

dr hab. med. Wojciech Fendler Prof. UM  
Zakład Biostatystyki i Medycyny Translacyjnej  
I Katedra Pediatrii UM w Łodzi  
Ul. Mazowiecka 15, 92-215 Łódź

### Ocena

Rozprawy doktorskiej mgr Marcina Woźniaka p.t.  
„Opracowanie multimodalnej sondy molekularnej do obrazowania receptora końcowych produktów zaawansowanej glikacji (RAGE)”

Błyskawiczny postęp technik biologii molekularnej znacząco zwiększył dostępne biologom i lekarzom możliwości wglądu w strukturę i funkcję organizmów żywych na poziomie komórkowym lub subkomórkowym. Wizualizacja *in vivo* białek ważnych dla życia komórek jest kluczową, jeśli nie najważniejszą ścieżką pozwalającą na dogłębne poznanie znaczenia i niuansów funkcjonowania złożonych systemów biologicznych.

Stworzenie nowatorskiej sondy molekularnej umożliwiającej uzyskanie informacji o ilości i lokalizacji RAGE jest głównym celem przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej. Cel był ambitnym i w moim odczuciu, mgr Marcin Woźniak sprostał mu znakomicie.

Szczegółowe cele pracy zdefiniowano w sposób poprawny, typowy dla tego typu projektów. Obejmowały one opracowanie multimodalnej sondy do obrazowania receptorów końcowych produktów zaawansowanej glikacji oraz następczą weryfikację wiązania tejże sondy w modelu *in vitro* i *in vivo*. Należy podkreślić, że powyższe cele pracy są bardzo wartościowe, o istotnym elemencie poznawczym a wieloetapowość i kompleksowość działań badawczych podjętych aby zrealizować każdy z nich zasługuje na uznanie.

Oceniana praca ma typowy dla rozpraw doktorskich układ: konkretne wprowadzenie, jasno wyartykułowane cele szczegółowe pracy, dokładny opis metodyki badawczej, omówienie wyników oraz ich bardzo wnikliwą dyskusję.

Główny tekst pracy doktorskiej liczy 93 strony maszynopisu. Głównym wątkiem wstępu jest obrazowanie molekularne, czyli możliwość uwidocznienia, najlepiej jeszcze za życia organizmu, lokalizacji interesującego Autora białka RAGE za pomocą „uszytych na miarę” ligandów sprzężonych z różnymi cząsteczkami kontrastującymi pozwalającymi na wizualizację ekspresji RAGE za pomocą różnych technik obrazowania. Ponadto, we wstępie Autor charakteryzuje dane na temat znaczenia biologicznego RAGE, jego ligandów, złożonej struktury i funkcji tego receptora oraz potencjalnych możliwości zastosowania wiedzy o jego ekspresji w praktyce. Przytaczane dane literaturowe zwięźle opisują postęp technik wizualizacji oraz charakteryzują główne nurty rozwoju tego obszaru biomedycyny,

podkreślając główne możliwości rozwoju i zastosowania nowych odkryć zaprezentowanych w niniejszym doktoracie. Jednocześnie, dokładny opis RAGE zarysowuje tło molekularne i biologiczne uzasadniające podjęcie trudu obrazowania tego właśnie receptora.

Wstęp, mimo swojej zwięzłości, w precyzyjny sposób identyfikuje możliwości oferowane przez obrazowanie molekularne i uzasadnia, dlaczego multimodalna sonda obrazująca RAGE może mieć duże znaczenie naukowe i praktyczne.

Taki sposób prezentacji świadczy o zrozumieniu złożonych zagadnień współczesnej biologii molekularnej i możliwości stosowania jej osiągnięć w praktyce klinicznej oraz o dojrzałości Doktoranta jako pracownika naukowego.

Metody zastosowane w pracy opisano ze szczegółami technicznymi na 26 stronach rozprawy, przy czym elementy metod, dla wygody czytelnika, są powtarzane w sekcji wyników co pozytywnie wpływa na zachowanie narracji naukowej i w sposób klarowny uzasadnia podejmowanie kolejnych eksperymentów. Wykorzystane techniki molekularne w znacznej mierze obejmują optymalizację przebiegu reakcji tworzenia sond opartych o dendrymery PAMAM. Zauważalny jest ogrom pracy włożony w optymalizację warunków reakcji służących realizacji powyższego celu oraz dbałość o szczegóły. Kolejne sekcje rozdziału materiały i metody opisują techniki służące weryfikacji specyficzności wiązania sondy do RAGE, mierzeniu ilości RAGE na poziomie mRNA i białka oraz metod lokalizacji kompleksu sonda-RAGE *in vitro* i *in vivo*. Podsumowując, rozdział ten obrazuje w sposób wyczerpujący całość skrupulatnie zaplanowanych i przeprowadzonych eksperymentów pozwalając, w moim odczuciu, na ich powtórzenie i weryfikację przez innych naukowców, co spełnia kryteria eksperymentalnej pracy naukowej.

Wyniki badań, przedstawione na 27-u stronach maszynopisu w bardzo przejrzysty sposób pokazują nakład pracy Doktoranta. Łącznie sekcje metod i wyników, ilustrowane za pomocą kilkudziesięciu czytelnych tabel i rycin w przejrzysty i logiczny sposób ilustrują plan i wykonanie badań zmierzających do realizacji zamierzonych celów pracy. Pierwsza sekcja opisuje charakterystykę wytworzonej sondy za pomocą spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego. Autor zwraca uwagę na trudności interpretacyjne wynikające ze złożoności badanego układu, jednak mimo to jest w stanie zinterpretować i w sposób przejrzysty omówić uzyskane wyniki. Kolejna sekcja opisuje badanie ekspresji RAGE w modelu *in vitro* w warunkach zmiennej glikemii i czasu inkubacji komórek linii HUVEC. Następnie Autor wykazuje specyficzność wiązania zaprojektowanej sondy poprzez ocenę fluorescencji i radioaktywności oraz podkreśla dobrą korelację wyników obydwu metod w warunkach euglikemii i hiperglikemii. Badania *in vitro* zamyka wizualizacja przy pomocy techniki

immunofluorescencji wiązania sondy z RAGE. Następnie Autor przechodzi do sekcji wyników modelu badań *in vivo*, w której opisuje retencję i biodystrybucję sondy i za pomocą techniki PET-CT uwidaczniając wiązanie do obszarów o wyindukowanej niedokrwieni nadekspresji RAGE. Normalizacja sygnału obserwowana po dwóch tygodniach od ligacji naczynia tętniczego współgra z przywróceniem perfuzji i normalizacją ekspresji RAGE po tym czasie, a korelacja między radioaktywnością mierzoną w niedotlenionej tkance a sygnałem mierzonym w PET potwierdza kliniczną użyteczność sondy. Następnie, pomiary ilości mRNA i białka RAGE oraz przeprowadzone badania immunofluorescencyjne potwierdzają, że zwiększone wiązanie sondy do niedotlenionych tkanek współgra ze zwiększeniem ekspresji RAGE, domykając część eksperymentalną wyników i w pełni wyczerpując trzeci cel pracy.

Dyskusja w sposób logiczny i ustrukturyzowany prowadzi czytelnika poprzez problemy techniczne i eksperymentalne z którymi zmagał się Autor pracy oraz inni badacze pracujący w obszarze obrazowania molekularnego oraz badaniach nad RAGE. Pomimo swojej zwięzłości, rozdział ten w sposób adekwatny omawia kontekst i możliwe implikacje praktyczne uzyskanych wyników. Niemniej jednak jako czytelnik i recenzent byłbym zainteresowany większą liczbą przykładów zastosowań np. komercjalizacji technik wizualizacji molekularnej niż tylko ta przytoczona przez Autora. Jednak ten subiektywny niedostatek nie umniejsza w żaden sposób wartości rozprawy.

Piśmiennictwo obejmuje 193 pozycje, w olbrzymiej większości opublikowane w ostatnich latach w czasopismach z Impact Factor, co świadczy o aktualności poruszanego tematu i dużym zainteresowaniu środowiska naukowego tym obszarem badań biomedycznych.

Część wyników rozprawy doktorskiej została opublikowana w prestiżowym czasopiśmie *Theranostics*, co zasługuje na szczególne uznanie oraz potwierdza wysoką naukową jakość wyników pracy Doktoranta.

Pracę wieńczą 4 syntetyczne, zwięzłe i logicznie wynikające z wyników pracy wnioski dobrze podsumowujące znaczenie i implikacje przedstawionych w pracy odkryć.

Ogółem pod względem merytorycznej zawartości, poprawności zaplanowania badań, ich przeprowadzenia, jak również pod względem ogólnej formy i organizacji treści pracy, rozprawę mgr Marcina Woźniaka oceniam bardzo wysoko.

Chociaż w całości rozprawa nie budzi wątpliwości w zakresie oryginalności tematyki badawczej, zastosowanej metodyki badań, czy interpretacji wyników tych badań, po jej lekturze nasunęło mi się kilka pytań, na które odpowiedzi nie byłem w stanie wydedukować

w oparciu o tekst pracy. Część z nich wynika z mojej własnej badawczej ciekawości i, jakkolwiek zapewne przekracza zakres wykonanych lub planowanych prac, być może stanie się przyczynkiem do ciekawej dyskusji lub kolejnych projektów:

- W jaki sposób Autor tłumaczy spadek ekspresji RAGE przy wyższych niż 14 mM stężeniach glukozy jakim poddawano komórki HUVEC? W oparciu o dotychczasowe dane literaturowe można by oczekiwać liniowego gradientu ekspresji, którego powyżej 14 mM nie obserwowano.
- Czy ekspresja RAGE w warunkach niedokrwienia różni się, kiedy dodatkowo mamy do czynienia z hiperglikemią? Sytuacja niedokrwienia u osób ze źle wyrównaną cukrzycą jest jednym z najczęściej obserwowanych ostrych powikłań w tej grupie chorych i scenariusz, w którym niedokrwienie pojawia się w warunkach przewlekłej hiperglikemii lub zaostrzenia tejże mógłby dodatkowo nasilać ekspresję RAGE. Czy Autor jest w stanie ekstrapolować swoje wyniki w tym kierunku i wyjaśnić czy indukowana niedokrwieniem i hiperglikemią nadekspresja RAGE byłaby addytywna czy synergistyczna oraz czy proponowana sonda posiada odpowiedni zakres dynamiczny by wykrywać znacząco wyższe niż indukowane samym niedokrwieniem zmiany RAGE?
- Rycina 27 przedstawia korelację pomiędzy obrazowaniem PET a pomiarami radioaktywności. Wprowadzenie do ryciny wspomina o tym, że pomiaru dokonano w obu kończynach, jednak na rycinie tego nie oznaczono. Czy Autor rozważał przedstawienie jak bardzo różnił się wychwyty sondy dla RAGE w niedokrwionej i zdrowej kończynie i skorelować to z ilościowym pomiarem perfuzji metodą Dopplera?
- Autor dość liberalnie podszedł do tematyki porównań statystycznych – podanie dokładnych poziomów istotności oraz wyszczególnienie, w którym przypadku użyto jakiego testu byłoby wskazane. Co więcej, analiza korelacji wykonana kilkakrotnie w przedstawionej do recenzji pracy, zwyczajowo poza współczynnikiem R podaje również wartość istotności statystycznej. Niemniej, ponieważ projekt w swojej istocie nie wymaga skomplikowanego modelowania statystycznego a efekty biologiczne są ewidentne, moja uwaga dotyczy formy raportowania wyników analiz statystycznych i nie podważa przedstawionych w pracy wyników.

Nieistotne merytorycznie uwagi edytorskie dotyczą:

- Dość licznych i powtarzających się błędów literowych (np. „specyficzności” zamiast „specyficzność” we wniosku 4 oraz „specyficznością” zamiast „specyficzność” w streszczeniu) oraz gramatycznych (np. powtórzenie receptor RAGE czyli receptor receptor for advanced glycation end products). Co dość zaskakujące, kilka literówek

zostało przeoczonych na poziomie tytułów podrozdziałów. Niewątpliwie świadczy to o przykładaniu przez Autora większej wagi do treści i jakości naukowej niż formy pracy, jednak wymaga to korekty na etapie publikacji wyników.

Przytoczone powyżej drobne uwagi, natury bardziej redakcyjnej niż merytorycznej, nie umniejszają w żadnym stopniu wartości merytorycznej rozprawy i mojej bardzo pozytywnej opinii o tej wyróżniającej się pracy Pana mgr Marcina Woźniaka.

W podsumowaniu stwierdzam, że ta bardzo wartościowa rozprawa jest świadectwem, iż Doktorant wykazał umiejętność samodzielnego rozwiązywania problemów naukowych i badawczych, wykazując potrzebną do tego wiedzę, jak i przygotowanie teoretyczne w zakresie zagadnień, których rozprawa dotyczy. Praca ta zawiera bez wątpienia wybitne elementy nowości naukowej, a przedstawione wyniki wskazują, że cele badawcze stawiane przez Doktoranta zostały zrealizowane nawet z nadwyżką. Praca stanowi dowód, iż Autor w kompetentny sposób zgromadził wyniki swoich obserwacji oraz w dojrzały sposób je zweryfikował.

Uwzględniając warsztat badawczy, wartości poznawcze i ogromne znaczenie praktyczne dociekań naukowych z dużą przyjemnością przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku wniosek o dopuszczenie mgr Marcina Woźniaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz publicznej obrony pracy doktorskiej.

Jednocześnie, ze względu na nowatorskie idee i koncepcje badawcze, leżące u źródeł ocenianej pracy autorstwa mgr Marcina Woźniaka wnioskuję o jej wyróżnienie.

Łódź, dnia 31 Grudnia 2018 roku

Kierownik Zakładu Biostatystyki  
i Medycyny Translacyjnej  
Dr. hab. n. med. Wojciech Fendler Prof.UM  
2326708  
tel.691 705-646

