

**WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII**

PRACOWNIA BIOLOGII MEDYCZNEJ

ul. Joliot-Curie 14a

50-383 Wrocław

www.biotech.uni.wroc.pl

Prof. dr hab. Teresa Olczak

Wrocław, 11.05.2018 r.

Tel. 71 3752 612

E-mail: teresa.olczak@uwr.edu.pl

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Jolanty Lis-Kuberka pt. „Fukozylacja białek mleka ludzkiego w odniesieniu do etapów dojrzewania mleka”**

Rozprawa doktorska mgr inż. Jolanty Lis-Kuberka została zrealizowana w Katedrze i Zakładzie Chemii i Immunochemii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu pod kierunkiem prof. dr hab. Marii Iwony Kątnik-Prastowskiej oraz dr hab. Magdaleny Orczyk-Pawiłowicz. Promotor Doktorantki oraz jego zespół od wielu lat zajmują się badaniami skoncentrowanymi na analizie glikozylacji białek u osób zdrowych oraz pacjentów z różnymi schorzeniami. Tematyka podjęta w pracy doktorskiej przez Doktorantkę wpisuje się w nurt tych badań i jest jej kontynuacją. Rozprawa doktorska mgr inż. Jolanty Lis-Kuberka to dwie oryginalne publikacje naukowe w języku angielskim oraz jedna praca przeglądowa w języku polskim. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem. Łączny współczynnik oddziaływania (IF) wszystkich prac wynosi ok. 4, a prace były cytowane 2 razy. Całość rozprawy doktorskiej została opatrzona autoreferatem wprowadzającym w temat pracy podjęty przez Doktorantkę. Rozprawa doktorska liczy 73 strony i oprócz Autoreferatu wraz z piśmiennictwem zawiera streszczenie w języku polskim oraz angielskim oraz kopie trzech prac, będących podstawą rozprawy doktorskiej, a także oświadczenia współautorów.

Ocena rozprawy doktorskiej w formie przedstawionej przez Doktorantkę z jednej strony jest prostsza w porównaniu z tradycyjną formą prac doktorskich, bo nie trzeba rozpatrywać wyników opisanych na wielu stronach pracy. Pewnym ułatwieniem jest także zapoznanie się z opublikowanymi pracami, które zostały już pozytywnie ocenione przez innych recenzentów, co w dużej części właściwie zwalnia Recenzenta od ich szczegółowej oceny. Zdaniem Recenzenta pewnym utrudnieniem jest jednak brak szczegółowego opisu wszystkich dokonań Doktorantki z jej własnym, szerokim uzasadnieniem oraz dyskusją. Autoreferat jedynie streszcza i bardzo ogólnie przedstawia osiągnięcia naukowe, które zostały przedstawione w opublikowanych pracach, a opublikowane prace zazwyczaj są bardzo zwarte. Dlatego też, Recenzent prosi o wyjaśnienia i krótką dyskusję odnośnie nasuwających

się w trakcie oceny rozprawy doktorskiej wątpliwości, zasadniczo w celu umożliwienia wykazania się Doktorantce szerszą wiedzą, aniżeli ta przedstawiona w sposób zawężony w publikacjach stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej. Praca doktorska obejmuje, jak wskazuje Doktorantka: „wyniki badań laboratoryjnych opublikowanych w dwóch pracach doświadczalnych oraz jedną pracę przeglądową”. Praca przeglądowa zawiera obszerny przegląd danych literaturowych, dotyczących tematyki podjętej przez Doktorantkę w pracy doktorskiej i stanowi bardzo dobre wprowadzenie do omówienia pracy doktorskiej. Nie jest wiadomo natomiast, jaki był cel rozprawy doktorskiej, gdyż nie został on jasno sformułowany na początku Autoreferatu, a pojawia się on dopiero w streszczeniu. Jak pisze Doktorantka „...celem pracy była analiza względnej reaktywności fukozo-swoistych lektyn z eksponowanymi resztami  $\alpha$ 1,2-,  $\alpha$ 1,3-, i  $\alpha$ 1,6-związanej fukozy na glikoproteinach mleka ludzkiego, w tym immunoglobuliny G (IgG) w odniesieniu do etapów dojrzewania mleka ludzkiego, a w przypadku IgG także w odniesieniu do okołoporodowych czynników ryzyka, takich jak poród przedwczesny i matczyzna infekcja.” Zdaniem Recenzenta, założony cel pracy doktorskiej został w całości osiągnięty. Także uzyskane w trakcie realizacji pracy doktorskiej wyniki stanowią wkład w obecny stan wiedzy.

W pracy doktorskiej Doktorantka scharakteryzowała profile fukozytacji w próbkach odtłuszczonego mleka, pobranych od matek w różnym czasie dojrzewania mleka, uwzględniając czas porodu oraz ewentualne infekcje matczyne. Dodatkowo, Doktorantka zanalizowała profile fukozytacji IgG występujących w próbkach mleka. Do analizy zostały wykorzystane lektyny specyficzne wobec reszt fukozy przyłączonych do oligosacharydów glikoprotein. Uzyskane wyniki wykazały, że profil fukozytacji w glikoproteinach odtłuszczonego mleka, w tym we frakcji IgG, zmienia się w czasie dojrzewania mleka. Doktorantka zasugerowała, że tak zmieniający się profil fukozytacji glikoprotein występujących w mleku ludzkim matek rodzących w terminie, bez infekcji matczynej, może sprzyjać lepszemu rozpoznawaniu i ich wiązaniu przez fukozo-zależne lektyny patogenów, zwłaszcza w pierwszych dniach życia niemowląt. Powinno to mieć swoje odzwierciedlenie w dodatkowej odporności noworodków, przekazywanej z mlekiem matki. Zdaniem Doktorantki „szczegółowa charakterystyka wzoru fukozytacji glikoprotein może zapewnić dodatkowe wytyczne, które mogłyby przyczynić się do właściwego doboru deponowanego mleka w Bankach Mleka najwyższej jakości, a także poprawy jakości składu sztucznych mieszanek mlecznych.”

Na podstawie prac będących podstawą rozprawy doktorskiej Recenzent wnioskuje, że mgr inż. Jolanta Lis-Kuberka do realizacji prowadzonych badań wykorzystwała standardowe

metody badawcze. Wszystkie prace zawierają wyniki naukowe obejmujące globalną analizę, ale nie podjęto w nich próby dokonania bardziej dogłębnych badań, mających na celu np. zanalizowanie struktur cukrowych w wybranych glikoproteinach. Wydaje się, że jest to dopiero zapoczątkowanie właściwych badań naukowych, polegające na przesiewowej analizie bardzo wielu prób z wykorzystaniem narzędzi i technik, które nie są jednak zbyt specyficzne. Dlatego też, Recenzent prosi o zaproponowanie dalszych badań oraz oczekiwanych wyników uzyskanych po ich ewentualnym przeprowadzeniu w przyszłości. Jakie doświadczenia, zdaniem Doktorantki powinny zostać wykonane, aby uzyskać więcej konkretnych danych i w jakim celu takie dane mogą być wykorzystane ?

Recenzent docenia duży wkład pracy włożony w globalną analizę tak wielu próbek i częściowo zgadza się wnioskami wysuniętymi przez Doktorantkę. Czując jednak pewien niedosyt, prosi o ustosunkowanie się do poniższych uwag. Po pierwsze, w pracy doktorskiej zbadano tylko globalnie profil fukozytacji, dodatkowo stosując, jak sugeruje to również Doktorantka, mało specyficzne narzędzie, jakim są lektyny. Po drugie, metoda wykorzystana do analizy fukozytacji frakcji IgG nie daje gwarancji pełnej charakterystyki całkowitej puli IgG obecnych w próbkach mleka, gdyż nie ma pewności, czy wszystkie IgG zostały związane w tej metodzie i poddane oddziaływaniu z lektynami. Wydaje się, że izolacja frakcji IgG i szczegółowa charakterystyka struktur cukrowych byłaby tu bardziej cenna. Po trzecie, analiza pasm uzyskanych po transferze glikoprotein i ich wybarwieniu nie daje gwarancji pełnego pomiaru z wykorzystaniem densytometrii. Dzieje się tak zwłaszcza w przypadku dużych pasm, składniki których niekoniecznie muszą mieć szansę przereagowania z substratem w całości, gdyż może go być za mało. Należy także uwzględnić straty wynikające z transferu białek na błonę nitrocelulozową, często nierównomierne na całej powierzchni błony. Także ocena ilościowa z wykorzystaniem densytometrii w przypadku lektynoblottingu nie jest zbyt fortunna, gdyż zarówno transfer, jak i detekcja nie pozwalają na miarodajne odzwierciedlenie reaktywności. Dlatego też, chociaż bardzo dokładnie przeprowadzona, tak szczegółowa analiza statystyczna nie wydaje się być konieczna w tym przypadku. Zasadniczo uzyskane wyniki powinny zostać potwierdzone z wykorzystaniem alternatywnej metody, a prace będące podstawą rozprawy doktorskiej takich analiz nie zawierają.

W Autoreferacie na stronie 5 Doktorantka pisze: „...skłoniły mnie do analizy ekspresji  $\alpha$ 1,2-,  $\alpha$ 1,3-, lub/i  $\alpha$ 1,6- fukozy na glikanach glikoprotein...”. Nie jest to właściwe sformułowanie, gdyż zastosowane przez Doktorantkę metody pozwalają jedynie na określenie profilu fukozytacji, a właściwie na ocenę reaktywności lektyn z glikoproteinami obecnymi w mleku, a nie na analizę „ekspresji fukozy” obecnej w glikanach.

Opublikowanie prac, uprzednio recenzowanych przez innych zwalnia Recenzenta z ich szczegółowej oceny. Autoreferat jest natomiast napisany poprawnym językiem, chociaż Doktorantka niekonsekwentnie używa niektórych sformułowań w Autoreferacie oraz w pracy przeglądowej, takich jak N-acetyloglukozamina (Autoreferat) i N-acetyloglukozoamina (praca przeglądowa).

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Jolanty Lis-Kuberka spełnia wymogi Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. Nr 65, poz. 595), z późniejszymi zmianami. Na pozytywną uwagę zasługuje również pozostała część dorobku mgr inż. Jolanty Lis-Kuberka, przedstawiona w opublikowanych pracach oraz komunikatach konferencyjnych. Świadczy to o aktywności naukowej Doktorantki oraz zaangażowaniu w prace badawcze zespołu. Dlatego też, wnoszę do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie mgr inż. Jolanty Lis-Kuberka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Teresa Olasek*