



Dr hab. Daria Augustyniak

Wrocław 2021-07-28

daria.augustyniak@uwr.edu.pl

## RECENZJA

### rozprawy doktorskiej mgr inż. Kingi Gostomskiej-Pampuch

#### pt. „ Identyfikacja i właściwości niekonwencjonalnych produktów zaawansowanej glikacji występujących w surowicy krwi”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pani mgr. inż. Kingi Gostomskiej-Pampuch została wykonana pod kierunkiem Dr hab. Magdaleny Staniszewskiej prof. KUL, w Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu oraz w Zakładzie Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Badania były realizowane w ramach dwóch grantów NCN: (i) projektu OPUS 2017/25/B/NZ4/01198 „Udział glikacji i szlaku kinureninowego w modulowaniu środowiska nowotworowego” oraz (ii) projektu ETIUDA 2019/32/T/NZ4/00492 „Identyfikacja i właściwości niekonwencjonalnych produktów zaawansowanej glikacji występujących w surowicy ludzkiej”, którego kierownikiem była Doktorantka.

Generowanie końcowych produktów zaawansowanej glikacji (AGEs) to proces nieenzymatycznej modyfikacji białek przez reszty cukrów czy aldehydów. W warunkach *in vivo* może prowadzić do zaostrzeń chorób autoimmunologicznych, metabolicznych, innych przewlekłych chorób zapalnych oraz chorób neurodegeneracyjnych. Ze względu na ogromną różnorodność substratów wykorzystywanych w procesie glikacji począwszy od cukrów, poprzez metabolity utlenienia lipidów, a także złożoność szlaków tych modyfikacji, powstające AGEs są wysoce heterogenną grupą związków, charakteryzującą się różnorodną strukturą oraz właściwościami fizykochemicznymi i biologicznymi. Zależne od AGE modyfikacje białek mogą znacząco wpływać na ich strukturę i funkcję, a powstające agregaty na niewłaściwą depozycję w tkankach. Ponieważ efekty biologiczne związane z nadprodukcją AGEs są szkodliwe i przyczyniają się do licznych patologii jak choćby insulinooporności czy silnego



stanu zapalnego, badania nad AGEs wraz poznaniem i charakterystyką nowych produktów glikacji są wielce istotne i pożądane.

### Ocena formalna

Rozprawa doktorska pani mgr inż. Kingi Gostomskiej-Pampuch posiada układ i sposób prezentacji typowy dla prac o charakterze eksperymentalnym. Dysertacja obejmuje 122 strony, zawiera 30 rycin i 6 tabel oraz 204 pozycje piśmiennictwa dobrze korespondującego z tematyką rozprawy. Zawiera wykaz skrótów, wykaz rysunków i tabel oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Na końcu znajduje się spis pozostałych osiągnięć naukowych. Praca jest prawidłowo zorganizowana w rozdziały i podrozdziały adekwatne do prezentowanych treści. Wstęp nakreśla problem badawczy, wprowadzając czytelnika w tematykę związaną z końcowymi produktami zaawansowanej glikacji, w tym z ich powstawaniem, strukturą, metodami oznaczania i syntezy oraz konsekwencjami działania na organizm ludzki. Metody są napisane poprawnie choć znacznie czytelniej byłoby opisanie ich w formie protokołów. Na uznanie zasługuje bogaty warsztat metodyczny Doktorantki obejmujący różnorodne metody i techniki począwszy od metod instrumentalnych (chromatograficznych, spektroskopowych, spektrometrii mas) poprzez immunochemiczne, do złożonych technik komórkowych jak choćby generowanie hybrydom i uzyskiwanie przeciwciał monoklonalnych. Wyniki zebrane w sposób syntetyczny są prezentowane w sposób logiczny i spójny. Przedstawione są na licznych wykresach i rycinach, których opisy jednakże bywają niekiedy nieprecyzyjne, co będzie wyszczególnione w dalszej części recenzji. Dyskusja jest prowadzona prawidłowo i przejrzysto. Obejmuje nie tylko interpretację wyników w świetle opublikowanych prac innych autorów ale podejmuje też próby wyjaśnienia, jakie implikacje mogą mieć zaobserwowane zjawiska w kontekście patofizjologii. Wnioski zebrane w 4 punkty stanowią odpowiedzi na postawione cele. Praca napisana jest językiem poprawnym i zrozumiałym. Podsumowując praca jest spójna tematycznie z wyraźnie nakreślonym celem i obszernym materiałem doświadczalnym.

### Ocena merytoryczna

Tematyka badawcza zawarta w pracy doktorskiej skupia się wokół poszukiwania nowych, nietypowych produktów zaawansowanej glikacji i jako główny cel zakłada wyizolowanie i





szczegółową charakterystykę tych występujących w warunkach naturalnych, a pochodzących od melibiozy stąd ich umowna nazwa MAGE. W pracy dokonano także charakterystyki syntetycznych analogów MAGE na tle innych produktów AGEs.

Chcąc zrealizować powyższe cele wykonano kilka dobrze przemyślanych zadań badawczych, które były możliwe do przeprowadzenia dzięki wygenerowaniu własnych narzędzi (odczynników) badawczych. Do najważniejszych wyników przeprowadzonych badań można zaliczyć :

1. Uzyskanie i scharakteryzowanie pod względem fizykochemicznym oraz z udziałem dwóch metod (klasycznej i bezwodnej w środowisku mikrofal) szeregu modelowych białkowych produktów zaawansowanej glikacji AGE używając mioglobiny jako białka modelowego oraz różnych mono- i dwucukrów, a także aldehydów jako czynników glikujących.
2. Wykazanie, że produkt MAGE, będący efektem glikacji mioglobiny przez melibiozę, utworzony w warunkach bezwodnych wykazuje odmienną strukturę i właściwości od AGEs dotąd opisywanych w literaturze oraz że inne AGEs, również wykorzystujące jako białko nośnikowe mioglobinę, nie posiadają epitopów krzyżowo-reagujących z przeciwciałami monoklonalnymi swoistymi względem MAGE
3. Uzyskanie i oczyszczenie, przy pomocy metod instrumentalnych i immunochemicznych, niskocząsteczkowego antygeny MAGE (LMW-MAGE), którego struktura i właściwości fluorescencyjnie odpowiadały modyfikacjom obecnym na modelowym białkowym produkcie MAGE (HMW-MAGE).
4. Wykazanie obecności antygeny MAGE na białkach krwi ludzkiej u osób z cukrzycą i u zdrowych oraz stwierdzenie pomiędzy nimi różnic w składzie zmodyfikowanych białek.

Autorka pracy w pełni zrealizowała postawiony cel udowadniając, że endogenne antygeny MAGE, jest obecny na kluczowych białkach występujących w krwi ludzkiej, a mianowicie na albuminie oraz łańcuchach ciężkich immunoglobulin IgG i IgA. Ponadto wykazała, że wzór glikacji wydaje się być częściowo odmienny u osób z cukrzycą (glikacja dotyczyła albuminy i IgG) oraz u zdrowych (glikacja dotyczyła IgG i IgA). Doktorantka potwierdziła, że antygen MAGE modyfikuje 5 reszt aminokwasowych modelowej mioglobiny w tym 3 reszty lizyny, resztę argininy i resztę histydyny oraz że uczestniczy on w glikacji też innych niż mioglobina białek tj. albuminy i immunoglobuliny. Potwierdziła, że jakość oraz ilość otrzymywanych



modelowych produktów zaawansowanej glikacji jest determinowana przez konkretną metodę ich pozyskiwania, co należy mieć na uwadze w badaniach nad rolą tych produktów. Dodatkową wartością pracy jest dokładne opracowanie i zoptymalizowanie metody produkcji i oczyszczania przeciwciał monoklonalnych anti-MAGE wraz z ich charakterystyką, dzięki czemu możliwa była identyfikacja nowego produktu glikacji. Przeciwciała te, o najmniej licznie reprezentowanym izotypie IgE poza MAGE, nie wykazywały reaktywności z nieglikowanymi białkami nośnikowymi ani z innymi uzyskanymi produktami glikacji. Ze względu zatem na wysoką specyficzność przeciwciał anti-MAGE nie obciążonych reakcjami krzyżowymi, jak również dysponowanie wzorcowym syntetycznym LMW-MAGE, ta część pracy może mieć charakter aplikacyjny. Układ bazujący na kompleksie immunologicznym MAGE–anti-MAGE z powodzeniem bowiem może zostać wykorzystany w testach immunoenzymatycznych czy immunochromatograficznych, służących identyfikacji nowych produktów glikacji typu MAGE w materiale biologicznym.

W tym miejscu, chciałabym prosić Doktorantkę o podzielenie się wiedzą na poniższe kwestie i związane z nimi pytania, które nasunęły mi się w trakcie czytania tej rozprawy.

1. Dlaczego w trakcie porównawczej identyfikacji epitopu MAGE na białkach krwi ludzkiej Doktorantka posłużyła się odmiennym w kontekście składu białkowego materiałem biologicznym – surowicą od osób z cukrzycą ale osoczem od osób zdrowych?
2. Czy MAGE z uwagi na fakt, że jest rozpoznawany przez przeciwciała monoklonalne o izotypie IgE, można hipotetycznie zaliczyć do czynników alergogennych oraz czy Doktorantka uważa, że jakieś badania w tym zakresie byłyby wskazane?
3. Jaka zdaniem Doktorantki będzie przydatność w klinice produktów AGEs jako biomarkerów? Czy z przyczyn ich ogromnej heterogenności w ogóle możemy mówić o takiej przydatności? Czy znane są AGEs używane powszechnie w diagnostyce?. Prosiłabym o rozważenie problemu pod kątem tego czym powinny się charakteryzować AGEs aby można je uznać za wartościowe biomarkery w diagnostyce, a może raczej jako biomarkery prognostyczne czy predykcyjne? Czy badany produkt MAGE ma szansę zaistnieć jako biomarker?





### Uwagi krytyczne

Z formalnego obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na pewne zauważone uchybienia czy niedociągnięcia recenzowanej pracy:

- Używane często przez Doktorantkę sformułowanie *aktywność przeciwciał* jest moim zdaniem niefortunne i nie stosowane w immunologii w kontekście określenia zdolności przeciwciał do wiązania antygeny. Sugerowałabym zastąpić je wyrażeniem *reaktywność przeciwciał*, które tą właściwość definiuje. Termin *aktywność biologiczna* czy innymi słowy powszechny termin *funkcjonalność przeciwciał* jest używany w przypadku oceny funkcji efektorowych zależnych od przeciwciał, jak choćby opsonofagocytoza, aktywacja dopełniacza, cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał czy zdolność do neutralizacji.
- W pracy zabrakło niektórych analiz statystycznych, które w przypadku porównań zmiennych o charakterze danych ilościowych są niezbędne aby wnioskować o różnicach lub ich braku pomiędzy tymi zmiennymi. np. na Rys. 17A podano, że najmniejsza liczba komórek występuje w hodowlach z obecnością 2% i 4% FBS, tymczasem zgodnie z Rys. 17A liczebność komórek hodowanych w obecności 4%, 6% i 8% wydaje się być porównywalna, a ta dla 2% surowicy choć wizualnie mniejsza, bez potwierdzenia statystycznego uwzględniającego miarę rozrzutu wyników, wcale taka być nie musi.
- W opisie kilku rycin brakuje informacji na temat tego ile razy dany eksperyment był powtarzany, w ilu powtórzeniach roboczych wykonywany i/lub czego dotyczą zaznaczone na wykresie miary zmienności wyników (SD czy SEM) → dotyczy Rys: 16, 17, 18, 20, 25, 26.
- Opis wyników SDS-PAGE dla produktu glikacji z udziałem aldehydu T<sub>2</sub>N-trans-2-nonenalu wydaje się być nieadekwatny z Rys. 7. Analogiczna uwaga niekompatybilności pomiędzy opisem wyników a ich prezentacją dotyczy widma fluorescencji dla mioglobiny przedstawionego na Rys. 9, gdzie mioglobina wydaje się mieć jedno maksimum fluorescencji, a nie dwa jak zostało podane.
- Charakteryzując epitop MAGE rozpoznawany przez swoiste przeciwciała w oparciu o krzywe hamowania w kompetycyjnym teście ELISA, w podsumowaniu rozdziału na str. 66 znalazło się zdanie o charakterze stwierdzenia zamiast domniemania „...wykazano, że



struktura epitopu dla przeciwciał anti-MAGE obejmuje cząsteczkę cukru i co najmniej lizyny, ale na białku epitop jest liczniej prezentowany.....” – ponieważ np. analizy mapowania epitopów Doktorantka nie wykonywała, w mojej ocenie może to być jedynie hipoteza, której weryfikacja wymaga dalszych badań.

- Autorka nie ustrzegła się „niezgrabności” językowych jak choćby: potwierdzenie aktywności adsorpcji zamiast potwierdzenie efektywności adsorpcji (Materiały i Metody, str. 41); we krwi cukrzyków zamiast chorych na cukrzycę (Wnioski, str. 90).

### Podsumowanie

W mojej ocenie, przedstawiona do oceny rozprawa stanowi ważny wkład w poznanie roli nowych produktów zaawansowanej glikacji MAGE, a zastosowane metody badawcze świadczą o dobrze opanowanym warsztacie technicznym i umiejętnościach wykorzystywania różnorodnych metod z zakresu biochemii, immunologii, czy biologii komórki. W moim przekonaniu zaprezentowane przez Autorkę wyniki, stanowiące nowość naukową oraz oryginalne rozwiązanie problemu badawczego, są ciekawe i mają dużą wartość poznawczą. Cechują się także potencjalnym charakterem aplikacyjnym, co otwiera szerokie perspektywy badawcze na przyszłość. Właściwie wyciągane wnioski oraz prawidłowo i przejrzysto prowadzona dyskusja świadczą o dużej znajomości tematyki badawczej oraz umiejętności krytycznego spojrzenia na wyniki badań własnych. Wszystko to świadczy o dobrym przygotowaniu Doktorantki do pracy naukowej wymagającej najpierw umiejętności zdefiniowania problemu badawczego, a następnie jego analizy i interpretacji. Duża wartość prowadzonych badań została znakomicie potwierdzona przez publikację wyników w renomowanym czasopiśmie Scientific Reports (IF 4,379). Na przyszłość sugerowałabym jednak Doktorantce większą dbałość o graficzną prezentację wyników.

Wszystkie przedstawione tutaj pytania i uwagi w żadnym stopniu nie umniejszają wartości naukowej rozprawy i nie wpływają na moją jak najbardziej pozytywną jej ocenę. Chciałabym podkreślić, że oprócz wyników, przedstawionych w pracy doktorskiej, Pani Kinga Gostomska-Pampuch jest autorką 8 publikacji i kilkunastu doniesień konferencyjnych. Warto również

dodać, że Doktorantka była już kierownikiem i wykonawcą projektów naukowych oraz stypendystką projektów krajowych i zagranicznych.

Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Kingi Gostomskiej-Pampuch spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 roku (z późniejszymi zmianami i uzupełnieniami) „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki”. Wnoszę zatem o dopuszczenie Doktorantki przez Wysoką Radę Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, PAN we Wrocławiu do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



