



# UNIwersYTET MEDYcZNY

IM. PIAsTÓW ŚLĄSKICH WE WRoCŁAWIU

kierownik Katedry Morfologii i Embriologii Człowieka

Zakładu Histologii i Embriologii

prof. dr. hab. Piotr Dzięgiel

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Marcina Woźniaka

pt.: „*Opracowanie multimodalnej sondy molekularnej do obrazowania receptora końcowych produktów zaawansowanej glikacji (RAGE)*”

Choroby współczesnej cywilizacji w dobie XXI wieku stanowią obecnie największe zagrożenie dla populacji świata. Myśląc o tzw. chorobach cywilizacyjnych możemy wymienić te najważniejsze zarówno pod względem wskaźników zachorowalności jak również umieralności i są to m. in.: choroby układu krążenia, choroby nowotworowe, choroby neurodegeneracyjne, ale także choroby metaboliczne, jak np. cukrzyca. Można również powiedzieć, że mają one wspólne mianowniki, w tym istotny w aspekcie ocenianej rozprawy, tzn. przewlekły stan zapalny. Z kolei toczący się proces zapalny indukuje m. in. ekspresję receptora końcowych produktów zaawansowanej glikacji (RAGE). Ponadto, zdecydowana większość ligandów dla ww. receptora uwalniana jest przez komórki właśnie stanu zapalnego (monocyty, makrofagi, neutrofile). Co więcej, ligandy te nasilają ekspresję RAGE, co nasila eskalację procesów patologicznych zachodzących w poszczególnych komórkach i tkankach objętych procesem zapalnym. Należy pamiętać również o tym, że pobudzenie RAGE inicjuje generowanie sygnału, który poprzez odpowiednie szlaki białek (np. NF- $\kappa$ B, MAPK, ERK, JNK, TGF- $\beta$ ) wpływają na liczne procesy komórkowe związane z zaburzeniem ich funkcji. Wśród nich są tak kluczowe jak np.: związane z odpowiedzią immunologiczną, migracją oraz proliferacją komórek, a także zaangażowane w procesy apoptozy oraz autofagii.

Jak widać z przytoczonych na wstępie informacji (zawartych również w recenzowanej monografii), tematyka przeprowadzonych przez doktoranta badań, jest na wskroś nowoczesna i aktualna, szczególnie w świetle intensywnie obecnie badanych, molekularnych podstaw najważniejszych chorób XXI wieku. Nie można również zapominać, że dokonania doktoranta jednoznacznie mogą się przyczynić z jednej strony do wczesnej diagnostyki np. chorób układu krążenia czy chorób metabolicznych, jak również mogą pozwolić na wdrożenie

nowoczesnych terapii – tzw. terapii personalizowanych, w których precyzyjne „uderzenie” w przyczynę choroby środkiem zindywidualizowanym dla każdego pacjenta, spowoduje osiągnięcie pełnego sukcesu terapeutycznego. Zarówno, wczesna diagnostyka jak również leczenie przyczynowe, pozbawione tzw. „efektów ubocznych”, stanowi od zarania dziejów medycyny kluczowe dogmaty skutecznej terapii, nad którymi lekarze i naukowcy w dalszym ciągu próbują zapanować. W związku z powyższym, jeszcze raz podkreślam wagę i nowatorstwo tematyki badań jakich podjął się doktorant pod czujnym kierownictwem oraz nadzorem swojego promotora – Pana Profesora Leszka Kalinowskiego.

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska jest typowym opracowaniem monograficznym, ogólnie przyjętym w ubieganiu się o stopień doktora w szeroko pojętym zakresie nauk medycznych, składającym się z poszczególnych części (rozdziały, spis skrótów, spis literatury itp.). W końcowej części doktorant umieścił kopię publikacji (IF = 8,537), w której zawarte są wyniki uzyskane podczas badań w ramach studiów doktoranckich. W publikacji tej doktorant jest ,jednym z dwóch, pierwszym autorem.

Rozdział „Wstęp” jest napisany klarownym i zrozumiałym językiem i wprowadza czytelnika w tematykę zrealizowanych badań. Muszę przyznać, że nawet dla odbiorcy, który nie jest zaangażowany w obszar, którego dotyczy rozprawa doktorska, informacje w ww. rozdziale przedstawione są w sposób niezwykle przejrzysty, co pozwala na dalszą kontynuację lektury monografii. W zasadzie do tej części pracy mam tylko jedną nieznaczną uwagę. Na stronie 19, w Ryc. 2 oraz w jej podpisie widnieje określenie „alternatywny splicing”, które można zastąpić sformułowaniem „alternatywne składanie”.

Następstwem powyższego rozdziału są postawione przez doktoranta cele pracy. Są one sformułowane jednoznacznie i odzwierciedlają postawione przez doktoranta zadania do wykonania w ramach zaplanowanych badań.

Najobszerniejszym rozdziałem w recenzowanej pracy doktorskiej (czego można było się spodziewać) jest część pt.: „Materiały i Metody”. Muszę uczciwie przyznać, że nie jestem specjalistą z zakresu zaawansowanych metod chemicznych czy biochemicznych, ale informacje podane przez doktoranta, w mojej ocenie, są precyzyjne oraz, co najważniejsze w nauce, pozwalają na powtórzenie eksperymentów przez innych badaczy. Do tej części monografii mam kilka również „kosmetycznych” uwag. Na stronie 40, doktorant cytuje publikację A.M. Schmidt i wsp., w której stwierdzono związek występowania u pacjentów schorzeń tętnic obwodowych ze wzrostem ekspresji receptorów RAGE na powierzchni komórek. Rodzi się pytanie jakich komórek? Ta informacja mogłaby być zawarta w tekście pracy doktorskiej bez konieczności odsyłania czytelnika do źródłowej publikacji. Kolejne pytanie dotyczy braku typowej grupy kontrolnej myszy poddanych eksperymentowi, u których nie byłyby przeprowadzone procedury podwiązania tętnicy udowej. Rozumiem, że w zamyśle



taką „kontrolę” mogła stanowić kończyzna tylna tej samej myszy po przeciwnej stronie, w której nie wykonano ww. zabiegu? Z kolei w Tabeli 7 (str. 46) oraz Tabeli 9 (str. 49) przy charakterystyce użytych przeciwciał zarówno w metodzie Western Blot, jak również w reakcjach immunofluorescencyjnych, autor nie podał numeru katalogowego ani też miejsca (domeny), z którym wiążą się ww. przeciwciała w receptorze RAGE. Dodatkowa uwaga ogólna dotyczy nazewnictwa. Wszystkie metody bazujące na łączeniu się antygeny z przeciwciałem (jak ma to miejsce np. w metodzie immunohistochemicznej czy immunofluorescencyjnej) wykorzystują reakcję - wzajemne połączenie tych dwóch składowych. Nie jest to więc barwienie (np. histochemiczne) wykorzystujące powinowactwo zastosowanych barwników do określonych struktur komórkowych czy pozakomórkowych, lecz reakcja np. immunofluorescencyjna, gdzie specyficzne przeciwciało jest dodatkowo wyznakowane odpowiednim znacznikiem.

Kolejną częścią przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej jest rozdział „Wyniki”. Podobnie jak poprzednie części monografii jest zredagowany przystępnie, a załączona dokumentacja rezultatów badań w postaci barwnych rycin uwiarygadnia osiągnięte przez doktoranta wyniki. Również podczas czytania tego rozdziału nasunęło mi się kilka pytań oraz uwag. Na stronie 56 oraz 57, na rycinach 15 i 16, zarówno na poziomie ekspresji genu jak również białka, poziomy, odpowiednio AGER oraz RAGE są znacząco niższe po 24 godzinnej inkubacji z glukozą – z czego to wynika? Na stronie 64 (Rycina 24), autor opisuje, że zwiększoną retencją obydwu sond (MMIA-CML i MMIA-HSA) stwierdzono w: wątrobie, pęcherzyku żółciowym, nerkach oraz jelitach. Na Rycinie 24 z wykresu wynika, że to zjawisko występowało również w płucach (?).

Zwieńczeniem każdej pracy doktorskiej przedstawionej w postaci monografii jest „Dyskusja” oraz „Wnioski”. Tak też jest w ocenianej przeze mnie rozprawie. Doktorant w pierwszym z tych rozdziałów w syntetyczny sposób przypomina otrzymane rezultaty swoich badań i na bazie powyższych prowadzi zasadną dyskusję z autorami, którzy zajmują się bądź zajmowali się taką samą lub podobną tematyką. Krytycznie omawia swoje wyniki, nadmieniając jakie inklinacje kliniczne mogą mieć w przyszłości. Ta część pracy wg mojej oceny jest napisana bardzo dobrze i nie mam również tutaj większych zastrzeżeń. Wprawdzie na stronie 72 doktorant sugeruje, że np. w chorobach naczyń badanie histopatologiczne (analiza małych tętnic) może być obarczona błędem, z czym osobiście się nie zgadzam, oczywiście jeśli założymy, że wszystkie procedury przygotowania materiału jak i sama ocena zostały wykonane prawidłowo. Także na stronie 73, proponowałbym zmienić określenie „synteza przeciwciał monoklonalnych” , może na „wytwarzanie...”.

Rozdział „Wnioski” podsumowuje całokształt pracy wykonanej przez doktoranta oraz wskazuje najważniejsze jego osiągnięcia, które szczególnie w naukach medycznych, mogą

mieć zastosowanie w praktyce klinicznej. Wnioski 1, 2 i 4 w zasadzie są odpowiedzią na postawione we wstępie pracy cele. Z kolei wniosek 3 nawiązuje do możliwego w przyszłości zastosowania opracowanej sondy molekularnej. W ramach uwag, proponowałbym we wniosku 2 skrót <sup>1</sup>HNMR zastąpić pełną nazwą: protonowy jądrowy rezonans magnetyczny.

W podsumowaniu z całym przekonaniem stwierdzam, że zaprezentowana mi do oceny praca doktorska Pana mgr Marcina Woźniaka, obejmuje nowatorskie badania dotyczące opracowania unikalnych narzędzi – sonda molekularna, umożliwiających zarówno w modelu *in vitro* jak również *in vivo*, obrazowanie nie tylko typowo morfologiczne, ale co najważniejsze procesów, w tym patologicznych, zachodzących w żywych organizmach. Dobór metod badawczych, a także zaawansowane techniki eksperymentalne oraz uzyskane rezultaty zostały docenione w szerokim odbiorze naukowym w postaci publikacji w prestiżowym, znaczącym czasopiśmie. Wszystkie wymienione powyżej elementy mojej oceny składają się na bardzo wysoka notę jaką przyznaję recenzowanej pracy doktorskiej.

Mając na uwadze całokształt osiągnięć doktoranta, oryginalność, a także nowatorski charakter badań zawartych w przedstawionej do recenzji monografii stwierdzam, że spełnia ona warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku (z późniejszymi poprawkami), dotyczącej nadawania stopni naukowych i tytułu naukowego oraz stopni i tytułu w zakresie sztuki. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej o przeprowadzenie dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora nauk farmaceutycznych mgr Marcinowi Woźniakowi.

Jednocześnie wnoszę o wyróżnienie przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej.

Wrocław, 4.02.2019

Prof. dr hab. Piotr Dzięciel



Pieczętka jednostki organizacyjnej recenzenta

PIOTR DZIĘGIEL

Imię i nazwisko recenzenta

Prof. dr hab.

Tytuł/stopień naukowy/stanowisko recenzenta

Imię i nazwisko

doktoranta: mgr Marcin Hoźniak

Tytuł pracy doktorskiej:

Opracowanie multimodalnej sondy molekularnej do obrazowania receptora końcowych produktów zaawansowanej glikacji (RAGE)

#### WNIOSK O WYRÓŻNIENIE PRACY DOKTORSKIEJ

Niniejszy zwracam się z wnioskiem do Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie przedmiotowej rozprawy doktorskiej.

Uzasadnienie:

Recenzowana praca doktorska stanowi wartościwe podejście do tematu badań nad sondami molekularnymi. Opublikacja pracy z cyfrowym wskaźnikiem jakości IF = 8,5. Ze względu na perspektywę wpływu działalności com naukowe tematu, a także wpływ pracy na rozwój o. wybitnie wyjątkowej doktorskiej

Piotr Dzięciel

Wzrost. 4.02.2019