

Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytet Medyczny w Lublinie Lublin 20-093 ul. W. Chodźki 1 tel./fax (081) 448 6350 <i>Kierownik Prof. dr hab. n. med. Andrzej Stepulak</i>		Department of Biochemistry and Molecular Biology Medical University of Lublin Poland, Lublin 20-093 ul. W. Chodźki 1 tel./fax (00-48-81) 448 6350 <i>Head of Department Andrzej Stepulak M.D., Ph. D.</i>
--	---	--

Lublin, dn. 29.03.2016 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Justyny Bączyk

pt. „Insulinopodobne czynniki wzrostowe w płynie stawowym i surowicy w przebiegu uszkodzenia stawu kolanowego o różnej etiologii”

Choroby zwyrodnieniowe stawów są wyzwaniem współczesnej medycyny. Mimo ogromnego postępu zapobieganie i leczenie farmakologiczne nie przynosi oczekiwanych, dobrych rezultatów. Dlatego podejmowanie badań dotyczących patomechanizmu tych chorób jest ze wszech miar wskazane.

W ten nurt badań wpisuje się przedłożona do oceny rozprawa Pani Justyny Bączyk. Stanowi ona raport z badań Autorki dotyczących ustalenia zależności pomiędzy obecnością i stężeniem insulinopodobnych czynników wzrostu (IGF), białek je wiążących (IGFBP-1, IGFBP-3) oraz aktywnością wybranych metaloproteinaz, a występowaniem choroby zwyrodnieniowej stawów o różnej etiologii. W tym celu Doktorantka oznaczyła aktywność żelatynolityczną enzymów MMP2 i MMP9 degradujących niektóre białka macierzy zewnątrzkomórkowej, jak również stężenie IGF-I w surowicy i płynie stawowym w kilku grupach chorych ze stwierdzoną chorobą zwyrodnieniową stawu kolanowego o różnej etiologii.

Rozprawa doktorska o typowym układzie dla prac doświadczalnych liczy 81 stron i została podzielona na 9 rozdziałów, w tym streszczenia pracy w języku polskim i angielskim. Tekst uzupełniony został 4 tabelami i 23 rycinami. Praca została wzbogacona o **wykaz używanych skrótów** i symboli stanowiące użyteczny dla czytelnika odnośnik do tekstu. Nie znalazłem jednak rozwinięcia skrótów RAF, MAP, ERK, użytych w rozdziale pierwszym pracy dotyczących nazw kinaz (m.in. na stronach 17 i 19).

Wstęp zawarty na stronach 5-25 zawiera charakterystykę składników macierzy zewnątrzkomórkowej, płynu stawowego, omawia budowę i metabolizm chrząstki szklistej,

przedstawia aktualne dane na temat budowy i roli szeregu czynników wzrostu ze szczególnym uwzględnieniem IGF-I/IGF-II i białek wiążących te czynniki, jak również w zwięzły sposób opisuje etiologię i patogenezę chorób zwyrodnieniowych stawów, będących tematem pracy doktorskiej. „**Wstęp**” jest obszernym i przejrzystym wprowadzeniem w problematykę zagadnień podejmowanych w rozprawie. Z obowiązku recenzenta chciałbym zwrócić uwagę na rycinę nr 4, sugerując zwiększenie wielkości czcionki, gdyż niektóre nazwy są praktycznie nieczytelne, oraz na rycinę 3, gdzie zastosowano moim zdaniem zbyt daleko idące uogólnienie – „geny związane z nowotworem”, które należałoby doprecyzować.

Cel pracy dotyczy ważnego wątku badań poszukującego czynników patogenetycznych chorób zwyrodnieniowych stawów na poziomie zaburzeń biochemicznych. Wybór tematu badań i sposobów jego realizacji nie budzi zastrzeżeń, tym niemniej samo sformułowanie celu pracy jest słabo zdefiniowane – Autorka powtarza w tym rozdziale dane ze **Wstępu**, opisuje materiał badawczy i wymienia metody, które będzie używać. Jednak dopiero z ostatniego fragmentu **Celu pracy** można wywnioskować o istocie zamierzonych badań.

Materiał i metody stosowane w pracy zostały opisane w rozdziale 3. Konstrukcja badania jest czytelna i wyraźnie akcentuje kryteria włączenia chorych do badania. Brak mi jednak informacji, czy artroskopia i pobranie płynu stawowego były dokonywane podczas diagnozy, czyli przed zastosowaniem leczenia? Czy też u pacjentów już poddanych terapii? – w takim razie wymagałoby to uzupełnienia o wskazanie rodzaju stosowanego leczenia i czasu jego trwania, gdyż mogło to mieć wpływ na wyniki otrzymane przez Doktorantkę. Pewne dane w tym zakresie w odniesieniu do grupy młodych pacjentów podane są dopiero w **Dyskusji** (str. 60).

Badaniami objęto grupę 70 chorych poddanych artroskopii stawu kolanowego, podzielonych na 5 głównych grup w zależności od etiologii choroby i związanego z nią wieku pacjentów oraz dwie grupy chorych zależne tylko od ich wieku. Przedstawiony wiek analizowanych chorych w badanych grupach stanowi przemyślane kryterium umożliwiające prawidłową ocenę badanych parametrów w odniesieniu do wieku chorych. Interesującym by było jednak porównanie poszczególnych jednostek chorobowych przy zbliżonym wieku chorych w poszczególnych grupach pacjentów dorosłych. Ze względu na konstrukcję zaproponowanego badania w przedstawionej pracy możliwe to było tylko w grupie pacjentów młodych.

Zastosowana metodyka jest adekwatna do wytyczonego celu i spełnia wymogi nowoczesności wymagane w badaniach z zakresu biochemii – Autorka określiła stężenie

białka całkowitego w badanym materiale dwoma metodami, stosowała elektroforezę w warunkach natywnych i redukujących, elektrotransfer z detekcją specyficznych białek, zymografię, oraz test immunoenzymatyczny typu ELISA z wykorzystaniem komercyjnych zestawów. Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na brak podanych składów buforów próbkowych do zawieszenia białek użytych następnie do elektroforezy i zymografii. Nie jest też podany rodzaj używanego elektrotransferu białek na nitrocelulozę – „mokry”, czy „półsuchy”.

Analiza statystyczna nie budzi zastrzeżeń. Przyjęte testy statystyczne nie odbiegają od standardów światowych, a ich wybór należy uznać za odpowiedni.

Wyniki wykonanych pomiarów przedstawiono w sposób czytelny i jasny. Autorka dokonała bardzo wielu korelacji badanych parametrów, uwzględniając szereg czynników. Dane te zostały starannie zobrazowane w postaci licznych tabel i wykresów, w większości wypadków - z zaznaczonymi wynikami analizy statystycznej. Oznaczeń takich nie ma przy rycinach nr 5A i 5B. W korespondującym z rycinami tekście nie ma też podanej informacji, czy wskazywane różnice w stężeniu białka całkowitego oznaczane różnymi metodami w poszczególnych grupach chorych były statystycznie istotne. Przy przygotowywaniu danych do publikacji doktorantka mogłaby uwzględnić umieszczenie w opisie rycin rodzaju testu statystycznego, którym prezentowane wyniki były liczone, mimo że był to ten sam test. Sugerowałbym też umieszczenie szczegółowych wyników ilościowych stężenia IGF-I prezentowanych na rycinach od nr 8 do nr 15 w formie jednej lub dwóch zbiorczych tabel, co znacznie ułatwiłoby analizę tych wartości w różnych jednostkach chorobowych i wiekowych grupach pacjentów. Doktorantka stwierdziła wyższe stężenia IGF-I w surowicy i płynach stawowych w grupie pacjentów młodych. W grupie pacjentów dorosłych Autorka dysertacji stwierdziła stosunkowo wysokie stężenia całkowitego IGF-I w płynie stawowym chorych z rozpoznaną boreliozą przy jednoczesnym niskim stężeniu wolnej formy tego czynnika. Odmienną sytuację stwierdziła w przypadku RZS – niższe stężenie całkowitej formy IGF-1 i stosunkowo wysokie stężenie formy wolnej, co przełożyło się na najwyższy wskaźnik procentowy stosunku całkowitego do wolnego IGF-1 w przypadku chorych z RZS w porównaniu do innych jednostek chorobowych w grupie pacjentów dorosłych pomimo różnic wiekowych. Wydaje mi się to interesującą obserwacją, która mogłaby być zbadana w grupach pacjentów o zbliżonej strukturze wiekowej, wraz z próbą korelacji czasu trwania choroby, czy nasilenia zmian patologicznych w stawie ocenionych za pomocą badań obrazowych. Doktorantka oceniła również aktywność enzymów proteolitycznych degradujących żelatynę w płynach stawowych i surowicy chorych,

zakwalifikowanych jako MMP2 i MMP9 ze względu na obserwowane masy cząsteczkowe wytrawionych prążków w zymografii. Do publikacji przedstawionych w rozprawie wyników w renomowanych czasopismach międzynarodowych istotne by było jednoznaczne potwierdzenie, że te enzymy to MMP2 i MMP9 – na przykład poprzez immunobloting.

Reasumując, wyniki doświadczeń przeprowadzonych przez mgr Justynę Bączyk stanowią uzupełnienie wiedzy o roli IGF oraz metaloproteinaz w patogenezie chorób zwyrodnieniowych stawów.

Dyskusja przedstawionej do recenzji dysertacji świadczy o swobodnym poruszaniu się Autorki w zagadnieniu będącym przedmiotem rozprawy doktorskiej. Zawarte w dyskusji informacje w sposób rzeczowy i wiarygodny porównują uzyskanie wyniki z danymi zaczerpniętymi z piśmiennictwa. Doktorantka formułuje odważne hipotezy, popierając je wynikami badań własnych oraz dostępnych w piśmiennictwie. Ma jednak świadomość, że dane te są niepełne i do udowodnienia wysuwanych w **Dyskusji** sugestii wymagane jest przeprowadzenie szeregu dodatkowych eksperymentów, których w przyszłości zapewne się podejmie. Świadczy to o tym, że Autorka planuje swój dalszy rozwój naukowy.

Wnioski nr 1, 3, 4 i 5 wynikają z konstrukcji badania oraz znajdują uzasadnienie w wynikach i nie budzą zastrzeżeń. Nie do końca mogę się zgodzić z wnioskiem nr 6, ponieważ konstrukcja badania uniemożliwia określenie innych zależności, co uwzględniłem już w komentarzu dotyczącym **Wyników** dysertacji. Wniosek nr 7 wymaga doprecyzowania, gdyż ocenę destrukcji stawów można przeprowadzić bardziej przez zastosowanie badań obrazowych, a w mniejszym stopniu za pomocą wykładników biochemicznych.

Piśmiennictwo zawierające 113 pozycji jest adekwatne i świadczy o umiejętności selekcjonowania istotnych informacji związanych z podjętym tematem badań. Umieszczone pozycje piśmiennictwa są aktualne i znajdują się w bazach danych czasopism naukowych. 37 pozycji pochodzi z ostatnich pięciu lat (2011-2015), pozostałe posiadają kluczowe znaczenie dla redakcji wstępu lub zawierają oryginalne opisy stosowanych metod badawczych. Niektóre publikacje poglądowe mogłyby być nowsze, szczególnie te z lat 2000-2001 lub starsze (pozycje nr 1, 18, 21, 22, 31, 36, 48, 55, 66, 77, 78, 89, 104). Moją wątpliwość budzi zasadność cytowania pozycji nr 92 w początkowych zdaniach **Wstępu** na stronie 10 w kontekście „uszkodzeń chrząstki ... w przebiegu ... chorób ogólnoustrojowych lub infekcyjnych.”, podczas gdy pozycja nr 92 piśmiennictwa publikowana w Przeglądzie Elektrotechnicznym traktuje o rekonstrukcji przestrzennej oraz ocenie dokładności odwzorowania ubytków tkanki chrzęstnej w stawie kolanowym z wykorzystaniem MR. Podobnie, pozycja nr 108 użyta w dysertacji jako odnośnik do tekstu

„Insulinopodobne czynniki wzrostowe są syntetyzowane ... w komórkach wątroby, jak również przez komórki wielu innych narządów...” nie dotyczy IGF, o którym nie ma wzmianki w cytowanej publikacji, a dotyczy reorganizacji aktyny i roli MMP w tym procesie. Dodatkowo, pozycja ta powinna być uzupełniona o prawidłowy rok jej wydania – zamiast 1989 powinno być 1986.

Przedstawione uwagi w niczym nie umniejszają jednak wartości recenzowanej rozprawy doktorskiej, którą oceniam wysoko. W zdecydowanej większości dotyczą one zagadnień typowo technicznych, które mogą być łatwo skorygowane, bądź uzupełnione przy przygotowywaniu wyników do publikacji w czasopismach naukowych.

Konkludując stwierdzam, że przedmiot prowadzonych badań, dobór metod, prezentacja wyników, rzeczowość dyskusji oraz uzyskane wnioski odpowiadają kryteriom stawianym pracom doktorskim określonym w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.).

W związku z powyższym

przedkładam Wysokiej Radzie

Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku
Angielskim Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

wniosek o dopuszczenie mgr Justyny Bączyk
do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, 29.03.2016



Prof. dr hab. n. med. Andrzej Stepulak,
Uniwersytet Medyczny w Lublinie