



Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu BIURO RADY DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNE	
wpł. dnia	28 -06- 2023
L. dz. RN-BW/	M49

Zabrze, 16.06.2023

Woli 29.06.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej

lek. Kamila Litwinowicza

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
RADA DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNE
Zastępca przewodniczącego
m. Podhorska-Okołów
prof. dr hab. Marzenna Podhorska-Okołów

„Ocena produktów zaawansowanej glikacji i mikrobiomu u pacjentów nadużywających alkoholu”

Promotor: Prof.dr hab. Andrzej Gamian

Tematyka przedstawionej rozprawy doktorskiej „Ocena produktów zaawansowanej glikacji i mikrobiomu u pacjentów nadużywających alkoholu” lek. Kamila Litwinowicza dotyczy zaburzeń używania alkoholu (AUD) co pozostaje wciąż istotną przyczyną śmiertelności na świecie. Nadużywanie alkoholu stanowi podstawę rozwoju ponad 40 jednostek chorobowych, wśród których jedną z najważniejszych jest alkoholowa choroba wątroby (ALD). Doktorant w swojej rozprawie doktorskiej analizuje problem alkoholowej choroby wątroby, w której uszkodzenie wątroby może przebiegać wieloetapowo od alkoholowego stłuszczenia wątroby, poprzez alkoholowe zapalenie wątroby, aż do alkoholowej marskości wątroby. Do podjęcia tematu skłoniła Doktoranta różnorodność mechanizmów powiązanych z uszkodzeniem wątroby u pacjentów nadużywających alkoholu (AUD). Poznanie mechanizmów leżących u podstaw progresji wczesnego ALD do postaci bardziej zaawansowanych uszkodzeń wątroby umożliwiłoby odpowiednio wczesne wdrożenie działań profilaktycznych, co byłoby niezwykle korzystne zarówno ze względów medycznych jak i społecznych.

Celem pracy była ocena powiązania alkoholowego zapalenia wątroby ze stężeniem AGE10 w osoczu, ocena dokładności diagnostycznej AGE10 w odróżnianiu pacjentów z ALD od zdrowych, ocena powiązania i dokładności diagnostycznej klasycznych typów AGE z ALD a także ocena zaburzeń mikrobiomu związanych z AUD i ALD.

Interakcje AGE z receptorem RAGE wywołują szereg zmian w organizmie, aktywację różnych szlaków molekularnych co doprowadza do uwalniania cytokin

prozapalnych oraz wytwarzania reaktywnych form tlenu. Uwagę doktoranta zwrócił niedawno wykryty w tkankach człowieka, niezbadany jeszcze epitop AGE10 reagujący z przeciwciałami przeciwko syntetycznemu MAGE, uzyskanemu w wyniku reakcji między białkami i melibiozą. Przeciwciała anty -MAGE nie reagują z żadną z klasycznych frakcji AGE, w związku z czym wykryty epitop stanowi nowy, niezbadany do tej pory typ AGE. Szczególnie interesujące było dla Doktoranta określenie aktywności mikrobowej α -galaktozydazy. Jest to enzym odpowiedzialny między innymi za hydrolizę melibiozy. Zmiany jego aktywności mogłyby powodować zmiany w puli melibiozy w ustroju, potencjalnie zwiększając dostępność substratu do generowania AGE10/MAGE. Nowoczesne narzędzia bioinformatyczne pozwalające na ocenę profilu funkcjonalnego mikrobiomu na podstawie wyników sekwencjonowania 16S rRNA, umożliwiły Doktorantowi realizację założeń pracy i zgłębienie tego interesującego tematu.

Na rozprawę doktorską Pana lek. Kamila Litwinowicza składają się 3 spójne tematycznie publikacje. Wszystkie prace składające się na cykl zostały opublikowane w renomowanych czasopismach o wysokim wskaźniku Impact Factor. Łączna wartość współczynnika IF w cyklu prac wyniosła 19,62, zaś liczba punktów MNiSW - 420.

Prace podlegały już rzetelnej recenzji na etapie publikacji w czasopismach, co gwarantuje, że zawarte w nich treści są poprawne metodycznie i zawierają istotne wyniki badań. Moim zadaniem było jeszcze raz przyjrzenie się przedstawionym pracom i zaznajomienie się z zawartą w nich interesującą tematyką.

Pierwsza publikacja w cyklu „Advanced glycation end-products in common non-infectious liver diseases: systematic review and meta-analysis.” opublikowana w czasopiśmie *Nutrients* (IF:6,706, MNiSW:140) stanowi przegląd systematyczny i metaanalizę opracowaną zgodnie z wytycznymi PRISMA. Włączono do niej 11 artykułów. Prace te potwierdzały, że stężenia klasycznych podtypów AGE (frakcji fluorescencyjnej oraz CML) są istotnie wyższe u pacjentów z alkoholową chorobą wątroby w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną. Jednak żadna z prac nie uwzględniła w swoich wynikach dokładności diagnostycznej dla alkoholowej choroby wątroby co stało się przyczyną podjęcia przez Doktoranta dalszych prac badawczych w tym temacie. AGE stanowią heterogenną grupę związków, a poszczególne typy AGE różnią



się między innymi siłą wiązania ze swoistym receptorem (RAGE). Ocena stężenia poszczególnych typów AGE (a nie tylko zbiorcza ich analiza) ma duże znaczenie patofizjologiczne.

W drugiej z publikacji „Alcoholic Liver Disease Is Associated with Elevated Plasma Levels of Novel Advanced Glycation End-Products: A Preliminary Study” opublikowanej także w czasopiśmie *Nutrients* (IF:6,706, MNiSW:140) Doktorant podjął się badania, przy użyciu metody ELISA, nowoodkrytego podtypu AGE (AGE10). Badanie przeprowadził u 65 pacjentów z alkoholowym zapaleniem wątroby, u których wykazał istotnie wyższe stężenie AGE10 w osoczu w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej. Doktorant podjął się oceny czułości i swoistości zastosowanego testu aby ocenić jego przydatność diagnostyczną. AUC wynosiła 0.778, a dla wartości odcięcia 147.25 µg/mL czułość diagnostyczna wynosiła 75% a swoistość 72% .

Trzecia publikacja pod tytułem „Microbiome Alterations in Alcohol Use Disorder and Alcoholic Liver Disease” opublikowana w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* (IF:6,208, MNiSW:140) opiera się na analizie sekwencji 16S rRNA przy wykorzystaniu nowoczesnych narzędzi bioinformatycznych. Mając na uwadze fakt, że niektóre stosowane metody miały odsetek fałszywych odkryć (FDR) wynoszący nawet 70% wybór odpowiednich narzędzi bioinformatycznych wydaje się mieć kluczowe znaczenie dla uzyskania wiarygodnych wyników. Kontrolę jakości i wstępną obróbkę bioinformatyczną sekwencji przeprowadzono z wykorzystaniem USEARCH. Do uzyskania wariantów sekwencji amplikonu użyto algorytmu UNOISE3. Taksonomię przypisano z użyciem IDTAXA i bazy GTDB07-RS207. Potencjał funkcjonalny mikrobiomu uzyskano przez PICRUSt2 z Metacyc jako bazą referencyjną. Różnicę w proporcjach występowania poszczególnych taksonów i w potencjalne funkcjonalnym określono z wykorzystaniem ANCOM-BC. Doktorant zaobserwował bardzo liczne zmiany mikrobiomu związane z AUD i ALD. Należą do nich między innymi proporcjonalny spadek typu Firmicutes oraz wzrost w typie Proteobacteria. Do spadku w Firmicutes w największym stopniu przyczyniły się rodziny Ruminococcaceae, Lachnospiraceae, Oscillospiraceae i Butyricoccaceae. Za wzrost Proteobacteria odpowiadały głównie rodziny Enterobacteriaceae i Burkholderiaceae. Zmiany te były bardziej zaznaczone u pacjentów z ALD w porównaniu z grupą AUD bez uszkodzenia wątroby. W profilu funkcjonalnym Doktorant zaobserwował proporcjonalne zwiększenie



szlaku związanego z syntezą lipopolisacharydu. Nie wykazał jednak żadnych istotnych różnic w aktywności α -galaktozydazy pomiędzy AUD, ALD i grupą kontrolną.

Efekty swojej pracy Doktorant dodatkowo przedstawił w postaci bardzo kompaktowego i czytelnego opracowania, które zawiera: wykaz stosowanych skrótów, wstęp, cel eksperymentu i tezy badawcze, metodologię eksperymentu, opis uzyskanych wyników, wnioski, oraz publikacje wchodzące w skład cyklu.

Przedłożony mi do oceny cykl prac stanowi bardzo spójną całość. Prawdłowo sformułowane przez Doktoranta tezy badawcze bardzo dobrze korespondują z przedstawionymi wnioskami, wysuniętymi na podstawie przeprowadzonego eksperymentu badawczego.

Warto podkreślić że we wszystkich trzech publikacjach cyklu lek. Kamil Litwinowicz jest pierwszym autorem. Zestawienie w prezentowanym cyklu pracy poglądowej zawierającej przegląd aktualnej literatury z pracą doświadczalną, w której Doktorant dzieli się wynikami swojego eksperymentu aż po pracę z wykorzystaniem metod bioinformatycznych świadczy o olbrzymiej wiedzy teoretycznej i praktycznej Doktoranta oraz umiejętności posługiwania się nowoczesnymi narzędziami badawczymi w celu zgłębienia tematu i jego dogłębnej analizy .

Dotychczasowy dorobek naukowy Doktoranta, poza cyklem, obejmuje 6 prac o łącznym współczynniku IF wynoszącym 33,04, zaś liczba punktów MNiSW wynosi 655. Doktorant jest rezydentem w dziedzinie Radiologii i Diagnostyki Obrazowej. Jest członkiem Polskiego Lekarskiego Towarzystwa Radiologii oraz Europejskiego Towarzystwa Radiologicznego.

Nie wnoszę żadnych uwag krytycznych do przedstawionej pracy. Przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską „Ocena produktów zaawansowanej glikacji i mikrobiomu u pacjentów nadużywających alkoholu” lek. Kamila Litwinowicza oceniam wysoce pozytywnie i jeszcze raz chciałabym podkreślić jej wysoką wartość naukową i merytoryczną.

Przedstawiona praca w pełni odpowiada kryteriom stawianym przed kandydatami do stopnia doktora, spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018r poz 1668). W związku z tym mam zaszczyt zwrócić się do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we



Wrocławiu z wnioskiem o dopuszczenie lek. Kamila Litwinowicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na nowatorstwo uzyskanych wyników oraz opublikowaniu ich w wysoko punktowanych czasopismach naukowych zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu z wnioskiem o wyróżnienie przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej.

Z wyrazami szacunku

PROFESOR SUM BADAWCZO-DYDAKTYCZNY
Katedry i Zakładu Biochemii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach


dr hab. n. med. Ewa Romuk, prof. SUM