

**Katedra i Klinika Reumatologii
i Układowych Chorób Tkanki Łącznej
Uniwersytet Medyczny
Lublin 20-090**

ul. Jaczewskiego 8
tel. (081) 72-44790
fax. (081) 7244515
kierownik:
Prof. dr hab. Maria Majdan



**Department of Rheumatology
and Connective Tissue Diseases
Medical University
Poland, Lublin 20-090**

ul. Jaczewskiego 8
tel. (081) 7244790
fax. (081) 7244515
Head:
Maria Majdan M.D., Ph. D.

Prof. dr hab. n. med. Jolanta Parada-Turska

Katedra i Klinika Reumatologii
i Układowych Chorób Tkanki Łącznej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Al. Raławickie 1
20-059 Lublin

O C E N A

**rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Żurek
p.t. "Wpływ alfa-ketoglutaranu na osteogenezę w modelach osteoblastów
in vitro"**

wykonanej

**w Zakładzie Wirusologii i Immunologii Instytutu Mikrobiologii i Biotechnologii
Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
pod opieką dr hab. Barbary Zdzisińskiej**

Choroby metaboliczne kości, w tym szczególnie osteoporoza ze względu na wydłużenie średniej długości życia w populacji, stała się bardzo poważnym, wciąż narastającym problemem medycznym, społecznym i ekonomicznym. Jest to choroba bardzo częsta, szczególnie w grupie osób w wieku podeszłym. Szacuje się, że dotyczy ona co trzeciej kobiety w okresie pomenopauzalnym, a ryzyko wystąpienia

złamania kości w jej przebiegu u kobiet 50-letnich wynosi do końca życia około 40%, natomiast u mężczyzn około 13-22%. Z uwagi na powolny, podstępny, najczęściej bezobjawowy przebieg i bardzo duże rozpowszechnienie osteoporozy nazywana jest „cichym złodziejem kości” lub „cichą epidemią”.

Osteoporoza jest wynikiem przewagi niszczenia nad tworzeniem tkanki kostnej, co prowadzi do zmniejszenia masy kości beleczkowej i korowej bez zaburzenia ich mineralizacji.

Według obecnie obowiązującej definicji osteoporozy z 2001 r., opracowanej przez Narodowe Instytuty Zdrowia (NIH) i Narodową Fundację Osteoporozy (NOF) USA, postrzegamy ją dzisiaj jako chorobę szkieletu charakteryzującą się obniżeniem wytrzymałości kości, która prowadzi do zwiększenia ryzyka złamań. W definicji tej zwrócono uwagę, że istotą osteoporozy są złamania kości, występujące nawet po niewielkim urazie, czyli tzw. złamaniaiskoenergetyczne. Nie występują one u zdrowych ludzi po upadku z wysokości własnych bioder. Typowe złamania osteoporotyczne dotyczą trzonów kręgowych, dalszej części kości przedramienia i szyjki kości udowej. Osteoporoza i jej następstwa, czyli złamania kości często niosą za sobą bardzo poważne konsekwencje, ze zgonem chorego włącznie. Są ponadto przyczyną przewlekłego bólu, zaników mięśniowych, unieruchomienia, powstawania odleżyn i zatorowości płucnej. Osteoporoza może prowadzić do trwałej utraty sprawności fizycznej i samodzielności, czasem do trwałego inwalidztwa oraz znacznego pogorszenia jakości życia chorych. Poza konsekwencjami zdrowotnymi, złamania osteoporotyczne generują znaczne koszty opieki i leczenia. Dlatego bardzo ważne jest wczesne rozpoznanie tej choroby i jej prawidłowe leczenie.

Zasadniczym celem leczenia osteoporozy jest zapobieganie złamaniom kości oraz powikłaniom, które są ich następstwem. Cel ten można osiągnąć wpływając na podstawowe procesy zachodzące podczas przebudowy tkanki kostnej, tj. resorpcję i/lub tworzenie kości. Poza optymalną, zbilansowaną dietą z dostateczną podażą wapnia i witaminy D, stosowaniem preparatów wapnia i witaminy D (cholekacyferolu) lub jej analogów (alfakalcydol, kalcytriol), w leczeniu osteoporozy stosujemy leki przeciwosteoporotyczne, które poprawiają przede wszystkim jakość kości, zwiększając jej wytrzymałość mechaniczną.

Na przebudowę tkanki kostnej można wpływać stosując leki hamujące resorpcję lub stymulujące tworzenie tkanki kostnej. W Polsce są zarejestrowane i rekomendowane do leczenia osteoporozy leki antyresorpcyjne takie jak: bisfosfoniany, denosumab,

selektywne modulatory receptora estrogenowego (raloksyfen) i kalcytonina, ponadto parathormon, jako jedyny należący do leków pobudzających kościotworzenie oraz leki działające na oba te procesy (ranelinian strontu).

Mimo dostępności na rynku dość szerokiego wachlarza leków przeciwosteoporotycznych, lekarze niejednokrotnie stają przed trudnym wyborem najbardziej właściwego leku, który byłby skuteczny, a jednocześnie bezpieczny dla chorego. Jak wiadomo leczenie osteoporozy jest leczeniem przewlekłym, a długotrwałe stosowanie leków przeciwosteoporotycznych niesie ze sobą ryzyko wystąpienia różnych działań niepożądanych. W przypadku najczęściej stosowanej grupy bisfosfonianów zazwyczaj są to objawy nietolerancji ze strony przewodu pokarmowego lub dolegliwości bólowe dotyczące układu kostno-mięśniowo-stawowego, ale zdarzają się też nietypowe złamania podkrętarzowe oraz martwica żuchwy. Ponadto niektóre leki stosowane w leczeniu osteoporozy zwiększają ryzyko rozwoju chorób nowotworowych. Z tego powodu szeroko stosowana przed laty w leczeniu osteoporozy pomenopauzalnej u kobiet hormonalna terapia zastępcza obecnie nie jest zalecana zarówno w profilaktyce jak i leczeniu osteoporozy z uwagi na niekorzystne działania pozaszkieletowe (zwiększone ryzyko wystąpienia raka piersi i macicy). Również kalcytonina nie jest aktualnie stosowana w leczeniu osteoporozy, m.in. dlatego, iż wykazano istotny związek między długotrwałą terapią tym hormonem i zwiększonym ryzykiem zachorowania na nowotwory. Z kolei czas leczenia lekiem o działaniu anabolicznym na kości, terypartydem, który jest rekombinowanym parathormonem powinien być ograniczony do 18 miesięcy z uwagi na potencjalne ryzyko rozwoju nowotworu kości.

Alfa-ketoglutaran to substancja pochodzenia endogennego, która od lat jest przedmiotem zainteresowania wielu badaczy. Badania nad aktywnością biologiczną egzogenego alfa-ketoglutaranu toczą się na wielu płaszczyznach, m.in. dotyczą jego wpływu na metabolizm białkowy i syntezę białek tkanki mięśniowej w stanach wzmożonego katabolizmu, jego właściwości antyoksydacyjnych, immunomodulujących oraz jego potencjalnego działania przeciwnowotworowego. Uważa się, że alfa-ketoglutaran działa synergistycznie z lekami przeciwnowotworowymi, a jednocześnie, co bardzo istotne, chroni prawidłowe komórki organizmu, co może stanowić podstawę jego zastosowania jako substancji wspomagającej dotychczas stosowane metody leczenia nowotworów.

Temat podjęty przez Doktorantkę doskonale wpisuje się w obecny nurt poszukiwań nowych substancji i leków, które z jednej strony wywierałyby korzystny wpływ na metabolizm tkanki kostnej, a jednocześnie byłyby pozbawione niekorzystnych działań niepożądanych, w tym indukujących rozwój nowotworów.

W kontekście przedstawionych danych na temat możliwych działań pronowotworowych wywoływanych przez dostępne dzisiaj leki stosowane w leczeniu osteoporozy, wybór alfa-ketoglutaranu jako substancji badanej w przedstawionej pracy jest tym bardziej uzasadniony. Jak wskazują wcześniej przeprowadzone badania w warunkach *in vivo*, alfa-ketoglutaran wywiera nie tylko anaboliczny wpływ na tkankę kostną poprzez udział w procesach biosyntezy kolagenu i mineralizacji kości, ale działa również antyproliferacyjnie. W oparciu o powyższe fakty, podjęta przez Doktorantkę problematyka badawcza jest zagadnieniem niezwykle aktualnym i uzasadnionym, mającym zarówno walory poznawcze, jak i aspekty aplikacyjne, istotne z punktu widzenia praktyki lekarskiej.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma charakter eksperymentalny, a wszystkie badania zostały przeprowadzone w warunkach *in vitro*. Na uwagę zasługuje fakt, że badania wykonane w ramach przedstawionej rozprawy doktorskiej zostały sfinansowane z grantu badawczego Opus 6 Narodowego Centrum Nauki (Grant Nr 2013/11/B/NZ4/04557).

Dysertacja na stopień naukowy doktora napisana przez mgr Aleksandrę Żurek stanowi obszerne monograficzne opracowanie liczące 191 stron wydruku komputerowego, łącznie z piśmiennictwem, spisem rysunków i spisem wykresów. Układ pracy jest typowy, obejmuje łącznie 9 wyodrębnionych rozdziałów, kolejno: Wykaz używanych skrótów, Wstęp, Cel pracy, Materiał, Metody, Wyniki, Omówienie wyników i dyskusja, Wnioski, Summary (streszczenie w języku angielskim). Następnie Autorka zamieściła piśmiennictwo, spis rysunków i spis wykresów, które zostały wyodrębnione jako oddzielne części dysertacji. W pracy zawarto 42 wykresy i 32 rysunki, które stanowią dokumentację uzyskanych wyników badań.

Wykaz skrótów liczy 145 pozycji, ułożonych alfabetycznie. Skróty mają rozwinięcie w języku angielskim i są przetłumaczone na język polski.

Rozdział zatytułowany „Wstęp”, liczący 43 strony, został podzielony na 6 podrozdziałów. Kolejno Doktorantka zawarła w nim wprowadzenie, w którym zwięźle zasygnalizowała problem zaburzeń metabolizmu tkanki kostnej i zawarła informacje o substancji będącej przedmiotem badań w przedłożonej pracy doktorskiej, alfa-

ketoglutaranie, a następnie opisała budowę i funkcje tkanki kostnej, proces osteogenezy i przebudowy tkanki kostnej, kolejno dokładnie scharakteryzowała proces powstawania alfa-ketoglutaranu, jego biologiczne funkcje oraz zamieściła dane nt. alfa-ketoglutaranu jako egzogenego suplementu. W tej części pracy Doktorantka umieściła 6 rycin, które znacznie ułatwiają czytelnikowi zrozumienie opisywanych zagadnień. „Wstęp” jest obszernym i przejrzystym wprowadzeniem w problematykę zagadnień podejmowanych w rozprawie doktorskiej. Stanowi on zwartą, ciekawą pracę poglądową o wartości edukacyjnej. „Wstęp” stanowi bardzo dobre wprowadzenie do przedstawienia celu pracy.

W rozdziale „Cel pracy” Doktorantka uzasadniła wybór tematu badań, którym była ocena wpływu suplementacji alfa-ketoglutaranem na aktywność osteogenną osteoblastów *in vitro* i przedstawiła zadania badawcze służące weryfikacji postawionej hipotezy.

W następnych dwóch rozdziałach zatytułowanych „Materiały” i „Metody” Autorka przedstawiła szczegółową listę m.in. użytych odczynników, barwników, przeciwciał, badanych linii komórkowych oraz szczegółowo opisała zastosowane metody badawcze służące do realizacji projektu. Doktorantka oceniła wpływ różnych stężeń dwuwodnej soli disodowej alfa-ketoglutaranu (NaAKG) na proliferację (test MTT, test BrdU) i żywotność (test NR, test LDH) osteoblastów. Następnie po wybraniu nietoksycznych dla osteoblastów stężeń NaAKG dokonała oceny procesu różnicowania tych komórek, oznaczając wczesne i późne markery obrotu kostnego, będące wskaźnikami kościotworzenia, takie jak aktywność fosfatazy alkalicznej w osteoblastach metodą kolorymetryczną i barwienia *in situ*, poziom kolagenu typu I metodą Western blotting, poziom sialoproteiny kostnej, osteopontyny i osteokalcyny metodą ELISA. Określiła też wpływ NaAKG na ekspresję genów kodujących kolagen typu I (*COL1A1*), fosfatazę alkaliczną (*ALPL*), sialoproteinę kostną (*IBSP*), osteokalcynę (*BGLAP*) oraz osteopontynę (*SPP1*) w osteoblastach metodą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym z odwrotną transkrypcją (Real - Time qRT-PCR). Doktorantka zbadała ponadto wpływ wybranych stężeń NaAKG na proces mineralizacji macierzy kostnej, określając poziom wapnia metodą barwienia czerwienią alizarynową. Dokonała również oceny procesu apoptozy i nekrozy w komórkach ludzkiej linii nowotworowej kostniakomięsaka (Saos-2) oraz oznaczyła stopień migracji tych komórek metodą rysy pod wpływem różnych stężeń NaAKG. Następnie mgr Aleksandra Żurek przeprowadziła bardzo istotne z poznawczego punktu widzenia

badania dotyczące obecności receptora GPR80/99 w osteoblastach, dla którego ligandem jest alfa-ketoglutaran, zbadala ekspresję genu kodującego białko GPR80/99 (OXGR1) w tych komórkach oraz dokonała oceny aktywacji receptora GPR80/99 przez NaAKG i kwas alfa-ketoglutarowy za pomocą testu IP-one ELISA. Zastosowanie tych wielu metod badawczych było uzasadnione do osiągnięcia zaplanowanego celu.

Analiza statystyczna uzyskanych wyników badań została przeprowadzona przy pomocy prawidłowo dobranych testów statystycznych.

W rozdziale „Wyniki” liczącym łącznie 61 stron, zawierającym umieszczone w tekście 42 wykresy i 32 kolorowe rysunki, Autorka przedstawiła uzyskane wyniki badań i ich analizę statystyczną. Uzyskane wyniki dostarczają wielu wartościowych informacji, m.in. dotyczących hamującego wpływu NaAKG w określonych stężeniach na procesy proliferacji i żywotności prawidłowych preosteoblastów ludzkich i mysich, jak również komórek nowotworowych kostniakomięsaka ludzkiego. Za bardzo istotne uważam wykazanie przez Doktorantkę odmiennego wpływu NaAKG na markery różnicowania osteoblastów prawidłowych i komórek nowotworowych. Autorka na podstawie przeprowadzonych eksperymentów stwierdziła również odmienny wpływ NaAKG na proces mineralizacji macierzy kostnej wytwarzanej przez osteoblasty prawidłowe (wzrost mineralizacji) i komórki linii nowotworowej Saos-2 (wyraźne zmniejszenie poziomu mineralizacji), co przedstawiła na czytelnych, kolorowych rysunkach. Ważnym odkryciem dokonany przez Autorkę pracy było stwierdzenie, że badana substancja zależnie od zastosowanego stężenia indukuje proces apoptozy i nekrozy w komórkach nowotworowych kostniakomięsaka ludzkiego, a ponadto hamuje migrację tych komórek. W mojej opinii jako recenzenta przedstawionej pracy doktorskiej bardzo istotne z poznawczego punktu widzenia było wykrycie obecności receptora GPR80/99 we wszystkich trzech liniach badanych osteoblastów, jego zróżnicowanej ekspresji w tych komórkach, jak również zwiększonego poziomu jego aktywacji po zastosowaniu kwasu alfa-ketoglutarowego. Zaskakująca jest obserwacja zwiększonej aktywacji receptora GPR80/99 w komórkach wszystkich badanych linii pod wpływem kwasu alfa-ketoglutarowego, a braku działania NaAKG.

Uzyskane wyniki omówiono na 18 stronach. Rozdział „Omówienie wyników i dyskusja” Doktorantka rozpoczęła od opisu problemu osteoporozy i jej leczenia, następnie zawarła informacje o alfa-ketoglutaranie, stosowanych w pracy metodach

badawczych i celu pracy. Te informacje były już wcześniej przedstawione w rozdziałach „Wstęp”, „Cel pracy”, „Materiał” i „Metody”. Wydaje się, że czytelnik z łatwością może je odnaleźć w odpowiednich rozdziałach i powtarzanie tych informacji nie jest konieczne. Następnie Autorka przedstawiła wyniki badań własnych i omówiła je w oparciu o dane literaturowe. Wyniki uzyskanych badań mają duże znaczenie poznawcze.

Na zakończenie Doktorantka podała 8 wniosków, które sformułowała prawidłowo.

W rozprawie doktorskiej zawarte jest streszczenie w języku angielskim, natomiast nie ma streszczenia w języku polskim.

W pracy zacytowano 306 pozycji piśmiennictwa, które ułożono alfabetycznie. Użyte piśmiennictwo jest aktualne, zawiera około 90 pozycji pochodzących z lat 2010-2016. Są to publikacje w przeważającej części anglojęzyczne. Prace w języku polskim to 14 pozycji, których autorami są eksperci w zakresie chorób metabolicznych kości w Polsce.

Praca doktorska autorstwa mgr Aleksandry Żurek jest przygotowana bardzo starannie pod względem językowym i edytorskim. Doktorantka posługuje się dobrą polszczyzną, przez co czytanie pracy jest przyjemne. Przedstawiane problemy badawcze Autorka przedstawia w sposób merytoryczny i precyzyjny, a jednocześnie zrozumiałe i interesujące.

Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na:

1) niewłaściwe używanie przez Doktorantkę skrótów w tekście np. po pierwszym wprowadzeniu skrótu AKG (od alfa-ketoglutaran), Autorka w dalszych częściach tekstu używa pełnej nazwy alfa-ketoglutaran, lub pełnej nazwy i skrótu AKG w nawiasie. Ponadto na stronie 38. pracy Doktorantka napisała: „alfa-ketoglutaran (znany również jako kwas alfa-ketoglutarowy...)” i zgodnie z tym w „Wykazie skrótów” kwas alfa-ketoglutarowy i alfa-ketoglutaran objęła wspólnym skrótem AKG, który jest wielokrotnie stosowany w całej rozprawie. Wydaje się, że korzystniejsze byłoby bardziej szczegółowe podanie jaką sól kwasu alfa-ketoglutarowego stosowali autorzy poszczególnych cytowanych publikacji. Nie można też zgodzić się z postawieniem znaku równości między kwasem i jego solą, szczególnie pod względem chemicznym. Doktorantka używa w pracy skrótów, których nie wprowadziła w „Wykazie stosowanych skrótów” np. temp., min., kom., godz. Ponadto niekonsekwentnie w jednym miejscu stosuje pełne słowo np. temperatura, minuta, komórka, godzina, a w innym skróty od tych słów.

2) w celu uzyskania większej czytelności rycin sugerowałabym umieszczenie na nich podstawowych informacji tzn. skrótu nazwy badanej linii komórkowej (hFOB 1.19, MC3T3-E1, Saos-2) oraz okresu inkubacji (np. 6-ty, 9-ty, 12-ty, 15-ty dzień inkubacji). Obecnie te informacje znajdują się tylko w obszernym opisie zamieszczonym pod wykresami.

3) w rozdziale „Wyniki” znajdują się fragmenty poprzedzające opis uzyskanych wyników, które dotyczą materiałów i metodyki - str. 89, 91, 92, 107, 112, 117, 124, 143.

4) Autorka używa słowa „sialoproteina” (po literze „s” znajduje się litera „j”) – właściwa pisownia to sialoproteina (po literze „s” litera „i”).

Podsumowując, należy stwierdzić, że mgr Aleksandra Żurek zgromadziła obszerny, wartościowy materiał naukowy i przeprowadziła pracochłonne badania. W trakcie wykonywania pracy Doktorantka opanowała szereg wysokospecjalistycznych procedur badawczych i nabyła umiejętności dokonywania analizy wyników. Ze swych zadań wywiązała się bardzo dobrze, co świadczy, że jest przygotowana do prowadzenia badań naukowych. Założone cele zostały zrealizowane, a uzyskane wyniki są oryginalne i bardzo aktualne. Wyniki własne zostały przedstawione w świetle aktualnych danych z piśmiennictwa naukowego. Publikacje zostały prawidłowo dobrane, a zawarte w nich dane właściwie zinterpretowane. Rozprawę doktorską, mimo kilku krytycznych uwag zawartych w recenzji, oceniam wysoce pozytywnie.

Biorąc pod uwagę wartość aplikacyjną pracy, zawarte w niej elementy nowości naukowej, szeroki zakres przeprowadzonych eksperymentów badawczych oraz dobre przygotowanie warsztatowe Doktorantki stwierdzam, że przedłożona do oceny praca doktorska w pełni odpowiada warunkom stawianym rozprawom na stopień doktora i mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie wniosek o dopuszczenie mgr Aleksandry Żurek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, 21 lipca 2016 r.

