



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.hirsztfeld.pl

Zakład Immunologii Chorób Zakaźnych  
Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej

Wrocław, 01.03.2024

## RECENZJA

### **rozprawy doktorskiej lek. Pana Otto Krawca pt.:” Badania produktów zaawansowanej glikacji jako biochemicznego markera nowotworu prostaty i uszkodzenia tkanki kostnej”**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska lek. Otto Krawca została wykonana pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Andrzeja Gamiana oraz Pani Prof. dr hab. Anny Chełmońskiej-Soyty w Katedrze Biochemii i Immunochemii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Celem pracy było zweryfikowanie obecności produktu końcowego zaawansowanej glikacji o nazwie AGE10 wraz z jego receptorami w nowotworach prostaty człowieka i psa oraz w tkankach szczura uprzednio poddanych działaniu związków toksycznych. Ponadto podjęto próbę wyznaczenia korelacji między AGE10, a jego receptorem RAGE w badanym materiale biologicznym.

Końcowe produkty zaawansowanej glikacji – AGE budzą szerokie zainteresowanie wśród naukowców i lekarzy ze względu na ich rolę w chorobach układu krążenia, cukrzycy, nefropatii, reumatoidalnym zapaleniu stawów, dysfunkcji w przebudowie kości oraz w chorobach neurologicznych (np. choroba Alzheimera i Parkinsona), wzroście nowotworów, przerzutów i innych chorobach zwyrodnieniowych. Lista związków należących do tej grupy jest długa, a ich rola w komórce nie jest do końca poznana. Stężenie AGE zwiększa się w organizmie wraz z wiekiem, w związku z tym mogą być one ważnym markerem diagnostycznym wielu jednostek chorobowych. Ich oznaczenie może pozwolić na monitorowanie postępu choroby i skuteczności terapii. Z tego powodu badania nad opracowaniem testu lub metody diagnostycznej umożliwiającej oznaczanie ilościowe AGE w surowicy oraz tkankach są niezwykle ważne. W związku z powyższym uważam, że badania przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej są bardzo cennym wkładem naukowym w zakresie nauk medycznych, które mogą przyczynić się do bardziej precyzyjnej diagnostyki m.in. nowotworów prostaty oraz dysfunkcji związanych z uszkodzeniem tkanek pod wpływem działania związków toksycznych jakimi są dioksyny.

Przedstawiona do oceny dysertacja jest opracowaniem składającym się z dziewięciu rozdziałów i liczy w sumie osiemdziesiąt cztery strony. Monografia podzielona jest według standardowych norm przyjętych dla prac naukowych. Pracę rozpoczyna wstęp, a następnie podano cel pracy i dalej, przedstawiony jest opis części głównej, która zawiera szczegółowy opis materiałów i metod użytych w badaniach, wyniki, dyskusję oraz wnioski. Opracowanie zakończone jest streszczeniem w j. polskim i j. angielskim oraz wykazem piśmiennictwa, które liczy sto dwadzieścia sześć pozycji.

We „Wstępie” liczącym dwadzieścia stron Autor dokonuje charakterystyki i podziału związków AGE. Wskazuje na możliwe szlaki ich powstawania w organizmie, a następnie przystępuje do opisu AGE10, który jest kluczowy w niniejszej dysertacji. W dalszej części Doktorant dokonuje charakterystyki receptora dla związków AGE, czyli – RAGE ze wskazaniem korelacji jego zwiększonej ekspresji w różnych jednostkach chorobowych,



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.hirszfeld.pl

skupiając się głównie na nowotworze prostaty. Doktorant opisuje także grupę związków zwanych dioksynami, które obecne są w zanieczyszczonym powietrzu i wskazuje na ich szkodliwość, z uwzględnieniem ich teratogenego wpływu na organizm, a także przyczynianie się do zwiększania reaktywnych form tlenu w komórkach i wzmaganie stanów zapalnych, co w konsekwencji prowadzi do zintensyfikowania procesów glikacji. W końcowej części „Wstępu” Doktorant bardzo dokładnie opisuje zagadnienie dotyczące budowy i stanów patologicznych gruczołu krokowego u ludzi oraz psów, a także koncentruje się na diagnostyce i leczeniu raka prostaty.

Rozdział ten zawiera siedem rycin, co jest pomocne we wprowadzeniu czytelnika w poruszone zagadnienie badawcze i należy podkreślić, że „Wstęp” opiera się o aktualne piśmiennictwo. W tym rozdziale dokonany jest przegląd dotyczący zarówno diagnostyki jak i skuteczności leczenia raka prostaty, co wskazuje na istotność podjętych przez Doktoranta badań w kierunku opracowania metodologii bardziej precyzyjnego i mniej kosztownego diagnozowania tego nowotworu.

W rozdziale „Cel pracy” Doktorant postawił trzy cele w swoich badaniach: a) immunohistochemiczną identyfikację obecności AGE10 w tkankach nowotworu prostaty u człowieka i psa, b) immunohistochemiczną identyfikację obecności RAGE w tkankach prostaty u człowieka i próba określenia korelacji względem AGE10, c) immunohistochemiczną identyfikację obecności AGE10 w tkankach szczura poddanych działaniu związków cytotoksycznych. Z opisu wprowadzającego do niniejszej dysertacji oraz z rozdziału „Dyskusja” wnioskuję, iż celem nadrzędnym miało być uzyskanie odpowiedzi na pytanie, czy identyfikacja AGE10 za pomocą przeciwciał monoklonalnych anti-MAGE oraz wykazanie korelacji między poziomem AGE10 i RAGE w tkankach zmienionych patologicznie może być wykorzystane w celach diagnostycznych. W związku z powyższym, by rozwiać wszelkie wątpliwości sugerowałabym zdefiniowanie nadrzędnego celu, albo inaczej - założenia podjętych badań.

Ponadto mam jeszcze jedno pytanie do tej części monografii; Doktorant wskazuje, że AGE10 jest analogiem związku syntetycznego o nazwie MAGE (mel-derived AGEs), ponieważ jest on rozpoznawany przez przeciwciała monoklonalne, specyficzne wobec MAGE. Cząsteczka AGE10 nie została jednak nigdy wyizolowana i nie jest znana jej struktura chemiczna. W związku z powyższym AGE10 określa się jako epitop, który jest wspólny zarówno dla MAGE, jak i jest obecny na białkach, które uległy glikacji i tu przykładem są przytoczone w pracy białka – ludzka albumina surowicza oraz przeciwciała klasy IgA i IgG. W rozdziale „Cel pracy” Doktorant pisze - „Niedawno zidentyfikowany produkt zaawansowanej glikacji – AGE10, różni się od pozostałych, klasycznych związków glikacji” – mam w związku z tym prośbę do Doktoranta o doprecyzowanie, co dokładnie wiadomo na temat AGE10. Prosiłabym również Doktoranta o podzielenie się własną interpretacją dotyczącą tego epitopu i skomentowanie jego reaktywności z przeciwciałami anti-MAGE szczególnie w odniesieniu do zaobserwowanej reaktywności anti-MAGE z immunoglobulinami klasy IgA i IgG u osób zdrowych

Rozdział „Materiały i Metody” zawiera sześć punktów i dotyczy głównie metod immunohistochemicznej analizy tkanek w celu określenia obecności antygenów AGE10, RAGE, P63, O37. W rozdziale tym zawarty jest opis eksperymentu na zwierzętach (szczury), mający na celu wykazanie obecności związków AGE w tkankach żuchwy potomstwa matek



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKI HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.hirsztfeld.pl

poddanych działaniu dioksyn. Zastosowane jest modelowanie statystyczne wpływu AGE i/lub RAGE na szansę uzyskania wyższego wyniku Gleasona w diagnostyce raka prostaty. Wymienione powyżej metody są adekwatne do założeń niniejszej pracy doktorskiej. Do tej części pracy mam jednak kilka uwag oraz pytania: 1) Rozdział zaczyna się od metod oczyszczania i analizy przeciwciał anti-MAGE tj. chromatografii powinowactwa, Dot-blotingu, oznaczania stężenia białka. W „Wynikach” nie ma jednak rezultatów tych eksperymentów, co uniemożliwia mi ocenę dotyczącą poprawności analizy preparatu pozyskanych przeciwciał. Szczególnie, że moje wątpliwości budzi wybór zarówno kontroli oraz membrany w teście Dot-blotingu (membrana Immobilon®-P Transfer Membrane, Millipore, o wielkości porów 0,45µm, IPVH00010 dedykowana jest dla białek > 20 kDa, a MAGE jest związkiem niskocząsteczkowym o masie 513 Da. Skąd pewność, że MAGE jest na membranie? Ponadto aby jednoznacznie stwierdzić, że oczyszczane przeciwciała są specyficzne wobec tego antygeny, odpowiednią kontrolą byłoby użycie membrany bez antygeny MAGE i dokonanie dalszych kroków, jak w protokole z uwzględnieniem przeciwciał drugorzędowych).

2) Nie podano producenta przeciwciał użytych w eksperymencie do oceny obecności RAGE.

3) Dodatkowo proszę Doktoranta o doprecyzowanie zasadności użycia przeciwciał anti-O37 w badaniach immunohistochemicznych. Czy Doktorant ma hipotezę dotyczącą tego, jaki marker nowotworu może być wykrywany przez te przeciwciała?

Wyniki są bogato zilustrowane zdjęciami (24 zdjęć mikroskopowych) oraz tabelami. Ta część doktoratu skupia się głównie na analizach immunohistochemicznych oraz analizie statystycznej. Doktorant opisuje zwięźle swoje obserwacje i wyniki analiz immunohistochemicznych. Przedstawiona jest analiza wpływu AGE i RAGE na szansę zezłośliwienia, określoną skalą Gleasona. Z analizy statystycznej Doktorant wnioskuję, iż może istnieć korelacja między ilością AGE, a stopniem zezłośliwienia nowotworu. Jednakże do potwierdzenia tej hipotezy niezbędne jest objęcie badaniami większej grupy osób z nowotworem prostaty.

Rozdział „Wyniki” kończy analiza porównawcza tkanki zębowej noworodków szczura od matek poddanych działaniu samych dioksyn oraz dioksyn w kombinacji z octanem alfa-tokoferolu i kwasem acetylosalicylowym. Doktorant analizuje stopień rozwoju szkliwa oraz brodawek zębowych w materiale biologicznym oraz reaktywność z przeciwciałami anti-MAGE. Wnioskiem uzyskanym z tego eksperymentu jest potwierdzenie szkodliwego wpływu dioksyn na formowanie tkanek żuchwy, któremu towarzyszy tworzenie się AGE. Ponadto wykazano właściwości ochronne octanu alfa-tokoferolu i kwasu acetylosalicylowego wobec toksycznego wpływu dioksyn na formowanie się tkanek kostnych zęba i żuchwy oraz przeciwdziałanie tworzeniu się AGE.

W „Dyskusji” Doktorant dokonuje oceny uzyskanych wyników, a także formułuje wnioski dotyczące użycia wszystkich badanych przeciwciał jako potencjalnych narzędzi w diagnozowaniu raka prostaty. Autor wskazuje, że przeciwciała anti-MAGE oraz anti-O37 mogą być pomocne w diagnostyce wczesnego stadium nowotworu prostaty u ludzi. Doktorant zauważa również brak korelacji między wzrostem AGE10 i wzrostem receptorów RAGE w tej jednostce chorobowej. W dalszej części Dyskusji przedstawiona jest analiza wyników dotyczących szkodliwego wpływu dioksyn na formowanie się tkanek kostnych zębów i żuchwy u szczurów oraz neutralizacji tego wpływu przy użyciu związków przeciwutleniających.



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.hirsztfeld.pl

Dyskusja zakończona jest podsumowaniem, w którym Autor jednoznacznie stwierdza, iż AGE10 jest obecny zarówno w nowotworach prostaty jak i w uszkodzonych tkankach pod wpływem toksycznych związków z grupy dioksyn.

Do tej części pracy mam do Doktoranta pytania: 1) jak skomentuje Pan reaktywność anti-O37 z tkanką raka prostaty, w której wykazano reaktywność jądrową oraz cytoplazmatyczną z komórkami cew przy braku reaktywności zrębu w kontekście użycia tego przeciwciała jako narzędzia diagnostycznego raka prostaty?

2) Czy może Pan skomentować wynik dotyczący braku powstawania AGE10 i w konsekwencji braku reaktywności anti-MAGE w nowotworach prostaty u psa?

Końcowe wnioski przedstawiono w 6 punktach. W mojej ocenie nie wszystkie są konkluzją wyciągniętą na podstawie wyników badań, a jedynie podsumowaniem uzyskanych wyników. Niemniej jednak odnoszą się one do postawionych w pracy celów i stanowią wartościowe zakończenie niniejszej dysertacji.

W pracy zdarzają się błędy interpunkcyjne oraz redakcyjne, nie mają one jednak wpływu na wartość merytoryczną dysertacji. Nadmieniam o nich ze względu na swój obowiązek jako recenzentki pracy.

Podsumowując, jedynym niedopatrzeniem w rozprawie doktorskiej lek Otto Krawca jest brak wyników dotyczących przeciwciał anti-MAGE pomimo, że metodologia ich oczyszczania i analizy została uwzględniona w dysertacji. Na podstawie całościowej zawartości doktoratu wnioskuję jednak, że ta część nie stanowiła istoty badań Doktoranta i mogłaby być pominięta przy założeniu, że anti-MAGE użyte w badaniach immunohistochemicznych spełniają wszelkie kryteria opisane przez ich twórców, wg publikacji - *Staniszewska M, Bronowicka-Szydełko A, Gostomska-Pampuch K, et al. The melibiose-derived glycation product mimics a unique epitope present in human and animal tissues. Sci Rep. 2021;11(1). doi:10.1038/S41598-021-82585-7*

W ogólnej ocenie przedstawione opracowanie posiada wartość naukową oraz praktyczną. Uzyskane wyniki stanowią podstawę do dalszych badań oraz dyskusji w zakresie diagnozowania nowotworów oraz/lub uszkodzeń pod wpływem związków toksycznych przy użyciu epitopu AGE10. W związku z powyższym moja ocena doktoratu Pana Lek. Otto Krawca jest pozytywna. Recenzowana praca doktorska spełnia warunki określone w art.187 ust.1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. 2018 poz. 1668). W związku z powyższym pozwalam sobie przedstawić Radzie Dyscypliny Nauki Medycze Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie lek. Otto Krawca do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Dr hab. Ewa Brzozowska