

MATRICE EXTRACELLULAIRE ET DYNAMIQUE CELLULAIRE (MEDyC)

(UMR CNRS / URCA 7369)

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Saby Galiniak pt. "Modyfikacje glikacji białek przez stres oksydacyjny i antyoksydanty"

Reaktywne formy tlenu są normalnym produktem metabolizmu głównie mitochondriów. Jednakże w procesie zapalnym dochodzi do nadprodukcji tych związków i to zjawisko, zwane stresem oksydacyjnym, przyczynia się w istotny sposób do niszczenia patogenów bądź ksenobiotyków atakujących organizm. W procesie przewlekłego zapalenia stres oksydacyjny może wywołać znaczne szkody w samym organizmie. Jedną z takich szkód jest wzmocnienie procesu glikacji białek. Sam proces glikacji, uważany za zjawisko szkodliwe, oraz akumulacja "produktów zaawansowanej glikacji" (Advanced Glication End Products, AGE) jest, według wielu badaczy, istotną przyczyną procesu starzenia.

Powstawanie AGE jest zjawiskiem w pewnym sensie fizjologicznym a białka zewnątrzkomórkowe tak zmodyfikowane eliminowane są z otoczenia przy pomocy receptorów, z których najważniejszym wydaje się być RAGE. W procesach patologicznych, a zwłaszcza w cukrzycy dochodzi do nagromadzenia AGE, a w konsekwencji stresu związanego z osłabieniem prawidłowego funkcjonowania białek, prowadzącego do różnych powikłań cukrzycowych. Dlatego wiele uwagi poświęcono badaniom procesu formowania AGE przy ponadnormatywnym stężeniu cukrów a zwłaszcza glukozy. Natomiast literatura opisująca procesy tworzenia AGE w przypadku normoglicemii oraz w przypadkach przewlekłego stanu zapalnego i związanego z nim stresu oksydacyjnego jest skąpa.

I właśnie rozprawa doktorska pani mgr Saby Galiniak "Modyfikacje glikacji białek przez stres oksydacyjny i antyoksydanty" próbuje rzucić światło na proces tworzenia AGE przez stres oksydacyjny w dwóch jednostkach chorobowych, którym wtóruje mniej lub bardziej przewlekły proces zapalny: mianowicie w stwardnieniu rozsianym oraz w mukowiscydozie. W dodatku autorka badała rolę chelatorów żelaza na proces glikacji albuminy. Praca przedstawiona jest w formie zbioru trzech publikacji oraz obszernego autoreferatu.

Stwardnienie rozsiane jest procesem patologicznej demielinizacji neuronów o podłożu autoimmunologicznym, częściowo genetycznym, którego etiopatogeneza nie do końca jest poznana. W chorobie tej istotnym czynnikiem jest przewlekły bądź powracający proces zapalny. W pierwszej przedstawionej publikacji doktorantka zajęła się oszacowaniem produktów glikooksydacji białek u nieleczonych pacjentów, u których zdiagnozowano stwardnienie rozsiane w postaci rzutowo-remisyjnej i pacjentów wykazujących nawroty kliniczne choroby w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych w podobnym przedziale wiekowym. Dodatkowo pani mgr Sabina Galiniak szacowała te same parametry u pacjentów leczonych trzema środkami farmaceutycznymi, dwoma lekami przeciwzapalnymi, interferonem beta 1a oraz interferonem beta 1b a także glatiramerem, który jest polimerem statystycznym czterech aminokwasów o różnym stopniu spolimeryzowania i którego działaniem ma być neutralizacja przeciwciał reagujących z białkiem zasocjowanym z mieliną (myelin associated protein). Doktorantka szacowała w surowicy pacjentów stężenia wczesnych oraz końcowych produktów glikacji (odpowiednio związków typu Amadoriego i tak zwanego glikoforu), produktów zaawansowanego utlenienia białek oraz cały szereg produktów charakterystycznych dla stresu oksydacyjnego jak na przykład, układ tyrozyna/dityrozyna czy tryptofan/kinurenina i formylokinurenina, a także białkowych grup tiolowych i karbonylowych. Zręcznie wybrany zakres badanych parametrów pozwala na wyczerpującą charakteryzację zarówno procesu glikacji jak i procesów oksydacyjnych białek surowicy.

U chorych na stwardnienie rozsiane doktorantka zaobserwowała statystycznie istotny wzrost zawartości produktów zaawansowanej glikacji i zaawansowanych produktów utlenienia białek, bez zmian stężenia produktów glikacji w płynie mózgowo-rdzeniowym. Badanie płynu mózgowo-rdzeniowym obejmowało wyłącznie dwie grupy. W pracy nie wyjaśniono jak dobierano grupę kontrolną i czy była ona poddawana leczeniu. Nie ma też wyjaśnienia jakiemu leczeniu poddana była grupa chorych charakteryzująca się nawrotami klinicznymi i czy stosowane środki farmakologiczne mogły wpływać na badane parametry. Na przykład grupa ta ma wyraźnie obniżony poziom zawartości produktów zaawansowanej glikacji w stosunku do grupy nieleczonej.

Ciekawym wynikiem jest zaobserwowana korelacja między wskaźnikami procesu zapalnego jakim jest białko C oraz stężeniem leukocytów w krwi a, zwłaszcza między tymże białkiem a zawartością w surowicy zaawansowanych produktów utlenienia białek. Autorzy publikacji wyciągają z tej obserwacji słuszny wniosek, proponując pomiar zawartości zaawansowanych produktów utlenienia białek jako wskaźnik postępu choroby. Mniej istotna, przynajmniej wizualnie, wydaje się być korelacja innych parametrów, a zwłaszcza stężeń białka C i tryptofanu w surowicy (ryc. 5B) oraz stężenia leukocytów w zależności od zawartości kinureniny (ryc. 8B). Przy tak niskiej wartości R^2 wartość jednego parametru może zmienić wartość p hipotezy korelacji. Dlatego wyniki te słusznie interpretowane są bardzo ostrożnie.

W swojej pracy pani mgr Sabina Galiniak wykazała, że leczenie chorych interferonami lub glatiramerem obniża istotnie poziom zaawansowanych produktów utlenienia białek w surowicy oraz fruktozaminy. Pozostałe parametry, nie wykazują po części statystycznie istotnych zmian, głównie ze względu na istotny rozrzut wyników pomiarów, normalny w populacji ludzkiej. Tym niemniej obserwuje się wyraźny efekt pozytywny stosowania interferonów i glatirameru. Rozszerzenie grup badawczych, co nie jest sprawą prostą, pozwoliłoby być może

dokładniej scharakteryzować wpływ środków farmakologicznych na badane parametry. Nie jest to jednak sprawa istotna dla wykazanego działania farmakologicznego.

Ciekawym wynikiem, niestety nie interpretowanym w publikacji, jest obserwowany wzrost zawartości produktów zaawansowanej glikacji w przypadku stosowania glatirameru (ryc. 1). Skuteczność tego specyfiku, dopuszczonego do użytku przez FDA w Stanach Zjednoczonych ze względu na mniejsze reakcje uboczne, niż te, obserwowane w przypadku interferonów, jest w niektórych publikacjach kwestionowana. Być może czynnik ten właśnie sprzyja glikacji białek?

W drugiej, tak zwanej klinicznej publikacji doktorantka zajmuje się charakteryzacją procesu glioksydacji u dzieci dotkniętych mukowiscydozą, których drogi oddechowe zainfekowane są dwoma gatunkami bakterii: *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*. Bakterie te powodują chroniczny odczyn zapalny płuc. Parametry grup pacjentów zainfekowanych porównano do odpowiedniej wiekowo grupy dzieci zdrowych. W pierwszym zdaniu opisu wyników publikacji stwierdzono, że "parametry hematologiczne nie różniły się między badanymi grupami". Nie do końca zgadzam się z tym zdaniem, gdyż np. w grupie zainfekowanej *S.aureus* procentowa zawartość monocytów była nieco powiększona; w obu grupach zainfekowanych wykazano nieco wyższe stężenie białka C, a aktywność gamma-glutamylotransferazy wyraźnie obniżona, co może świadczyć o przyjmowaniu środków przeciwzapalnych. Natomiast stężenie kreatyniny surowiczej było u chorych wyraźnie poniżej normy. Czy wartość tego parametru wskazuje na zmniejszony metabolizm układu mięśniowego, czy na zwiększoną eliminację drogą moczową?

Stosując podobną metodologię jak w pierwszej publikacji, u chorych zainfekowanych bakteriami stwierdzono w surowicy statystycznie istotny wzrost zawartości produktów zaawansowanej glikacji, grup karbonylowych oraz erytrocytarnej S-transferazy glutationu, przy nie zmienionym stężeniu glukozy. Jest to istotna obserwacja, która wskazuje na wzmożone procesy gliokooksydacyjne w przewlekłym stanie zapalnym już u młodych pacjentów. Niektóre wyniki zakwalifikowane jako statystycznie niezmiennie wymagają dodatkowej interpretacji, której w publikacji brak. Na przykład maksymalne wartości stężenia tryptofanu w surowicy chorych są niższe niż minimalna wartość dla grupy kontrolnej. Być może zastosowanie innych nieparametrycznych testów wykazałoby statystycznie istotne różnice. Te drobne uwagi techniczne nie umniejszają naukowego znaczenia pracy, która wskazała na pomiar zawartości produktów zaawansowanej glikacji oraz grup karbonylowych jako znacznika uszkodzeń oksydacyjnych w tej jednostce chorobowej.

Doniesienia kliniczne dopełnia praca eksperymentalna, w której doktorantka przedstawia wyniki wpływu helatorów żelaza na stymulowany przez jon Fe^{2+} proces glikacji w klasycznym układzie albumina/cukier. Jony Fe^{2+} oraz dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) aktywują proces glikacji w układzie albumina/glukoza, natomiast inhibują gdy substratem zamiast glukozy jest fruktoza bądź ryboza. Może to świadczyć, że w danym białku proces glikacji jest reakcją bardziej skomplikowaną niż proste tworzenie zasady Schiffa i produktów Amadoriego i zależną np. od rozkładu ładunków otoczenia grupy aminowej w białku czy rozkładu wiązań wodorowych. W pracy tej, stosując test z zastosowaniem ferrozyny, doktorantka dowiodła brak zależności między zdolnością kompleksowania żelaza trzydziestu badanych związków a zdolnością glikacji albuminy przez w/w cukry oraz aldehydy jak glioksal czy metyloglioksal. Ta ciekawa konkluzja wskazuje, że do badania procesu glikacji

powinno się stosować przynajmniej kilka systemów białkowych. Ciekawym byłoby użycie kolagenu. Jest to białko włóknikowe, którego struktura jest w pewnym sensie liniowa, w przeciwieństwie do białek globularnych, stanowiące 1/3 białka organizmu. Co więcej, badania ostatnich lat wskazały na znaczenie glikacji tego białka na rozwój komplikacji związanych z cukrzycą. Ciekawą obserwacją dodatkową tej pracy jest mało dyskutowana w literaturze zdolność kompleksowania jonów żelazawych przez glicynę, nieco mniejsza niż EDTA, a większa niż inny klasyczny helator jakim jest kwas nitrylotrójoctowy (NTA). W związku z tym nasuwa się pytanie jak ten aminokwas, którego stężenie w komórce bądź w surowicy jest dość znaczne, może wpływać na pulę dostępnego żelaza? Choć metodyka tej pracy jest klasyczna i powszechnie używana przy tego typu badaniach recenzenta zaciekało stabilizowanie układu reakcyjnego przez bufor Tris. Związek ten jest używany w badaniu, o ile się nie mylę, w 400 razy większym stężeniu niż np. jony Fe^{2+} . Czy taki nadmiar Trisu, posiadającego grupę aminową i dwie grupy hydroksylowe w swojej cząsteczce, nie wpływa na reakcję żelaza z ferrozyną?

Wszystkie trzy prace wnoszą istotną i nowatorską wartość do poznania zarówno mechanizmu glikooksydacji jak i jego znaczenia w jednostkach chorobowych związanych z chroniczną reakcją zapalną organizmu. Doktorantka wykazała w nich, że w procesie zapalnym, nawet w przypadku normoglicemii i nawet u dzieci obserwuje się istotny wzrost procesu glikooksydacji, uważanego dotychczas za szkodliwy u diabetyków oraz osób w podeszłym wieku. Wyniki zostały opublikowane w czasopismach międzynarodowych o wysokim współczynniku cytowań (Impact Factor), a więc już z recenzją dokonaną przez międzynarodowy komitet recenzentów, specjalistów w danej dziedzinie. Moja skromna opinia może tylko potwierdzić wybitną wartość poznawczą przeprowadzonych badań.

Dysertację, jak wspominałem, dopełnia obszerny autoreferat, w którym doktorantka przedstawiła wyczerpująco we wprowadzeniu podstawową wiedzę dotyczącą procesu glikooksydacji oraz, w dalszych rozdziałach, opisała badane jednostki chorobowe. Cel pracy jest przedstawiony krótko i klarownie. Opis metodologiczny przedstawiony także wyczerpująco i nie budzi zastrzeżeń. Wyniki i ich opis jest dobrze czytelny, literatura też wyczerpująca. Drobnym uchybieniem jest brak końcowego rozdziału, który mógłby uwypuklić zbiorcze wnioski końcowe oraz zaproponować hipotezy robocze dalszych badań w tej dziedzinie. Zwłaszcza, że hipotezy te są przedstawione w poszczególnych publikacjach. Autoreferat napisany jest poprawnie bez rażących błędów, z niewieloma tylko, lecz powszechnie używanymi zapożyczeniami z języka angielskiego. Doktorantka wprowadza wdzięczną nazwę "glikofor", definiując ją dopiero pod koniec autoreferatu (str. 30). Ponieważ nazwa ta jest użyta także w publikacjach rozumiem, że weszła (wchodzi) ona do powszechnego użytku. Chciałbym zwrócić uwagę, że nazwa "glikofor" istnieje także w innym pojęciu. W podręczniku Chemii Smaku ("Taste Chemistry") z 1993r Shallenberger używa nazwy "glycophore" w znaczeniu – "związek wykazujący smak słodki", obok nazw "acidophore" i "halophore". Octan ołowiowy jest w tym znaczeniu glikoforem, a związek ten nie jest końcowym produktem zaawansowanej glikacji. W znaczeniu smaku nazwa glikofor używana jest także m.in. w podręczniku "Basic Chemistry" Zumdahl'a i DeCoste (ostatnie wydanie w ubiegłym roku). Recenzenta ciekawi pochodzenie tej nazwy w używanym przez panią mgr znaczeniu.

Ta drobna uwaga semantyczna bynajmniej nie pomniejsza wartości dysertacji. Przedstawiona praca spełnia wszelkie wymogi określone w ustawie o tytule naukowym i stopniach naukowych. Wobec powyższego pozwalam

sobie wystąpić do Wysockiej Rady o dopuszczenie pani mgr Sabiny Galiniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie nowatorskość tematyki, staranne wykonanie badań oraz dorobek publikacyjny skłaniają mnie do wystąpienia z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy.



prof. dr hab. Janusz Węgrowski

Reims, 15.08.2016