

Dr hab. Jose Luis Valverde Piedra, prof. nadzw. UP
Zakład Toksykologii i Ochrony Środowiska
Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin, 29 lipca 2016 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Żurek pt "Wpływ alfa-ketoglutaranu na osteogenezę w modelach osteoblastów *in vitro*" (The influence of alpha-ketoglutarate on osteogenesis in osteoblast models *in vitro*) wykonana pod kierunkiem pani dr hab. Barbary Zdzisińskiej i Promotora pomocniczego pani dr Magdaleny Mizerskiej-Kowalskiej w Zakładzie Wirusologii i Immunologii Instytutu Mikrobiologii i Biotechnologii Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej (UMCS) w Lublinie.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr **Aleksandry Żurek** została napisana w języku polskim i przedstawiona do recenzji w postaci wydruku komputerowego na 191 stron formatu A4. Układ dysertacji jest tradycyjny i zawiera spis treści, wykaz stosowanych skrótów, wstęp, cel pracy, materiały, metody, wyniki, omówienie i dyskusję, wnioski, streszczenie w języku angielskim, wykaz piśmiennictwa, spis rysunków i spis wykresów. Rozprawa zawiera 32 rysunki, 42 wykresy i 306 pozycji piśmiennictwa w większości anglojęzyczne z czego ponad połowa pochodzi z ostatnich 10 lat. Szata graficzna jest staranna i estetyczna. Praca jest napisana poprawnym językiem i zrozumiale.

Autorka w klarowny sposób wprowadziła czytelnika w tematykę badawczą we wstępie obejmującym 42 strony, który został podzielony na sześć podrozdziałów. We wprowadzeniu liczącym 2,5 strony Autorka zamieściła ogólny zarys charakteryzujący tkankę kostną jako bardzo aktywna metabolicznie tkankę, w której zachodzą nieustannie intensywne zrównoważone procesy resorpcji i odnowy warunkujące utrzymanie jej odpowiedniej masy i struktury w okresie całego życia. Podkreśliła fakt, że wraz ze starzeniem się organizmu oraz w wyniku różnych chorób równowaga metaboliczna kości ulega zaburzeniu, a procesy

resorpcji zaczynają dominować nad procesami odnowy, co prowadzi to do postępującej utraty masy kostnej i powstawania osteopenii i osteoporozy.

Jak słusznie zauważa autorka osteoporoza dotyka nie tylko kobiety po menopauzie ale zarówno kobiet i mężczyzn po 65 roku życia, zaś jej następstwem jest ryzyko występowania groźnych złamań, które są trudne w leczeniu i charakteryzują się długim czasem gojenia, co wprowadza dyskomfort życia osób dotkniętych tą jednostką chorobową.

Autorka podkreśla istniejące obecnie problemy w leczeniu osteoporozy wynikające z braku skutecznych i zarazem bezpiecznych preparatów leczniczych, które by miały na celu zahamowanie proces resorpcji i stymulację procesów odnowy tkanki kostnej. Autorka zainteresowała się alfa-ketoglutaranem (AKG) jako potencjalny związek do zastosowania w profilaktyce i leczeniu chorób metabolicznych tkanki kostnej. Wskazuje na właściwości tego związku jako naturalnie występujący w organizmie metabolit pośredni cyklu Krebsa, którego pleiotropowa aktywność została szeroko udokumentowana. Przytacza liczne funkcje przypisane AKG, a wśród nich uczestnictwo w metabolizmie białkowym, regulacja funkcji enzymów dioksygenaz AKG-zależnych, stymulacja biosyntezy kolagenu typu I, wpływ na wzrost, proliferację i różnicowanie różnych komórek organizmu, działanie antyoksydacyjne, immunomodulacyjne oraz przeciwnowotworowe.

Zainspirowana wynikami licznych badań *in vivo* innych autorów, które wykazały pozytywny wpływ doustnej suplementacji AKG na proces mineralizacji macierzy kostnej i sugerujących jego anaboliczne działanie na tę tkankę o nieznanym jeszcze sposobie działania, Autorka postanowiła dociec mechanizmów będących u podstaw tych zjawisk na poziomie komórkowym.

W kolejnych podrozdziałach Autorka przytacza szczegółowe informacje nt. budowy i funkcji tkanki kostnej, procesu osteogenezy, procesu przebudowy tkanki kostnej, powstawaniu i funkcji biologicznej AKG oraz zastosowania egzogennej AKG jako suplement. Rozległy zakres informacji zawarte w tym obszernym rozdziale pozwalają czytelnikowi wiązać w jedną całość skomplikowaną sieć zależności strukturalnych i czynnościowych będącymi podstawą do prawidłowego działania tkanki kostnej oraz obrazuje hipotetyczne punkty zaczepu działania wybranego przez Autorkę związku - „AKG”. Rozdział ten zawiera aktualne dane z światowej literatury biomedycznej, co świadczy o dużej wiedzy Doktorantki i umiejętności doboru materiału do opisanych zagadnień.

W rozdziale III „Cel pracy”, na podstawie danych literaturowych Autorka postawiła hipotezę badawczą, wynikającą z omówionego we wstępie stanu wiedzy w tej dziedzinie, że AKG może wybierać bezpośrednie działanie na osteoblasty jako komórki odpowiedzialne za proces kościotworzenia i jako cel założyła badanie wpływu AKG na aktywność osteogenną osteoblastów w warunkach *in vitro*. Do osiągnięcia zamierzonego celu zaplanowała sześciu zadań badawczych na trzech modelach osteoblastów przy użyciu hodowli linii prawidłowych komórek ludzkich (hFOB 1.19), hodowli linii prawidłowych komórek mysich (MC3T3-E1) i hodowli linii nowotworowych komórek ludzkich (Saos-2).

Rozdział IV. „Materiały,, został opisany przez Autorkę jako odrębny rozdział i zamieściła szczegółowy opis użytych materiałów obejmujący 11 stron zawierający aż 11 kategorii. Rozdział V. „Metody” również opracowany został jako odrębną część. Metody badań zostały bardzo obszernie opisane na 22 stronach i zabiera 10 procedur. Szczegółowe przedstawienie procedur metodycznych z łatwością pozwoli osobie biegłej w technikach biologii molekularnej i technik mikroskopowych bez trudu odtworzyć badania. Do analizy statystycznej istotności wyników stosowano jednoczynnikową analizę wariancji i testu Dunett’a.

Rozdział VI. „Wyniki” Autorka przedstawiła na 61 stron zabierających graficzne przedstawienie uzyskanych w badaniach wyników w 42 rycinach. Badając wpływ NaAKG na proliferację i żywotność osteoblastów w testach MTT i BrdU oraz LDH i NR Autorka stwierdziła, że stężenia od 2,5 do 10 mM i odpowiednio, od 2,5 do 25mM nie wpływają na badane cechy. Natomiast ekspozycje 96 i 24 godzinne w zakresie stężeń NaAKG 25 i odpowiednio, 50 do 200 mM istotnie hamowały proliferację i żywotność badanych linii osteoblastów. Wyniki te posłużyły Autorce do wytypowania odpowiednich stężeń roztworów NaAKG (5, 10, 25 mM) do określenia wpływu związku na różnicowanie osteoblastów. Autorka posługując się technikami qRT-PCR wykazała, że zastosowane stężenia NaAKG, powodowały istotny wzrost ekspresję genu ALPL, COL1A1, IBSP, SPP1 i BGLAP w badanych liniach komórkowych. Wykazała również, że NaAKG proporcjonalnie do zastosowanego stężenia istotnie zwiększał aktywność ALP i zawartość COL1, BSP1, OP i OCN w komórkach linii hFOB 1.19 i MC3T3-E1 oraz istotnie zmniejszał aktywność badanych markerów po różnym okresie (6, 9, 12 i 15 dniach) inkubacji w hodowli linii komórek Saos-2. Dodatkowo, zmiany ALP Autorka zobrazowała barwieniem komórek *in situ*

z wykorzystaniem substratu (BCIP-NBT) dla enzymu i przedstawiała odpowiednie mikrofotografie z mikroskopu świetlnego.

W kolejnym etapie badań Autorka określiła wpływ NaAKG na poziom mineralizacji macierzy kostnej, wytwarzanej przez osteoblasty podczas ich różnicowania. W celu oceny zmian w poziomie mineralizacji wykonała barwienia hodowli czerwienią alizarową i dokumentację mikro i makro zdjęciami preparatów, a następnie dokonała ekstrakcję związanego barwnika z hodowli do oznaczenia gęstości optycznej alizaryny. W tej części badań Autorka uzyskała istotnie wyższy stopień mineralizacji macierzy kostnej wytworzonej przez osteoblasty linii hFOB1.19 i MC3T3-E1 oraz niższy stopień w linii Saos-2, które były zależne od stężenia NaAKG i czasu inkubacji.

Ze względu na fakt, że w badaniach różnicowania osteoblastów, we wszystkich używanych liniach komórkowych NaAKG zwiększał ekspresję genów kodujących wczesne i późne markery różnicowania oraz zwiększał wytwarzania tych markerów na poziomie białka za wyjątkiem komórek linii nowotworowej Saos-2, w których zmniejszał poziom mineralizacji tworzonej przez nie macierzy zewnątrzkomórkowej Autorka postanowiła sprawdzić czy taki efekt nie jest konsekwencją indukcji przez NaAKG procesu apoptozy bądź nekrozy w tej linii komórek. Istotnie, w tych badaniach Autorka wykazała istotny statystycznie wzrost ilości komórek apoptotycznych w hodowlach inkubowanych przez 72 godziny z NaAKG w stężeniu 10 i 25, który jednak nie był bliski poziomowi apoptozy indukowanej z 0,1 mM 5-fluorouracylem na tej samej linii komórek. Natomiast nekrozy nie stwierdziła. Zaintrygowana tym odkryciem postanawia pogłębić badania w zakresie hamowania migracji komórek nowotworowej za pomocą NaAKG jako wyzwalacza procesu apoptozy w komórkach neoplasmatycznych i przeprowadziła w tym celu test rysy i stwierdziła istotne zahamowanie migracji komórek osteosarcoma zależnie od stężenia. W dalszych rozważaniach Autorka postanowiła zbadać obecność receptora GPR80/99 w osteoblastach, którego AKG jest ligandem. Zbadała ekspresję genu OXGR1 i określiła obecność białka GPR80/99 w osteoblastach trzech linii komórkowych oraz modelowej linii komórek rak płuc A549. Stwierdziła ekspresję genu OXGR1 na podobnym poziomie co w linii A549. Jednakże, w badaniach western blotting wykazała, że poziom białka GPR80/99 w komórkach mysich linii MC3T3-E1 jest niższy od kontroli o 48%. Ponadto, Autorka postanowiła zbadać aktywację tegoż białka poprzez umożliwienie wiązanie z ligandem. W tym celu użyła NaAKG i AKG i stwierdziła wzrost poziomu aktywacji w zakresie stężeń od 0,01 do 10mM w modelowych komórkach A549 zaś, w linii hFOB 1.19 i Saos-2 aktywację receptora stwierdziła tylko przy wyższych stężeniach kwasu alfa-ketoglutazarowego

(1 i 10 mM) a linia MC3T3-E1 od stężenia 0,5 mM, natomiast NAAKG nie aktywował GPR80/99.

Należy podkreślić, że prezentowane w rozdziale „Wyniki” mikrofotografie i ryciny potwierdzają, że Autorka bardzo dobrze opanowała warsztat i swobodnie posługuje się wieloma nowoczesnymi technikami badawczymi.

W rozdziale Dyskusja, przeprowadzonej na 18 stronach, Autorka skonfrontowała swoje wyniki z wynikami uzyskanymi przez innych autorów i w jasny sposób wyeksponowała oryginalne wyniki, co dowodzi dobrego opanowania warsztatu pisarskiego i czytania, umiejętności kierowania logicznym wywodem i celnego dobierania argumentów z literatury. Na podstawie uzyskanych wyników Autorka sformułowała 8 wniosków końcowych podkreślających nowopoznane właściwości AKG w badaniach *in vitro* oraz postuluje przydatności AKG w profilaktyce i leczeniu chorób przebiegających z utratą tkanki kostnej takich jak osteopenia i osteoporoza. Ponadto, sugeruje możliwość stosowania AKG jako czynnik indukujący apoptozę oraz hamujący proliferację i migrację komórek osteosarkomy.

Otrzymane wyniki pozwoliły Autorce wykazać podłoże anabolicznego wpływ egzogenego AKG na tkankę kostną zaobserwowany w licznych badaniach *in vivo*, a także postulować, że może on być efektem bezpośredniej stymulacji osteogenezy przez ten związek. Bardzo ważnym elementem prowadzonych przez Autorkę badań jest opisanie po raz pierwszy występowanie receptora GPR80/99 w osteoblastach i wykazanie jego funkcjonalność. Odkrycia te stanowią podwaliny do dalszych badań nad rolą tego receptora w fizjologii i fizjopatologii osteoblastów.

Z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę na drobne uchybienia edytorskie zauważone przez mnie podczas czytania rozprawy, które powinny zostać poprawione przy oddaniu pracy do druku. Dotyczy to stosowanie przez Autorkę w całej pracy określenia „Rys.” i „Wykres” zamiast ryciny (ryc.). Według książki J. Weinera „Technika pisania i prezentowania przyrodniczych prac naukowych – przewodnik praktyczny” PWN, Warszawa 1998, ryciną (ryc.) można nazwać w pracy drukowanej wszystko poza tekstem i tabelami, a więc rysunek, wykres, schemat, ale także fotografię czy fragment zapisu (np. ekg, emg) przygotowany do publikacji. Natomiast rysunek określa to co jest narysowane, zarys lub kształt czegoś, a w sztukach plastycznych, przedstawianie bryłowości ciał oraz ich położenia w przestrzeni za pomocą linii.

Po mimo ogromnej staranności autorki w opisanu wyników i graficznym przedstawieniu zabrakło mi tabel w pracy. Zadaniem tabel jest przedstawienie wyników

w postaci liczbowej, najczęściej w postaci wierszy i kolumn wartości średnich i odchyłeń standardowych (SD) lub średnich błędów standardowych (SEM), z podaniem liczebności w grupach oraz istotności statystycznych. Tabela ma tę przewagę nad wykresem, że precyzyjnie podaje wyniki. Ponadto, pozwoliłoby to Autorce zmniejszyć objętość pracy.

Brak jest w tekście odnośników dla rys. 7, 15, 16, 17, 20, 21, 24, 24 i 26.

Wniosek końcowy

Po dokładnym zapoznaniu się z pracą doktorską mgr **Aleksandry Żurek** uważam, że Autorka pracy posiadała wymaganą znajomość warsztatu metodycznego, potrafi te umiejętności odpowiednio wykorzystać w pracy eksperymentatorskiej, a otrzymane wyniki logicznie zinterpretować. Praca dokumentuje w moim przekonaniu kilka ważnych odkryć biologicznych, a uwagi krytyczne dotyczą jedynie drobnych usterek redakcyjnych i nie umniejszają wysokiej wartości naukowej dysertacji. **Mając powyższe na uwadze pragnę stwierdzić, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Aleksandry Żurek „pt "Wpływ alfa-ketoglutaranu na osteogenezę w modelach osteoblastów *in vitro*" (The influence of alpha-ketoglutarate on osteogenesis in osteoblast models in vitro)" w pełni odpowiada warunkom określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003r. „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej (UMCS) w Lublinie wniosek o dopuszczenie mgr Aleksandry Żurek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Ponadto, mając na uwadze wysoki poziom merytoryczny oraz nowatorski charakter recenzowanej dysertacji wnoszę o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.



Dr hab. Jose Luis Valverde Piedra, prof. nadz. UP.