



UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Wydział Lekarski, Katedra i Zakład Chemii i Immunochemii
dr hab. Magdalena Orczyk-Pawilowicz

Wrocław, 18.05.2020

Recenzja

**rozprawy doktorskiej mgr Marty Ząbczyńskiej
pt. „Glikozylacja białek surowicy w chorobie Hashimoto:
analiza strukturalna i funkcjonalna”**

Przedstawiona do oceny praca doktorska została wykonana w Zakładzie Biochemii Glikokoniugatów Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod opieką dr hab. Ewy Pocheć, prof. UJ oraz dra Pawła Link-Lenczowskiego. Zespół od wielu lat prowadzi badania w zakresie analizy profilu glikozylacji białek układu odpornościowego, ze szczególnym uwzględnieniem zmian glikozylacji towarzyszących autoimmunizacyjnym chorobom tarczycy, takim jak choroby Hashimoto i Gravesa-Basedowa. Praca doktorska mgr Marty Ząbczyńskiej jest częścią badań prowadzonych w Zakładzie Biochemii Glikokoniugatów, dedykowanych analizie strukturalnej N-glikanów białek surowicy pacjentów z chorobą Hashimoto oraz ocenie funkcjonalnej zmian glikozylacji.

Łańcuchy oligosacharydowe glikoprotein uczestniczą w przekazywaniu informacji między komórkami oraz pełnią istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu układu odpornościowego. Częstość występowania dysfunkcji układu immunologicznego, w tym chorób o podłożu autoimmunologicznym, dynamicznie wzrasta i stanowi istotny problem diagnostyczny oraz kliniczny. Szczegółowa charakterystyka mechanizmów, z uwzględnieniem glikozylacji, jest kluczowa dla wyjaśnienia przyczyn tych dysfunkcji. Choroba Hashimoto, zaliczana do autoimmunizacyjnych chorób tarczycy, jest związana z utratą tolerancji immunologicznej na własne antygeny tarczycy, co z kolei prowadzi do wnikania aktywowanych limfocytów do tkanki gruczołu i powoduje niszczenie tyreocytów. Etiologia choroby Hashimoto jest wieloczynnikowa, wskazuje się udział czynników genetycznych w połączeniu z czynnikami środowiskowymi oraz wpływ infekcji. Chroniczny stan zapalny towarzyszący chorobom autoimmunizacyjnym, zmienia profil N-glikozylacji białek surowicy, w tym IgG. Jak dotąd zmiany zachodzące na poziomie molekularnym oraz konsekwencje funkcjonalne tych zmian są słabo poznane. W piśmiennictwie naukowym brak szczegółowych danych dot. profilu glikozylacji białek u pacjentów ze zdiagnozowaną chorobą Hashimoto. Mając na uwadze powyższe fakty stwierdzam, że podjęty przez Doktorantkę temat badawczy jest aktualny i niewątpliwie uzyskane wyniki badań stanowią wartość dodaną w badaniach prowadzonych nad wyjaśnieniem procesów towarzyszących chorobie Hashimoto.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Marty Ząbczyńskiej to spójny tematycznie cykl trzech publikacji, obejmujący dwie prace eksperymentalne opublikowane w 2020 roku oraz jeden artykuł przeglądowy z 2018 roku. We wszystkich publikacjach wchodzących w skład cyklu Doktorantka jest pierwszym autorem, a Jej wiodąca rola w zakresie koncepcji i wykonania badań (70% w dwóch i 60% w jednej) została potwierdzona odpowiednimi oświadczeniami pozostałych współautorów. W opinii recenzenta w przypadku rozprawy doktorskiej w formie cyklu prac, zwłaszcza jeśli ukazały się w renomowanych recenzowanych czasopismach z listy Journal Citation Reports, należy uwzględnić fakt przejścia ocenianych prac przez rygorystyczny tryb *peer-review*. Prace stanowiące rozprawę doktorską charakteryzują się wysokim współczynnikiem wpływu IF, odpowiednio *Int. J. Mol. Sci.* IF=4,183, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* IF=3,681 oraz *Biomolecules* IF=4,694, sumaryczna wartość IF=12,558.

Tytuł rozprawy doktorskiej odzwierciedla jej zawartość, praca została przedstawiona na 104 stronach i ma typowy układ z podziałem na poszczególne rozdziały: Streszczenie - w języku polskim i angielskim, Wstęp, Cele, Prace naukowe stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej, Oświadczenia współautorów, Dyskusja oraz Bibliografia. We wstępie Doktorantka wprowadza czytelnika w tematykę zagadnień będących przedmiotem Jej badań. W artykule „*Glycosylation in the Thyroid Gland: Vital Aspects of Glycoprotein Function in Thyrocyte Physiology and Thyroid Disorders*” opublikowanym w *Int. J. Mol. Sci.* w 2018 roku, wchodzącym w skład rozprawy, Doktorantka na podstawie bardzo obszernego przeglądu danych literaturowych szczegółowo scharakteryzowała profil glikozylacji kluczowych glikoprotein tarczycy oraz jego znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania gruczołu. Podsumowała aktualny stan wiedzy w zakresie struktury i funkcji glikoprotein stanowiących autoantygeny w autoimmunizacyjnych chorobach tarczycy oraz wskazała najistotniejsze zmiany glikozylacji towarzyszące procesom nowotworowym, a także chorobom autoimmunizacyjnym tarczycy.

Pani mgr Marta Ząbczyńska precyzyjnie zdefiniowała cele swoich badań, których wyniki zawarła w 2 pracach eksperymentalnych omawianego cyklu. Pierwszym zdefiniowanym celem było określenie profilu N-glikozylacji białek surowicy pozbawionej IgG, pochodzącej od pacjentów z chorobą Hashimoto. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki analiz strukturalnych puli N-glikanów oraz wcześniejsze prace Zespołu stanowiły przesłankę do podjęcia dalszych badań funkcjonalnych. Drugim celem badań była ocena funkcji zmienionej w przebiegu choroby Hashimoto glikozylacji IgG w modelach *in vitro* procesów cytotoxyczności komórkowej zależnej od przeciwciał (ADCC) i cytotoxyczności zależnej od dopełniacza (CDC). Kryteria włączenia i wyłączenia pacjentów do badań zostały jasno zdefiniowane, a grupa kontrolna odpowiednio dobrana pod względem płci i wieku. Pacjentów z chorobą Hashimoto rekrutowano na podstawie podwyższonego miana przeciwciał anty-TPO i anty-Tg oraz obrazu USG tarczycy. Materiałem badawczym do analiz glikozylacji białek była surowica pozyskana od „ponad 200 pacjentów” z chorobą Hashimoto i osób zdrowych, uprzednio pozbawiona frakcji IgG (str. 19). Natomiast w streszczeniu Doktorantka podaje inne wartości: „grupa badana, n=51 i grupa kontrolna, n=61” (n=41 w publikacji).

Metody zastosowane przez Doktorantkę są adekwatne do założonych celów badań. Do realizacji pierwszego Doktorantka zastosowała równoległe dwie strategie, które pozwoliły na szczegółową charakterystykę profilu N-glikozylacji glikoprotein surowicy pozbawionej frakcji IgG metodą wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej (HPLC), a następnie identyfikację struktur N-glikanów z zastosowaniem LS-MS oraz analizę profilu fukozytacji i sjalizacji poszczególnych glikoprotein przy użyciu panelu specyficznych lektyn. W rozdziale dot. omówienia prac wchodzących w skład rozprawy na str. 21 Doktorantka napisała: „*Natomiast metodą lektynową określono skład cukrowy glikoprotein rozdzielonych elektroforetycznie.*” Nie jest to właściwe sformułowanie, ponieważ zastosowana przez Doktorantkę metoda lektynowa pozwala jedynie na określenie profilu fukozytacji/sjalizacji na podstawie reaktywności lektyn z glikoproteinami po rozdziale elektroforetycznym (SDS-PAGE).

Do realizacji drugiego celu tj. analizy funkcjonalnej zmian glikozylacji IgG Doktorantka wykorzystwała modele *in vitro* cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał i cytotoksyczności zależnej od dopełniacza. Ilość wykonanych analiz oraz uzyskane wyniki świadczą o bardzo dobrym opanowaniu warsztatu badawczego przez Doktorantkę. Wartość eksperymentalna wszystkich metod zastosowanych w obu pracach do realizacji założonych celów jest znaczna i oceniam ją wysoko. Analizy uzyskanych wyników eksperymentalnych także cechuje wysoki poziom merytoryczny.

Zwieńczeniem przedstawionej pracy doktorskiej jest rozdział omawiający uzyskane wyniki. Doktorantka opisuje wyniki swoich badań i równoległe prowadzi dyskusję porównawczą w aspekcie aktualnego stanu wiedzy. Cała dyskusja jest przeprowadzona prawidłowo i pozwala ocenić oryginalność oraz nowatorstwo przeprowadzonych badań. Analiza tego fragmentu dysertacji pozwala z całą pewnością stwierdzić, że przedstawiona do oceny praca zawiera szeroki wachlarz wyników o wysokiej wartości naukowej. Pani mgr Marta Ząbczyńska bardzo krytycznie odnosi się do uzyskanych wyników i uważa, że „*Aby jednoznacznie ocenić, czy zmiany glikozylacji (...) są zjawiskiem towarzyszącym chorobie Hashimoto, czy może należą do mechanizmów indukujących autoimmunizację potrzeba dodatkowych badań.*” Krytyczne podsumowanie swoich badań świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki oraz wskazuje na znaczną wiedzę w obszarze planowania, a także przeprowadzania prac badawczych.

Pracę doktorską podsumowuje pięć prawidłowo sformułowanych wniosków, odpowiednich do uzyskanych w pracach eksperymentalnych wyników: trzy dot. badań glikozylacji białek surowicy pacjentów z chorobą Hashimoto oraz dwa dla modeli *in vitro* procesów ADCC i CDC. Chorobie Hashimoto towarzyszy zamiana profilu sjalizacji białek surowicy, przy czym wykazane zmiany dotyczą pojedynczych białek. Zdaniem Doktorantki, dwa typy N-glikanów białek surowicy u pacjentów z Hashimoto, tj. A3G3S1 (jednosjalowane trzyantenowe) oraz FA2G2S2 (dwusjalowane dwuantenowe z fukożą antenową) mogą być potencjalnie wykorzystane jako glikomarkery tej choroby. Z kolei wyniki badań na opracowanych przez Doktorantkę modelach *in vitro* procesów ADCC i CDC wskazują, że zmieniona glikozylacja IgG u pacjentów z chorobą Hashimoto, tj. obniżona sjalizacja glikanów IgG, powodująca odsłonięcie reszt galaktozy w N-glikanach, sprzyja lizie

tyreocytów. Zdaniem recenzenta, założony cel pracy doktorskiej został w całości osiągnięty, a uzyskane w trakcie realizacji pracy doktorskiej wyniki stanowią istotny wkład w aktualny stan wiedzy.

Całość autoreferatu jest napisana poprawnym językiem, chociaż Doktorantka nie uniknęła drobnych błędów językowych czy nieścisłości (np. skróty: FcR, SAMP i TSHR - odpowiednio FcγR, SAMPs i TSHR - receptor TSH). Moja uwaga dotyczy także „niefortunnych” określeń, tj. „terminalnej” pozycji monosacharydów, „deplecji” IgG (str. 20) czy „rdzenną” Fuc (str. 88), drobnych różnic w treści streszczenia w języku polskim i angielskim oraz niekonsekwencji w stosowaniu nazewnictwa dot. lektyn. Do dyskusji pozostawiam użycie słów: sjalilacja (sjalizacja) oraz typy struktur N-glikanów tj. hybrydowe (mieszane) i kompleksowe (złożone) - zdania w środowisku glikobiologów w tym zakresie są podzielone. Zamieszczone tutaj uwagi i wątpliwości nie mają wpływu na moją bardzo wysoką ocenę pracy.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Marty Ząbczyńskiej pt. „Glikozylacja białek surowicy w chorobie Hashimoto: analiza strukturalna i funkcjonalna” spełnia wszystkie zwyczajowe i ustawowe warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003r. Nr 65, poz., 595, z późn. zm.). Na uwagę zasługuje również pozostała część dorobku Pani mgr Marty Ząbczyńskiej przedstawiona w opublikowanych pracach oraz komunikatach konferencyjnych. Świadczy to o znacznej aktywności naukowej Doktorantki oraz zaangażowaniu w prace badawcze Zespołu. Wnioskuje zatem do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o przeprowadzenie kolejnych etapów postępowania w sprawie nadania Pani mgr Marcie Ząbczyńskiej stopnia doktora w obszarze nauk przyrodniczych w dziedzinie nauk biologicznych w dyscyplinie biologia.

Równocześnie, biorąc pod uwagę unikalność poruszanego tematu, wykonanie eksperymentów z wykorzystaniem bogatego panelu metod badawczych, wysoki poziom merytoryczny prac stanowiących rozprawę doktorską oraz duży wpływ wyników na rozwój dyscypliny wnosząc o wyróżnienie rozprawy doktorskiej odpowiednią nagrodą.

Magdalena
Orczyk-Pawilowicz