

V101

Prof. dr hab. n. med. Ewa Birkner

Uniwersytet Medyczny  
we Wrocławiu



RPW/4392/2024 P  
Data: 2024-03-13

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu BIURO RADY DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNE	
wpt. dnia	13-03-2024 388
L. dz. RN-BM/	Zabrze, 12.03.2024.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
RADA DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNE  
Przewodniczący

prof. dr hab. Agnieszka Hałoń

Ocena

Rozprawy doktorskiej lek. Otto Krawiec pt.: Badania produktów zaawansowanej glikacji jako biochemicznego markera nowotworu prostaty i uszkodzenia tkanki kostnej

Rak prostaty jest drugim po raku płuc najczęściej występujących nowotworów u mężczyzn. Stwierdza się ponad 16 tys. przypadków zachorowania w ciągu roku, a większość przypada na siódmą i ósmą dekadę życia mężczyzn. Jego przyczyny nadal nie są do końca poznane. Rak prostaty jak każdy nowotwór złośliwy prowadzi do powstania przerzutów i w tym przypadku są to przerzuty przede wszystkim do kości w mniejszym stopniu do wątroby i nerek.

Z uwagi na ważność tego problemu uważam że przedstawiona mi do recenzji praca stanowi cenny wkład w badaniach nad rakiem prostaty jak i opracowaniem czułych metod oznaczeń markerów służących do wczesnego wykrycia tego schorzenia.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska obejmuje 83 strony tekstu podzielonego na rozdziały: wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz piśmiennictwo liczące 126 stron. Autor zamieścił także na początku pracy wykaz skrótów używanych w tekście rozprawy.

Wstęp zawiera trzy podrozdziały i wprowadza w tematykę badanych zagadnień. W początkowym podrozdziale Doktorant omówił produkty zaawansowanej glikacji białek (AGE), które są obecne w wielu nowotworach. Przedstawił proces ich powstawania i działania. Następnie omówił nowo odkryty produkt AGE10 o odmiennych właściwościach do pozostałych, sposoby uzyskania go w praktyce laboratoryjnej i mechanizmy działania. W drugim podrozdziale omówił udział produktów zaawansowanej glikacji białek i ich receptora (RAGE) w stanach patologicznych jak również wpływ antyoksydantów i związków przeciwzapalnych na procesy glikacji. Opisuje toksyczne działanie użytej w badaniach dioksyny oraz omawia antyoksydacyjne działanie kwasu acetylosalicylowego i tokoferolu, które hamują toksyczne działanie dioksyny. W ostatnim podrozdziale podaje budowę gruczołu krokowego i jego funkcje oraz opisuje najczęstsze schorzenia związane z tym narządem: łagodny przerost prostaty, zapalenie prostaty i nowotwór prostaty. Doktorant szczególnie skupił się na raku prostaty podając jego objawy oraz dokładnie opisując badania przesiewowe, biopsję pod kontrolą ultrasonografii przezodbytnicznej i metody leczenia. Trzeci podrozdział kończy

opis raka prostaty u psów, będących jedynym gatunkiem ssaków u których rozwija się ten rodzaj nowotworu. Ponadto wstęp zawiera 7 rycin, co wzbogaca jego wartość.

Produkty zaawansowanej glikacji odgrywają znaczącą rolę w patofizjologii chorób człowieka a ich zwiększone miano jest obecne w cukrzycy oraz w wielu chorobach o podłożu zapalnym i nowotworach. Poprzez interakcję z receptorem dla produktów zaawansowanej glikacji wywołują one negatywny wpływ na funkcjonowanie organizmu, Wywołany przez AGE wzmożony stres oksydacyjny, zmiany konformacyjne białek i indukcja cytokin prozapalnych przyczyniają się do angiopatii obserwowanej w cukrzycy, jak również powodują proliferację, naciekanie i tworzenie się przerzutów w chorobach nowotworowych. W diagnostyce raka prostaty w badaniach przesiewowych stosuje się pomiar stężenia specyficznego antygenu prostaty (PSA) jednakże badanie to charakteryzuje się małą specyficnością względem raka gruczołu krokowego. Ponadto stężenie PSA rośnie w często występującym łagodnym przerzucie prostaty i zapaleniu gruczołu krokowego. Badanie to ma niewielki wpływ na śmiertelność u mężczyzn, dlatego też poszukuje się nowych metod wczesnej diagnostyki.

Celem badania była immunohistochemiczna analiza obecności AGE10 w nowotworze prostaty. Niedawno odkryty produkt glikacji, AGE10, wyróżnia się od pozostałych klasycznych AGE. Jego syntetyczny analog tworzy się w warunkach bezwodnych, manifestuje właściwości proapoptotyczne, genotoksyczne i immunogenne. Rola AGE10 w nowotworach i uszkodzeniu tkanek nie została dotychczas zbadana. Ostatnie doniesienia na temat AGE 10 sugerują, że swoiste dla tego epitopu przeciwciała anti-MAGE można wykorzystać do detekcji markera uszkodzenia tkanek i diagnostyki chorób nowotworowych. Badanie tego przeciwciała zostało również ujęte w pracy. Do badań wykorzystano preparaty raka prostaty pochodzenia ludzkiego i psiego. Dodatkowo celem pracy była analiza immunohistochemiczna preparatów tkanki kostnej szczurów pochodzących od matek eksponowanych na 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksynę (TCDD) jak również wpływ tokoferolu i kwasu acetylosalicylowego na ekspresję nowego epitopu.

W przedstawionej rozprawie sformułowano trzy główne cele dotyczące immunohistochemicznej identyfikacji obecności:

- AGE10 w tkankach nowotworu prostaty u człowieka i psa,
- RAGE w tkankach prostaty u człowieka i próba określenia korelacji względem AGE10,
- AGE10 w tkankach szczura poddanych działaniu związków cytotoksycznych.

Rozdział „Materiały i metody” nie budzi żadnych zastrzeżeń, został przedstawiony w przejrzysty i staranny sposób. Uzyskano zgodę lokalnej komisji etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach (pozwolenie nr 11/2009/0027; 38/2009).

Przedłożony w rozprawie eksperyment został poprawnie zaplanowany. Badania obejmowały samice szczurów linii Buffalo (w wieku od 9 do 11 tygodni, o masie w przedziale 130 do 150g) które zostały losowo podzielone na czterech grupy, każda składająca się z 6 samic:

1. Grupa kontrolna, bez ekspozycji na substancje chemiczne,
2. Grupa poddana działaniu 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksyny w pojedynczej dawce 5µg/kg masy ciała, i.m.,
3. Grupa poddana działaniu 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksyny w pojedynczej dawce 5µg/kg masy ciała, i.m. i octanu alfa-tokoferolu w dawce 30 mg/kg masy ciała na dobę, s.c., przez okres 3 tygodni,
4. Grupa poddana działaniu 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksyny w pojedynczej dawce 5µg/kg masy ciała, i.m. i kwasu acetylosalicylowego w dawce 50mg/kg masy ciała na dobę, przez okres 3 tygodni.

Po okresie 3 tygodni, samice szczurów zostały sparowane z losowo dobranymi samcami z tej samej linii, nie poddanymi działaniu substancji chemicznych. Po tygodniu ciężarne samice szczurów odseparowano do osobnych klatek. Po około 21 dniach ciąży, samice zaczęły rodzić potomstwo które zostało podzielone na 4 grupy po 24 młodych każda:

1. Potomstwo grupy kontrolnej (NK),
2. Potomstwo grupy poddanej działaniu 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksyny (NTCDD),
3. Potomstwo grupy poddanej działaniu 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksyny i tokoferolu (NTCDD + E),
4. Potomstwo grupy poddanej działaniu 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksyny i kwasu acetylosalicylowego (NTCDD + ASA);

By uniknąć wpływu dioksyn obecnych w mleku matek, drugiego dnia życia szczury zostały poddane eutanazji poprzez podanie dootrzewnowo tiopentalu w dawce 120 mg/kg masy ciała. Do dalszych badań, pobrano tkanki rozwijających się zębów.

Uzyskane wyniki Doktorant opracował statystycznie używając programu STATISTICA 13.3. Wyniki badań przedstawione w sposób bardzo szczegółowy na 28 stronach zostały dodatkowo zobrazowane w postaci trzech tabel i trzynastu rycin.

Dyskusja przeprowadzona została w sposób bardzo dojrzały i świadczy o dużej wiedzy Doktoranta i umiejętności analizy. Autor wnikliwie przedyskutował wyniki swoich badań

w odniesieniu do badań innych autorów. W przeprowadzonych badaniach sprawdzono obecność nowego epitopu w biopatach nowotworu prostaty pochodzenia ludzkiego i psiego. Preparaty zostały również zbadane pod kątem reaktywności względem przeciwciał anti-RAGE. Silna reaktywność przeciwciał anti-MAGE w zakresie cytoplazmy komórek walcowatych tkanki gruczołowej prostaty, przy jednoczesnym braku reakcji w zakresie tkanki mięśniowej gładkiej i tkanki łącznej podścieliska wskazuje na wewnątrzkomórkowe tworzenia się AGE10 w komórkach gruczołowych. W badaniach stwierdzono również wzrost ekspresji RAGE wraz ze stopniem zaawansowania raka prostaty.

W przeprowadzonym doświadczeniu zbadano także ekspresję AGE10 w preparatach tkanki kostnej zębów szczurów pochodzących od matek poddanych działaniu TCDD jak również wpływ  $\alpha$ - tokoferolu i kwasu acetylosalicylowego na ekspresję nowego epitopu. Stwierdzone zmiany w postaci niedojrzałych ameloblastów, nacieków leukocytnych oraz słabo zarysowanej angiogenezy wskazują na zaburzenia rozwoju tkanki kostnej zębów u młodych z grupy poddanej działaniu TCDD i to już przy bardzo małych ilościach dioksyn podanych matkom.

W grupie kontrolnej obserwowano fizjologiczny rozwój zęba. Tkanka kostna wyrostka zębodołowego, zębiny i szkliwa była prawidłowo zróżnicowana i nie stwierdzono w niej procesu glikacji. Natomiast w tkance kostnej zęba noworodków pochodzących od grupy samic poddanych działaniu samej dioksyny (NTCDD) stwierdzono bardzo silne zmiany a rozwój szkliwa i brodawek zębowych był wyraźnie zaburzony. Zaobserwowano także nasilony proces zewnątrzkomórkowej glikacji.

Zastosowany w badaniu związek przeciwzapalny w postaci kwasu acetylosalicylowego wpływał hamująco na proces glikacji oraz gromadzenie się AGE10. Natomiast użyty związek antyoksydacyjny w postaci tokoferolu w znacznie mniejszym stopniu znosił szkodliwe działanie dioksyn w porównaniu z kwasem acetylosalicylowym. Można więc przypuszczać, że proces gromadzenia się w tkankach AGE10 w wyniku działania dioksyn jest modulowany przez inhibitory anti-Cox-2.

Na podstawie otrzymanych w badaniu wyników Doktorant sformułował 6 wniosków:

1. Epitop AGE10 jest obecny w zmienionych nowotworowo tkankach gruczołu krokowego,
2. Ekspresja AGE10 nie jest związana ze stopniem zaawansowania nowotworu prostaty,
3. Ekspresja RAGE jest związana ze stopniem zaawansowania nowotworu prostaty,
4. Toksyczne działanie dioksyn wzmaga tworzenie się AGE10 w tkance kostnej zęba i

żuchwy szczurów, co wskazuje, że jest on markerem uszkodzenia tkanki na tle toksycznym,

5. Kwas acetylosalicylowy i  $\alpha$ -tokoferol moduluje w kierunku obniżania powstawania AGE10 w tkance kostnej szczurów uszkodzonej dioksynami.
6. Ekspresja epitopu AGE10 nie charakteryzuje nowotworu tkanek gruczołowych prostaty u psów.

Reasumując, podwyższony poziom AGE10 w tkankach nowotworu prostaty może posłużyć jako nowy marker raka gruczołu krokowego a jego obecność w uszkodzonych dioksynami tkankach żuchwy szczurów sugeruje, że jest on również markerem uszkodzenia tkanki na tle toksycznym. Jednocześnie Doktorant sugeruje potrzebę dalszych badań z uwzględnieniem weryfikacji obecności AGE10 w osoczu pacjentów z rakiem gruczołu krokowego. Proponuje również zwiększenie liczby badanych prób o różnym stopniu zaawansowania procesu nowotworowego co może pozwolić na zbadanie w którym etapie transformacji nowotworowej następuje akumulacja AGE10 i czy ekspresja tego epitopu antygenowego może być wczesnym markerem nowotworu prostaty u ludzi.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny dysertacja Otto Krawiec pt.: "Badania produktów zawansowanej glikacji jako biochemicznego markera nowotworu prostaty i uszkodzenia tkanki kostnej" zawiera oryginalną i nowatorską koncepcję naukowo-badawczą. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.187 ust. 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. 2018 poz.1668). W związku z tym mam zaszczyt zwrócić się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu z wnioskiem o dopuszczenie lek. Otto Krawiec do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ewa Birkner