17 WRZ. 2012

Prof. dr hab. med. Ewa Sewerynek
94-279 Łódź, ul. Dożynkowa 3

08.09.2012r.

RECENZJA
pracy doktorskiej mgr inż. Anny Gajos-Michniewicz
z Zakładu Endokrynologii Porównawczej
Katedry Medycyny Molekularnej i Biotechnologii

Tytuł pracy: **„Rola nadekspresji folistatyny w kształtowaniu właściwości mechanicznych tkanki kostnej"**
Promotor pracy: Dr hab. med. Tomasz Ochędalski

Metabolizm tkanki kostnej jest złożonym procesem, w którym istotną rolę odgrywają z jednej strony predyspozycje genetyczne, z drugiej czynniki zewnątrz- (dieta, aktywnoć, itd.) i wewnątrz-środowiskowe, w tym czynniki o działaniu para- i endokrynnym (cytokiny, białka morfogenetyczne i in.). Mimo rozwiniętego systemu badań nad tkanką kostną ujawniane są coraz to nowe drogi wzajemnych oddziaływań pomiędzy osteoblastami i osteoklastami. Warto również zwrócić uwagę na osteocyty jako nie tylko komórki podporowe ale także wykazujące aktywność metaboliczną. Wykazano, iż ryzyko złamań kości zależy nie tylko od gęstości mineralnej kości ale jej wytrzymałości na co składa się jej mikroarchitektura, symetria, geometria i elastyczność. Okazuje się, że być może, niedocenianym faktem jest obecność złamań drobnych kości, które mogą wyprzedzać złamania typowo osteoporotyczne, w tym złamania kręgowe i pozakręgowe. Wydaje się więc że poznanie czynników wpływających na wytrzymałość mechaniczną kości powinno być przedmiotem intensywnych badań. Takiego zadania podjęła się doktorantka w swoim przewodzie doktorskim. Przedmiotem badania jest folistatyna - glikoproteina wyizolowana w 1987r., która należy do grupy białek antagonistycznych w stosunku do transformujących czynników wzrostowych β, t.j.: aktywiny, białka morfogenetyczne kości, miostatyna.

Celem prezentowanej przez Doktorantkę pracy była ocena wpływu nadekspresji folistatyny na wytrzymałość mechaniczną tkanki kostnej u myszy transgenicznych w porównaniu z grupą kontrolną.

W ocenianej przeze mnie pracy Doktorantka podjęła się wykonania kilku doświadczeń, bardzo pracochłonnych, co mogę ocenić na bazie moich doświadczeń w pracy eksperymentalnej. Doktorantka nie tylko poddała analizie parametry

morfometryczne zwierząt grupy badanej (myszy transgeniczne wykazujące nadekspresję genu folistatyny) w stosunku do grupy kontrolnej (myszy bez defektu genowego), ale oceniła parametry wytrzymałościowe kości udowych w różnych grupach wiekowych u obu płci. Następnie oceniła skład mineralny kości i stężenia hormonów i markerów odgrywających istotną rolę w metabolizmie kości. Bardzo szczegółowo oceniła obecność folistatyny (w surowicy, ekspresja folistatyny na poziomie mRNA i białka oraz ekspresja kolagenu) nie tylko w kościach ale innych tkankach np. tarczycy z przytarczycami i przysadce. Warto więc podkreślić pełne przemyślenie planu badania eksperymentalnego, duże zaangażowanie w pracy badawczej i dobre udokumentowanie uzyskanych wyników.

Przedłożona mi do oceny praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. Zawarta jest na 82 stronach obejmujących: 16 stronach wstępu, cel pracy, materiał i metody oraz charakterystyka poszczególnych doświadczeń i grup badawczych zawarte są na 14 stronach, wyniki na 17 stronach i ich omówienie oraz dyskusja na 14 stronach, piśmiennictwo obejmujące 119 pozycji. Praca zawiera ponadto: streszczenie w języku polskim i angielskim, spis rycin i tabel oraz wykaz użytych odczynników i innych materiałów.

Zarówno układ, jak i treść rozdziału „Wstęp" jest stosowny do celu pracy i charakteryzuje folistatynę oraz omawia parametry odporności mechanicznej kości.

W rozdziale Materiał i Metody p. mgr Anna Gajos-Michniewicz szczegółowo charakteryzuje metodykę badań z uwzględnieniem omówienia stosowanych odczynników i roztworów. Ponadto, charakteryzuje sposób przygotowania materiału do badań ekspresji folistatyny z uwzględnieniem izolacji RNA i białka. Następnie doktorantka przedstawia zbiorczy plan doświadczeń i prezentuje uzyskane wyniki. Warto podkreślić, iż czytając pracę można prześledzić tok rozumowania co wskazuje na uzyskane przez p. mgr duże doświadczenie i samodzielność w pracy eksperymentalnej.

Wyniki prac zostały zaprezentowane w postaci wielu tabel i wykresów, które są klarowne i jasne. Szeroki zakres badań i analiza porównawcza wyników zawarta jest na 15 stronach. Dzięki umieszczeniu rycin i tabel analizowanych parametrów w tekście omawiania wyników badań praca jest czytelna. Umieszczenie na końcu każdego omówienia wyników wniosku ułatwia prześledzenie danych. Uzyskane wyniki wskazują, iż nadekspresja folistatyny poprzez antagonistyczne działanie w stosunku do aktywin i BMPs negatywnie wpływa na procesy przebudowy tkanki kostnej.

Uzyskane wyniki są bardzo interesujące i wskazują iż nadekspresja krążącej folistatyny prowadzi do obniżenia parametrów wytrzymałościowych kości, a nie jest to związane z zaburzeniami składu mineralnego i zawartością kolagenu I. Warto także podkreślić, iż takiej zależności nie wykazano także dla wybranych przez mgr hormonów (GH, PTH). Doktorantka wykazała istotne różnice w stężeniu markeru obrotu kostnego – osteokalcyny w surowicy krwi zwierząt transgenicznych w stosunku do grupy kontrolnej co potwierdza różnicę metabolizmu kostnego w przebadanych grupach.

W „Dyskusji" Doktorantka porównała własne dane, z danymi z piśmiennictwa. Zwraca uwagę fakt dobrej znajomości literatury i sprawnie przeprowadzona analiza porównawcza kolejnych danych z pracy z wynikami innych autorów. Warto podkreślić, iż zaobserwowany przez Autorkę fakt może mieć implikacje kliniczne co Doktorantka zawarła we wniosku nr 4. Wydaje się iż z punktu klinicznego celowe byłoby oznaczenie folistatyny w grupie pacjentów ze złamaniami i dobrą gęstością mineralną kości. Ta grupa pacjentów stanowi dla nas klinicystów wyzwanie gdyż zarówno diagnostyka, jak i leczenie ma w tej grupie duże ograniczenia. Poznanie patomechanizmów może ułatwić podjęcie decyzji diagnostyczno-terapeutycznych.

W przedstawionej do oceny pracy, piśmiennictwo zawiera 119 pozycji, w tym 47 pozycji z lat 2005-2012. Dobór cytowanego piśmiennictwa nie budzi zastrzeżeń.

W przeprowadzonej pracy przedstawiono 4 wnioski, sformułowane stosownie do uzyskanych wyników.

W pracy doszukalam się zaledwie kilku błędów literowych, które nie wpływają na ocenę. Całość oceniam bardzo wysoko i mogę tylko pogratulować publikacji wyników badań w J Bone Miner Res o IF 6,373.

Podsumowując, uważam pracę doktorską mgr. inż. Anny Gajos-Michniewicz za bardzo wartościową, wnoszącą wiele cennych informacji klinicznych. Przedstawiona mi do oceny praca w pełni odpowiada wymogom stawianym pracom doktorskim i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr inż. Anny Gajos-Michniewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wysoką wartość merytoryczną pracy, bardzo dobre przygotowanie i wykonanie badań oraz wzorowe przygotowanie manuskryptu pracy wnoszę o jej wyróżnienie.