członkiem Sekcji Elektrochemicznej Polskiego Towarzystwa Chemicznego (od kwietnia 2019 r.).

**Podsumowanie:** działalność organizacyjną Kandydatki oceniam wysoko.

## 8. Nagrody i wyróżnienia

W 2017 roku otrzymała Nagrodę Organizacyjną Rektora KUL, a w 2021 i 2022 indywidualną Nagrodę Rektora KUL za osiągnięcia naukowe.

### Wnioski końcowe:

Po zapoznaniu się z dokumentacją przedłożoną przez dr Ilonę Sadok, niniejszym stwierdzam, że osiągnięcie naukowe pt.: „*Nowe metody bioanalityczne do badań metabolizmu tryptofanu szlakiem kinureninowym*” i dorobek naukowy Kandydatki spełnia wymagania stawiane kandydatom do stopnia doktora habilitowanego **w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie biologia medyczna** zgodnie z art. 219 ust 1, pkt 2 i 3 ustawy z dn. 20 lipca 2018 r. (Dz.U. z 2021 poz. 478 ze zm.).



Kraków, 12 kwietnia 2024 r.