

**WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH****ZAKŁAD MIKROBIOLOGII**

ul. S. Przybyszewskiego 63
51-148 Wrocław
tel. +48 71 375 63 23
zmik@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu BIURO RADY DYSCIPLINY NAUKI MEDYCZNE	
wpl. dnia	16 -04- 2024
L. dz. RN-BM/	630/2024

Prof. dr hab. Gabriela Bugla-Płoskońska
Zakład Mikrobiologii
Wydział Nauk Biologicznych
Uniwersytet Wrocławski

14.04.2024

Recenzja rozprawy doktorskiej

pt. **„Badania produktów zaawansowanej glikacji jako biochemicznego markera nowotworu prostaty i uszkodzenia tkanki kostnej”**

Lek. Otto Krawiec

Rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Biochemii i Immunochemii
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Promotor: prof. dr hab. Andrzej Gamian

Promotor: prof. dr hab. Anna Chełmońska – Soyta

Tematyka przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej dotyczy zagadnień zaawansowanej glikacji w odniesieniu do procesów patofizjologicznych u człowieka oraz zwierząt. Tematykę tę uznać należy za bardzo aktualną i ważną dla współczesnej diagnostyki medycznej. Analizując publikacje i prace innych zespołów badawczych możemy zauważyć ogromny wzrost zainteresowania tą tematyką badawczą w ostatnich latach. W oparciu o dostępne dane, można zatem stwierdzić, iż praca doktorska Pana lek. Otto Krawiec wpisuje się w aktualne, istotne, światowe trendy badawcze. Dodatkowo uważam, iż badania związane z poszukiwaniem nowych biomarkerów chorób mają wartość praktyczną i dają szansę na opracowywanie nowych testów oraz dają nadzieję na przyszłe zastosowania w diagnostyce, zarówno biomarkerów związanych z ekspozycją, biomarkerów skutków czy biomarkerów wrażliwości na substancje.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma układ typowy dla prac eksperymentalnych. W pracy doktorskiej Autor wyróżnił takie rozdziały jak: *Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusję, Wnioski, Streszczenie, Abstrakt oraz Piśmiennictwo*. Z formalnego punktu widzenia należy zauważyć, iż praca posiada wykaz skrótów, ale bez odniesień do języka angielskiego, brakuje także spisu tabel i rycin. Piśmiennictwo zawiera 126 pozycji literatury, prac anglojęzycznych. Literatura jest aktualna, a kilkanaście prac pochodzi z okresu 2020-2023.

Celem badań podjętych w rozprawie doktorskiej była identyfikacja immunohistochemiczna nowego epitopu AGE10 w tkankach nowotworu prostaty u człowieka i psa, w odniesieniu do obecności receptorów dla zaawansowanych produktów



ZAKŁAD MIKROBIOLOGII

ul. S. Przybyszewskiego 63
51-148 Wrocław
tel. +48 71 375 63 23
zmik@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

glikacji oraz immunohistochemiczna identyfikacja obecności produktu zaawansowanej glikacji AGE10 w tkankach szczura poddanych działaniu związków cytotoksycznych.

We *Wstępie* do pracy doktorskiej lek. Otto Krawiec, przedstawia informacje o produktach zaawansowanej glikacji, w tym o nowo odkrytym AGE10, rozpoznawanym przez przeciwciała anty-MAGE. We wstępie teoretycznym do pracy doktorskiej przedstawiono także charakterystykę receptora dla produktów zaawansowanej glikacji (RAGE). To zagadnienie Autor omawia w odniesieniu do stanów patologicznych, takich jak nowotwór prostaty. W tej części pracy Doktorant podejmuje także temat uszkodzania tkanek przez dioksyny oraz wpływu antyoksydantów i związków przeciwzapalnych na procesy glikacji. Kolejnym omawianym zagadnieniem jest przedstawienie budowy gruczołu krokowego oraz omówienie zjawiska łagodnego przerostu prostaty, zapalenia prostaty i raka prostaty. Osobnym omówionym zagadnieniem jest charakterystyka raka prostaty u psów. Oceniając część teoretyczną rozprawy doktorskiej wyróżnić należy: ciekawe przedstawienie tematyki w oparciu o dane zebrane na podstawie prac innych autorów, sprawne wprowadzenie w eksperymentalną część pracy oraz ciekawe i czytelne schematy. Uwagi i pytania do tej części pracy:

- We *Wstępie* pracy doktorskiej zabrakło rozdziału poświęconego współczesnej definicji biomarkera (markera) oraz uzasadnienia istotności prowadzenia badań w tej tematyce zarówno w odniesieniu do badań w obszarze medycyny, jak i mikrobiologii czy biochemii. Bardzo proszę o uzupełnienie tego wątku podczas obrony pracy doktorskiej.
- Poproszę także o ocenę w jakim zakresie badany w pracy doktorskiej marker spełnia lub może spełniać w przyszłości warunki jakie stawia się dla idealnych biomarkerów, tj. m.in. powtarzalność wyników w różnych laboratoriach, szybkość detekcji, łatwość wykrywania, ilość potrzebnej próbki.
- We *Wstępie* Autor zaznacza, iż AGE10 to : " nowo odkryty przedstawiciel produktów zaawansowanej glikacji", jednak nie są podane źródła, daty czy nazwiska jego odkrywców.
- Biorąc pod uwagę zakres prowadzonych w ramach pracy doktorskiej badań oraz aktualne dane literaturowe, Doktorant nie przedstawił kontekstu swoich badań w odniesieniu do zjawiska mimikry molekularnej, proszę zatem o uzupełnienie tego zagadnienia podczas obrony pracy doktorskiej.
- na 22 stronie dysertacji Autor pisze, cytując: "Otyłość w połączeniu z niską aktywnością fizyczną wywołuje insulinooporność, a związane z nią przewlekłe podwyższone stężenie insuliny promuje wzrost i proliferację komórek



ZAKŁAD MIKROBIOLOGII

ul. S. Przybyszewskiego 63

51-148 Wrocław

tel. +48 71 375 63 23

zmik@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

nowotworowych". Poproszę o powiązanie tego fragmentu pracy z tematyką rozprawy doktorskiej, uwzględniając mechanizmy leżące u podstaw tego zjawiska.

W zakresie zastosowanej metodyki badawczej Doktorant przeprowadził oczyszczanie przeciwciał anti-MAGE metodą chromatografii powinowactwa, dokonał oznaczenia stężenia białek metodą Bradforda, zastosował metodę ang. *dot-blotting*. W kolejnym etapie badań wykonano immunohistochemiczną ocenę markerów raka prostaty. Ten etap eksperymentów opiera się na immunohistochemicznej analizie: AGE10, RAGE, P63, O37. W kolejnej części pracy Autor wykonał immunohistochemiczną analizę tkanki zębowej noworodków szczura od matek poddanych działaniu dioksyn. Dla swoich badań Doktorant wykonał analizę statystyczną z użyciem pakietu STATISTICA.

Uwagi i pytania do tej części pracy:

- Metody powinny być bardziej szczegółowo przedstawione, momentami mają formę opisu bez jakże ważnych dla powtórzenia eksperymentu szczegółów.
- Autor często nie podaje odniesień literaturowych metod zastosowanych w pracy.
- Jak otrzymuje się surowicę anti-O37 i dlaczego akurat taką zastosowano do testów?
- Dlaczego w prowadzonych badaniach istotny był antygen zawierający kwas sjałowy?
- Proszę o przedstawienie etapów barwienia immunohistochemicznego tkanki zębowej noworodka szczura, zastosowanego w pracy - opisu tej metody nie odnajduję w pracy.

Analizę histochemiczną preparatów pochodzących z raka prostaty wykonano w Zespole prof. Piotra Ziółkowskiego, w Zakładzie Patomorfologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. W zaprezentowanych w rozprawie wynikach, Autor stwierdza, iż epitop AGE10 był obecny w zmienionych nowotworowo tkankach gruczołu krokowego (potwierdzono jego obecność w 86% badanych preparatów), a jego obecność nie była związana ze stopniem zaawansowania nowotworu. Natomiast obecność receptora RAGE dla produktów zaawansowanej glikacji była powiązana ze stopniem zaawansowania nowotworu. Autor tłumaczy ten wynik wskazując, iż jest to receptor rozpoznający oprócz produktów zaawansowanej glikacji także inne białka, co może potwierdzać otrzymane wyniki.

Na potwierdzenie przeprowadzonych eksperymentów Autor rozprawy przedstawił ryciny ukazujące m.in. tkankę raka prostaty, na których przeciwciała anti-MAGE rozpoznają epitop AGE10, a także ryciny prawidłowej tkanki stercza. W swoich badaniach Doktorant badał także preparaty pochodzące z tkanki raka prostaty pobranej od psów. Ten wątek pracy jest interesujący i wskazuje na potencjalną użyteczność otrzymanych wyników także dla weterynarii. Także wyniki immunohistochemicznej analizy tkanki zębowej noworodków szczura od matek poddanych działaniu dioksyn są interesujące i wskazują, iż



ZAKŁAD MIKROBIOLOGII

ul. S. Przybyszewskiego 63
51-148 Wrocław
tel. +48 71 375 63 23
zmik@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

marker AGE10 można traktować jako marker uszkodzenia tkanek mających źródło w toksycznym działaniu związków, tutaj: dioksyn.

Dokumentacja fotograficzna analiz mikroskopowych w postaci rycin jest wartościowym elementem pracy, jednak w opinii Recenzentki, większa liczba zdjęć, umieszczona np. w aneksie pracy doktorskiej jeszcze bardziej wzbogaciłaby prezentację ciekawych wyników.

Pytania i uwagi to rozdziału *Wyniki*:

- Autor rozprawy stwierdza, iż obecność/ekspresja AGE10 nie jest charakterystyczna dla nowotworu tkanek gruczołowych prostaty u psów, czy to stwierdzenie nie jest zbyt rygorystyczne, biorąc pod uwagę fakt przebadania przez Doktoranta tylko 8 preparatów?
- Dlaczego w celu porównania wyników reaktywności przeciwciał rozpoznających AGE10 z reaktywnością przeciwciał rutynowo stosowanych w diagnostyce raka prostaty barwienie wykonano dla 7 preparatów? Jaki wniosek wyciągnięto z tej analizy porównawczej?
- Biorąc pod uwagę zastosowane w testach przeciwciała anty - O37, proszę o omówienie jaką wartość diagnostyczną mogą one posiadać.

Autor umieścił w pracy 6 wniosków, które napisane zostały precyzyjnie.

Dyskusja poprowadzona jest zwięźle i ciekawie. Autor przedstawia w niej aktualny stan wiedzy dotyczący badań nad rozpoznaniem raka prostaty, wskazując na udział w nim produktów zaawansowanej glikacji, zakładając także, iż AGE10 może być uznany za wczesny marker raka prostaty. Autor stawia ciekawe hipotezy, wskazując na potrzebę dalszych badań.

Rozprawę doktorską oceniam pozytywnie. Podjęta w pracy doktorskiej tematyka jest bardzo aktualna. Autor rozprawy, Lek. Otto Krawiec, postawił sobie ważne naukowo cele, które zostały zrealizowane. Przeprowadził szereg eksperymentów i obserwacji na podstawie których sformułował istotne wnioski mogące być podstawą do prowadzenia dalszych badań i zastosowań diagnostycznych. Stwierdzam zatem, iż rozprawa doktorska pt. „Badania produktów zaawansowanej glikacji jako biochemicznego markera nowotworu prostaty i uszkodzenia tkanki kostnej”, lek. Otto Krawiec 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).

Zakład Mikrobiologii
KIEROWNIK
Gabriela Bugła-Płoskońska
prof. dr hab. Gabriela Bugła-Płoskońska

