



dr hab. Michał Żmijewski, Prof. nadzw. GUMed
Katedra Histologii,
Gdański Uniwersytet Medyczny,
ul. Dębinki 1a, Pokój 230
80-211 Gdańsk, Pomorskie
Polska

Tel: +48 583491455

Fax: +48 583491419

Email: mzmijewski@gumed.edu.pl

Gdańsk, 31.08.2016

Recenzja rozprawy doktorskiej Sabina Monika Galiniak

Tematem przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej mgr **Sabina Monika Galiniak** jest: „**Modyfikacje glikacji białek przez stres oksydacyjny i antyoksydanty**”. Promotor pracy: prof. dr hab. Mirosław Soszyński Katedra Biofizyki Molekularnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

1) Ocena merytoryczna

a) trafność podjętej tematyki i jej oryginalność.

Glikacja jest nieenzymatycznym procesem modyfikacji białek. Dołączenie grup cukrowych do białek prowadzi zwykle do modyfikacji ich własności fizyko-chemicznej, stabilności, zdolności do agregacji, powinowactwa do innych białek lub leków, oraz wpływa na ich aktywność biologiczną. Ten wieloetapowy oraz wielokierunkowy proces odbywa się przy udziale reaktywnych form tlenu, co określane jest mianem glikooksydacji i prowadzi do powstania końcowych produktów nieenzymatycznej glikozylacji białek (ang. Advanced Glycation End Products, AGEs). Wiele badań wskazuje, że zmiany ilościowe jak i jakościowe w AGEs, towarzyszą procesowi starzenia się oraz przyczyniają się do rozwoju szeregu chorób, takich jak: cukrzyca, miażdżyca, przewlekłej niewydolności nerek, czy też chorób o podłożu neurodegeneracyjnym. Wciąż jednak niewiele wiadomo zarówno o samym procesie glikacji jak i glikooksydacji, oraz o mechanizmach aktywowanych przez tak zmodyfikowane białka. Uważam, więc, że rozprawa doktorska mgr **Sabina Galiniak** świetnie wpisuje się w nurt światowych badań, gdyż dokumentuje zmiany w ilości glikozylowanych białek oraz parametrów szoku oksydacyjnego w jednostkach chorobowych o dużym znaczeniu klinicznym, jak i społecznym (stwardnienie rozsiane i mukowiscydoza).

Rozprawa doktorska mgr **Sabina Galiniak** została przygotowana zgodnie z nowym trybem (zgodnie z Rozporządzeniem MNiSW z dnia 22 września 2011 r., będącym nowelizacją art. 13 ust.

1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki). Do rozprawy włączono 3 prace oryginalne opublikowane w latach 2013-2015. Należy podkreślić, że chociaż, doktorantka nie jest pierwszym autorem we wszystkich pracach (odpowiednio: pierwszy, drugim i trzecim), to jej deklarowany oraz potwierdzony przez innych autorów wkład jest znaczący, zarówno, jeśli chodzi o planowanie, wykonanie części doświadczalnej, jak i prace nad manuskryptami. Warto podkreślić, iż przedstawiony do oceny cykl prac jest w pełni spójny pod względem tematycznym, bowiem wszystkie prace dotyczą problemu glikacji białek, zarówno w kontekście klinicznym (dwie prace), jak i badań o charakterze podstawowym (1 praca).

b) ocena uzyskanych rezultatów

Główną część rozprawy stanowią trzy opublikowane już prace oryginalne o łączny współczynnik oddziaływania $IF=7,919$ oraz 65 punktów MNiSW. Warto odnotować, że prace te były cytowane łącznie 27 razy (wg. Bazy Scopus). Ponieważ, wszystkie prace będące postawą rozprawy doktorskiej zostały już zrecenzowane przed ich publikacją, postaram się ustosunkować głównie do spójności uzyskanych wyników z tematyką rozprawy, znaczenia uzyskanych wyników oraz formy ich prezentacji.

Pierwsza z prac (**Praca 1**) opublikowana została w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym *Neurochemistry International* (*Neurochem Int* 2013; 63(5):507-16. $IF=2,65$). Artykuł ten wskazuje na podwyższenie szeregu parametrów szoku oksydacyjnego (np. ilość zaawansowanych produktów utleniania białek, grup karbonylowych) oraz glikacji białek (glikoforu, dityrozyny, N'-formylokinureniny, kinureniny oraz tryptofanu) w surowicy u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym (MS). Zgromadzone wyniki sugerują również na istnienie korelacji między wybranymi markerami oraz stężeniem białka fazy ostrej - CRP. Doktorantka, wraz z zespołem wykazała, również wpływ farmakoterapii na wartości szeregu parametrów glikooksydacji białek oraz różnice w ich poziomie w zależności od formy MS. Przedstawione badania sugerują również na potencjalne znaczenie diagnostyczne biochemicznych pomiarów parametrów glikooksydacji białek w diagnostyce oraz monitorowaniu terapii MS.

Kolejna praca (**Praca 2**), której autorką jest Pani mgr **Sabina Galiniak** dotyczy oceny parametrów glikooksydacji białek u dzieci chorujących na mukowiscydozę (CF) z towarzyszącą infekcją bakteryjną (*Pseudomonas aeruginosa* lub *Staphylococcus aureus*). Dodatkowo, zbadano również różnicę w aktywności szeregu enzymów związanych z odpowiedzią na szok oksydacyjny w erytrocytach młodych pacjentów z CF. Przedstawione wyniki wskazują, istotne podwyższenie ilości AGEs, grup karbonylowych oraz aktywności S-transferaza glutationowej u pacjentów CF z towarzyszącą infekcją bakteryjną, chociaż nie znaleziono specyficznych dla badanych bakterii markerów. Przedstawione wyniki potwierdzają istotną rolę szoku oksydacyjnego w przebiegu CF oraz wskazują na potencjalne zastosowanie oznaczeń glikofor oraz grup karbonylowych białek w monitorowaniu glikooksydacji białek u pacjentów z CF. W tym, miejscu mam do doktorantki pytanie odnoszące się do podsumowania tego artykułu w autoreferacie (strona 27). Doktorantka wnioskuje, że „zakażenia bakteryjne dróg oddechowych, zarówno *P. aeruginosa* i *S. aureus*,

pacjentów z mukowiscydozą przyczyniają się do nasilonego stresu oksydacyjnego”, jednak w pracy jako kontrolę stosuje osoby zdrowe. Czy osoby chorujące na CF, ale niewykazujące chronicznej infekcji bakteryjnej lub w trakcie remisji, nie byłyby właściwszą kontrolą?

Ostania praca (**Praca 3**) umieszczoną w cyklu stanowiącym podstawę do ubiegania się o stopień doktora przez Panią mgr **Sabinę Galiniak**, jest prac z roku 2015, która ukazała się w *Cellular & Molecular Biology Letters (Cell Mol Biol Lett 2015; 20(4):562-70, IF= 1,753)*, a doktoranta jest jej pierwszą autorką. Praca ta dotyczy roli żelaza oraz związków wiążących żelazo (chelatorów żelaza) w glikooksydacji białek. Zagadnienie to jest bardzo istotne klinicznie, gdyż akumulacja żelaza wiązana jest z wydzielaniem wolnych rodników, a w konsekwencji powstawaniem AGEs. Ponieważ, procesy te są związane z zaburzeniami w produkcji insuliny, postuluje się, że chelatory żelaza mogą być użyteczne w leczeniu cukrzycy. Niestety, pomimo wykorzystania sprawdzonego modelu badawczego, jakim jest glikacja bydlęcej albuminy (BSA) *in vitro*, oraz wykorzystaniu aż 32 potencjalne chelatory jonów żelaza, doktorantka wykazała, że proces glikacji BSA w danych warunkach doświadczalnych jest niezależny od żelaza. W przedstawionych danych doktorantka wnioskuje, że chelatory żelaza nie hamują tego procesu, a znane inhibitory glikacji, takie jak pirydoksyna nie są efektywnymi chelatorami jonów żelaza. Badania te jednak nie wykluczają, że chelatory żelaza, nie mogą hamować glikacji białek *in vivo*. Pytanie, czy doktorantka planuje kontynuację badań z wykorzystaniem innego modelu lub badań *in vivo*?

Podsumowując, wśród najistotniejszych osiągnięć składających się na rozprawę doktorską **Sabiny Galiniak** należy wymienić:

- Opracowanie oraz praktyczne wykorzystanie imponującego warsztatu badawczego, obejmującego szereg metod biochemicznych i molekularnych.
- Potwierdzenie, roli glikacji i glikooksydacji w patogenezie szeregu chorób o dużym znaczeniu klinicznym, takich jak stwardnienie rozsiane, czy mukowiscydoza.
- Wykazanie, że pomiar AGEs jak również markerów stresu oksydacyjnego, glikacji, glikooksydacji białek może być cenny narzędziem diagnostycznym.
- Wykazanie, wpływu stresu oksydacyjnego na powstawanie AGEs, jako potencjalnego mechanizmu patologicznej akumulacji AGEs.

c) poprawność formalno-językowa, stylistyczna i interpunkcyjna.

Praca napisana jest poprawnie pod względem językowym, a autorka świetnie porusza się zarówno w tematyce badawczej, jak i wykorzystanej metodyce. Warto podkreślić, fakt, że autoreferat zawiera również kluczowe rysunki oraz tabele, co umożliwia płynne podążanie za opisem bez odwoływania się do manuskryptów. W tym miejscu należy dodać, że zarówno rysunki jak i tabele opisane są w języku polski, co często pomijane jest przez doktorantów.

2) Ocena metodologiczna

a) dobór literatury, umiejętności, wykorzystania źródeł

Doktorantka, dobrze porusza się we współczesnej literaturze, dotyczącej zarówno AGEs, jak i metodyki badania glikozylacji oraz wolnych rodników. Wstęp do rozprawy również zawiera liczne dobrze dobrane odnośniki literaturowe. Na podkreślenie zasługuje fakt, że mgr **Sabina Galiniak** wykorzystuje świetnie najnowszą literaturę jak i podkreśla znaczenie klasycznych odkryć.

b) poprawność formułowania problemów i hipotez (założeń badawczych).

Wolne rodniki, reaktywne formy tlenu od lat uważane są za istotny element w patogenezie wielu chorób cywilizacyjnych, takich jak choroby neurodegeneracyjne i nowotwory. Jednym z kluczowych efektów działania wolnych rodników jest modyfikacja różnych cząsteczek, w tym białek. O ile produkcja wolnych rodników oraz modyfikacja białek (np. glikacja) jest niezbędnym procesem zapewniającym prawidłowe funkcjonowanie organizmu, to zaburzenie balansu między ich powstawaniem i degradacją stanowi poważne zagrożenie dla homeostazy wewnętrznej organizmu. Nie wiele jednak wiadomo na temat mechanizmów regulujących powstawanie AGEs oraz zaburzenie tego procesu w stanach chorobowych. Dlatego też, uważam, że tematyka badań jest jak najbardziej słuszna. Warto podkreślić, że przedstawione hipotezy badawcze, były oparte na logicznej analizie danych literaturowych, a od realizacji zadań badawczych doktorantka wykorzystwała bardzo bogaty warsztat metodyczny. W przypadku ostatniej pracy (**Praca 3**), pomimo dobrze zdefiniowanego celu badawczego okazało się, że stosunkowo prosty model *in vitro*, oparty o glikację albuminy, model badawczy okazał się być niewystarczający do jej potwierdzenia. Praca ta jednak dostarcza bardzo cennych informacji (porównanie aktywności różnych chelatorów oraz inhibitorów glikooksydacji) i nie wyklucza, że żelazo odgrywa istotną rolę w glikacji białek w stanach patologicznych u człowieka. Jednak potwierdzenie tej hipotezy wymaga stworzenia innego modelu badawczego.

c) trafność doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętność ich zastosowania,

Jednym z celów badawczych, wyznaczonych przez doktorantkę było opracowanie markerów biochemicznych użytecznych w diagnostyce stwardnienia rozsianego (**Praca 1**) oraz mukowiscydozy (**Praca 2**). Tak więc, należy tu podkreślić, znaczenie doboru, prostych i dobrze zwalidowanych metod biochemicznych, opartych o pomiary spektrofotometryczne (np. zawartość produktów Amadoriego, czy zaawansowanych produktów oksydacji białek), lub pomiary fluorescencji (np. produktów glikacji – glikoforu, dityrozyny, czy też tryptofanu). W tym miejscu, chciałby się zapytać doktorantki, czy testy te są na tyle specyficzne, że będą mogły być włączone do badań diagnostycznych? Nie ulega jednak wątpliwości, że prezentowana metodyka oraz jej różnorodność umożliwiła wykonanie zadań badawczych oraz potwierdzenie lub obalenie stawianych hipotez. Na szczególną uwagę zasługuje **Praca 3**, w której wykorzystano 32 potencjalne inhibitory glikacji reprezentujące oprócz klasycznych związków, takich jak metformina czy pirydoksyna, związki o mniej zbadanej lub nieznannej aktywności antyglikacyjnej.

Były to między innymi nitroksydy, aminokwasy, kwasy organiczne, poliaminy, polifenole; czy też antyoksydanty i klasyczne chelatory metali. Niestety, badania te wykazały, że wykorzystywany z powodzeniem model badawczy przez inne grupy, nie był optymalny w przypadku badań wpływu jonów żelaza na glikację albuminy.

Niemniej jednak warto podkreślić, że szereg testów biochemicznych wykorzystanych w pracach mgr **Sabiny Galiniak**, może znaleźć potencjalne zastosowanie w diagnostyce i monitorowaniu schorzeń związanych z akumulacją AGEs.

d) poprawność układu pracy i struktury podziału treści.

Praca ma klasyczny układ, dla rozprawy doktorskiej opartej o opublikowane manuskrypty (streszczenie w języku polskim i angielski, bardzo cenny wykaz stosowanych skrótów, wstęp oraz hipotezę oraz cele pracy, które to autorka pomija w spisie treści. Później omówione są 3 prace będące podstawą rozprawy doktorskiej. Następnie znajduje się spis literatury, wykaz innych osiągnięć naukowych doktorantki, oświadczenia współautorów, a na zakończenie przedruki 3 publikacji. Układ pracy jest bardzo przejrzysty, chociaż wydaje mi się, że wprowadzenie mogłoby się zaczynać na nowej stronie, a lista innych osiągnięć mogłaby dopełniać listę prac będących podstawą rozprawy doktorskiej na stronie 7 (na początku autoreferatu).

3) Wnioski końcowe (konkluzja).

Podsumowując, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi spójny pod względem tematycznym cykl publikacji podkreślających znaczenie glikacji i glikooksydacji w patogenezie chorób. Prace te nie tylko wnoszą znaczny wkład od naszej wiedzy na temat tych procesów, lecz również wskazują na wykorzystanie przydatnych markerów glikacji oraz oksydacji, zarówno w diagnostyce jak i monitorowaniu leczenia stwardnienia rozsianego, mukowiscydozy i być może cukrzycy. Pani **mgr Sabina Galiniak** bardzo sprawnie porusza się w omawianej tematyce oraz wykorzysta bogaty warsztat badawczy. Należy podkreślić, że prace będące podstawą rozprawy doktorskiej, ukazały się w dobrych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym (łączny IF około 8), a prace te były cytowane łącznie 27 razy. Co więcej, doktorantka oprócz wymienionych prac, jest współautorką siedmiu innych publikacji naukowych oraz 21 doniesień zjazdowych, co doskonale podkreśla jej zaangażowanie w pracę naukowo-badawczą.

Biorąc pod uwagę, główne wnioski z recenzji rozprawy doktorskiej oraz cały dorobek publikacyjny doktoranta uważam, że przedstawiana Pani mgr Sabina Galiniak spełnia wszystkie wymagania do uzyskania stopnia doktora, dlatego też pozwalam sobie przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Biologiczno-Rolniczego, Uniwersytetu Rzeszowskiego, wniosek o dopuszczenie Pani mgr Sabiny Galiniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Michał Żmijewski, Prof. GUMed