

KLINIKA CHOROÓB KRĘGOSŁUPA I ORTOPEDII CMKP
SPSK im. prof. ADAMA GRUCY
ul. KONARSKIEGO 13, 05-400 OTWOCK
tel. 224173399; e-mail: kregoslup@spskgruca.pl lub kchkr@cmkp.edu.pl
Kierownik Kliniki: Dr hab. n. med. Marcin Tyrakowski, prof. CMKP

DZIEKANAT
Wydziału Nauk o Zdrowiu

Otwock, dnia 6 grudnia 2019 roku

Wzłynała 12. 12. 2019 Nr 3965

Recenzja rozprawy doktorskiej

„Ocena związku globalnej metylacji gDNA oraz lokalnej metylacji wysp CpG genów receptorów estrogenowych z predyspozycją do występowania skoliozy idiopatycznej i jej postaci klinicznej”

autorstwa mgr Małgorzaty Chmielewskiej

Przesłany do recenzji egzemplarz rozprawy doktorskiej obejmuje 202 strony maszynopisu. Po stronie tytułowej, informacji o finansowaniu projektu badawczego ze środków Narodowego Centrum Nauki oraz stronie zawierającej podziękowania doktorantka umieściła spis treści manuskryptu. Zasadnicza część pracy została poprzedzona wykazem skrótów i podzielona w sposób typowy na: Wstęp, Założenia i cele pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusję, Wnioski i Piśmiennictwo. Kolejno autorka umieściła streszczenie w języku polskim i angielskim, Spis rycin i tabel oraz Suplement. Na końcu dołączono kopie uchwał Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Sześćdziesiąt jeden rycin i 48 tabel w zasadniczej części dysertacji oraz 14 tabel w Suplemencie opisane są jasnymi legendami i właściwie uzupełniają kolejne części tekstu.

We Wstępie, który liczy 20 stron, autorka w przystępny sposób wprowadziła czytelnika do tematu rozprawy podejmując się kolejno przedstawienia, na podstawie danych literaturowych, etiopatogenezy skoliozy idiopatycznej, jej genetycznych uwarunkowań oraz związku estrogenów z występowaniem i progresją skolioz. Kolejno doktorantka charakteryzuje estrogeny i receptory estrogenowe, regulację epigenetyczną ekspresji genów kodujących receptory estrogenowe oraz czynniki epigenetyczne w skoliozie idiopatycznej.

Kolejno Doktorantka przedstawiła 4 założenia pracy: 1. czynniki epigenetyczne mają znaczenie w etiopatogenezie skoliozy idiopatycznej; 2. istnieją różnice w metylacji globalnej gDNA pomiędzy pacjentami ze skoliozą idiopatyczną a zdrową populacją; 3. istnieją różnice

w metylacji globalnej gDNA i metylacji genowo specyficznej pomiędzy pacjentami z różną postacią kliniczną skoliozy idiopatycznej; 4. występują różnice w metylacji genowo specyficznej pomiędzy mięśniami po stronie wypukłej i wklęsłej skrzywienia). Głównym celem pracy była ocena poziomu metylacji globalnej gDNA oraz lokalnej w obrębie wybranych regionów regulatorowych genów *ESR1* oraz *ESR2* w mięśniach grzbietu u chorych ze skoliozą idiopatyczną, a cel ten został zrealizowany przez 6 celów szczegółowych: 1. porównanie poziomu globalnej metylacji gDNA pacjentek ze skoliozą idiopatyczną a grupą kontrolną; 2. ocena poziomu globalnej metylacji gDNA w podgrupach pacjentek z różnym fenotypem klinicznym SI; 3. porównanie wzoru metylacji dinukleotydów CpG gDNA w obrębie regionów regulatorowych genów *ESR1* i *ESR2* pomiędzy mięśniami powierzchownymi a głębokimi grzbietu u chorych operowanych z powodu SI; 4. porównanie wzoru metylacji dinukleotydów CpG gDNA w obrębie regionów regulatorowych genów *ESR1* i *ESR2* w mięśniach głębokich grzbietu po stronie wklęsłej i wypukłej skrzywienia u pacjentek operowanych z powodu SI; 5. porównanie wzoru metylacji dinukleotydów CpG gDNA w obrębie regionów regulatorowych genów *ESR1* i *ESR2* u pacjentek operowanych z powodu SI z różnym fenotypem klinicznym; 6. ocena zależności poziomu metylacji i ekspresji w obrębie regionów regulatorowych genów *ESR1* i *ESR2* u pacjentek operowanych z powodu SI z różnym fenotypem klinicznym.

Zgodnie z metodyką badania zostały podzielone na etapy mające na celu analizę metylacji globalnej, poziomu ekspresji mRNA genów *ESR1* oraz *ESR2*, lokalnej metylacji wysp CpG genów receptorów estrogenowych oraz powiązania poziomu metylacji lokalnej wysp CpG genów *ESR1* i *ESR2* z poziomem ekspresji.

Badanie metylacji globalnej zostało przeprowadzone na DNA wyizolowanym z krwi obwodowej chorych ze stwierdzoną skoliozą idiopatyczną oraz od zdrowych kobiet z ujemnym wywiadem rodzinnym w kierunku skoliozy. W przypadku analizy poziomu metylacji wysp CpG genów receptorów estrogenowych oraz oceny poziomu ekspresji mRNA genów *ESR1* i *ESR2* do badań zakwalifikowano chore leczone operacyjnie ze wskazań wynikających z przebiegu SI. Od chorych tej grupy, które spełniały kryteria włączenia do badań pobrano próbki krwi obwodowej i tkanek mięśni grzbietu (mięśnie powierzchowne oraz głębokie ze strony wypukłej i wklęsłej skrzywienia).

Chore z SI zostały poddane badaniu klinicznemu, radiologicznemu i genetycznemu, a osoby z grupy kontrolnej tylko badaniu klinicznemu i genetycznemu. Na podstawie analizy danych klinicznych wyróżniono jednolite podgrupy. W grupie chorych ze skoliozą idiopatyczną występowały przypadki ze stwierdzoną nieprogressywną oraz progressywną postacią skoliozy idiopatycznej. Ze względu na wiek w momencie rozpoznania skoliozy idiopatycznej

wyodrębniono dwie grupy: dziecięcą oraz młodzieńczą. Kolejne podziały oparte były o klasyfikację wg Lenke, w której wyróżniono skoliozy o lokalizacji piersiowej i lędźwiowej głównego skrzywienia oraz skoliozy jednołukowe i dwułukowe. Ze względu na wielkość skrzywienia wyodrębniono dwie grupy (kąąt Cobba $\leq 75^\circ$ oraz $>75^\circ$). Analiza statystyczna została przeprowadzona z użyciem adekwatnych narzędzi.

W kolejnej części autorka w obszerny, ale przystępny sposób przedstawia wyniki badań.

Badanie metylacji globalnej wykazało niższą zawartość metylowanych cytozyn w grupie chorych ze skoliozą idiopatyczną, w porównaniu do grupy kontrolnej. Różnica ta nie była istotna statystycznie. Nie wykazano również różnic w poziomie metylacji globalnej między grupami klinicznymi.

Poziom metylacji dwóch dinukleotydów CpG regionu T-DMR1 genu *ESR1* różnił się istotnie statystycznie pomiędzy mięśniem powierzchownym a mięśniami głębokimi grzbietu. W przypadku pięciu CpG regionu T-DMR2 genu *ESR1* zaobserwowano różnicę między poziomem metylacji w mięśniu powierzchownym a mięśniu głębokim po stronie wklęsłej skrzywienia. W obu regionach CpG najwyższy poziom metylacji był obserwowany w mięśniu powierzchownym. Dodatkowo, w mięśniu głębokim po stronie wklęsłej poziom metylacji był niższy niż po stronie wypukłej skrzywienia. Różnica była nieistotna statystycznie.

Poziom metylacji regionów T-DMR1 i T-DMR2 genu *ESR1* nie różnił się istotnie statystycznie pomiędzy chorymi z dziecięcą i młodzieńczą skoliozą idiopatyczną.

Biorąc pod uwagę podział chorych na grupy kliniczne stwierdzono brak istotnych różnic w poziomie metylacji T-DMR1 w zależności od wielkości skrzywienia. Poziom metylacji w regionie T-DMR2 różnił się istotnie w przypadku czterech dinukleotydów CpG w mięśniu głębokim po stronie wklęsłej skrzywienia. Poziom metylacji był wyższy u pacjentek z kątem skrzywienia $>75^\circ$. W przypadku mięśni po stronie wypukłej skrzywienia mimo podobnego trendu, różnica nie była istotna statystycznie.

Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie w poziomie metylacji regionów T-DMR1 i T-DMR2 u chorych w zależności od lokalizacji oraz liczby łuków skrzywienia.

Na podstawie wyznaczonych wartości kwartyli dla procentowego poziomu metylacji utworzono przedziały obejmujące hipometylację, metylację średnią oraz hipermetylację. W przypadku jednego dinukleotydu regionu T-DMR1 oraz dwóch CpG regionu T-DMR2 wykazano istotną różnicę w przedziałowych wartościach metylacji. Niezależnie od lokalizacji mięśnia dominowała metylacja na poziomie średnim. W mięśniach głębokich grzbietu analizując przedziałowy poziom metylacji nie zaobserwowano istotnych różnic (dla obu badanych regionów) w wyodrębnionych grupach klinicznych. W mięśniu powierzchownym

w regionie T-DMR1 dominował średni poziom metylacji dinukleotydu CpG1 w grupie pacjentek z kątem Cobba $>75^\circ$. W pozostałych przypadkach nie stwierdzono istotnych różnic. Poziom metylacji dinukleotydów CpG w obu badanych regionach T-DMR genu *ESR1* był średnio, silnie lub bardzo silnie skorelowany ze sobą. Analizując korelację pomiędzy poziomem metylacji a ekspresją genu *ESR1* wykazano istotną korelację w mięśni głębokim po stronie wklęsłej skrzywienia dla jednego dinukleotydu T-DMR1 oraz sześciu CpG T-DMR2. Biorąc pod uwagę podział pacjentek na podgrupy kliniczne zaobserwowano, że poziom metylacji CpG1 regionu T-DMR1 istotnie koreluje z ekspresją *ESR1* w mięśni głębokim po stronie wklęsłej, zarówno w grupie z dziecięcą i młodzieńczą skoliozą idiopatyczną. W regionie T-DMR2 w tej samej lokalizacji mięśniowej występowała istotna korelacja pomiędzy poziomem metylacji a ekspresją *ESR1* większości dinukleotydów CpG w grupie z młodzieńczą skoliozą idiopatyczną. W grupie chorych z kątem Cobba $>75^\circ$ korelacja dotyczyła dwóch dinukleotydów regionu T-DMR1 w mięśni głębokim po stronie wklęsłej skrzywienia. W drugim badanym regionie, zarówno po stronie wypukłej jak i wklęsłej skrzywienia wykazano istotne korelacje dla większości CpG u chorych z kątem Cobba $\leq 75^\circ$. W zależności od lokalizacji głównego skrzywienia w regionie T-DMR1 zaobserwowano korelację poziomu metylacji z ekspresją w przypadku dwóch dinukleotydów, odpowiednio w mięśni głębokim po stronie wklęsłej w lokalizacji piersiowej oraz w mięśni powierzchniowym pobranym od pacjentek wykazujących lokalizację lędźwiową skrzywienia. Z kolei w regionie T-DMR2 korelacja występowała głównie w mięśni głębokim po stronie wklęsłej w lokalizacji lędźwiowej. Niezależnie od liczby łuków skrzywienia, nie wykazano korelacji między poziomem metylacji T-DMR1 a ekspresją *ESR1*. W regionie T-DMR2 stwierdzono korelację w skrzywieniu dwułukowym dla czterech CpG oraz w jednołukowym dla dwóch dinukleotydów w mięśni głębokim po stronie wklęsłej. Istotne statystycznie korelacje pomiędzy poziomem metylacji regionów T-DMR1 i T-DMR2 a ekspresją genu *ESR1* były wprost proporcjonalne.

Analiza grupowania aglomeracyjnego, niezależnie od badanej tkanki, pozwoliła na wyodrębnienie dwóch skupień o zróżnicowanym poziomie metylacji. Grupa charakteryzująca się wyższym poziomem metylacji w regionie T-DMR2 wykazywała istotnie wyższy poziom ekspresji genu *ESR1*. Dla regionu T-DMR1 nie wykazano różnicy w poziomie ekspresji między wyodrębnionymi skupieniami. Biorąc pod uwagę lokalizację mięśnia analiza aglomeracji wykazała istotną różnicę w poziomie ekspresji między skupieniami regionu T-DMR2 w mięśni głębokim po stronie wklęsłej skrzywienia. Różnic tych nie stwierdzono dla skupień wyznaczonych dla regionu T-DMR1, niezależnie od badanej tkanki.

Poziom metylacji promotora 0N oraz eksonu 0N genu *ESR2* nie różnił się istotnie statystycznie między badanymi grupami mięśni.

Biorąc pod uwagę grupy chorych z dziecięcą oraz młodzieńczą skoliozą idiopatyczną wykazano różnicę w poziomie metylacji dwóch dinukleotydów CpG promotora 0N. W obu przypadkach poziom metylacji CpG był wyższy u chorych z dziecięcą skoliozą idiopatyczną i dotyczył odpowiednio mięśnia głębokiego po stronie wypukłej skrzywienia (CpG15) oraz mięśnia powierzchniowego (CpG16). Poziom metylacji czterech dinukleotydów CpG eksonu 0N różnił się istotnie statystycznie pomiędzy wyróżnionymi grupami w mięśniu głębokim po stronie wklęsłej skrzywienia. Wyższy poziom metylacji występował w grupie chorych z młodzieńczą skoliozą idiopatyczną.

Poziom metylacji w promotorze 0N nie różnił się istotnie statystycznie pomiędzy grupami chorych w zależności od kąta Cobba. W eksonie 0N zaobserwowano różnicę w dinukleotydzie CpG16 w mięśniu głębokim po stronie wklęsłej skrzywienia. Poziom metylacji był istotnie wyższy u chorych z kątem Cobba $\leq 75^\circ$. Zaobserwowano, że poziom metylacji wszystkich dinukleotydów promotora 0N genu *ESR2* nie różnił się istotnie statystycznie pomiędzy grupami w zależności od lokalizacji głównego skrzywienia. Poziom metylacji ośmiu dinukleotydów CpG eksonu 0N głównie w mięśniu głębokim po stronie wypukłej skrzywienia był istotnie wyższy w przypadku chorych wykazujących lokalizację piersiową głównego skrzywienia. Dodatkowo w dwóch dinukleotydach zaobserwowano wyższy poziom metylacji w grupie charakteryzującej się lokalizacją piersiową skrzywienia w mięśniu powierzchownym.

Zaobserwowano istotnie wyższy poziom metylacji CpG14 promotora 0N u chorych ze skrzywieniem dwułukowym w mięśniu głębokim po stronie wklęsłej skrzywienia. Analizując ekson 0N genu *ESR2* wykazano istotnie wyższy poziom metylacji u chorych ze skrzywieniem dwułukowym. W przypadku pięciu CpG różnica dotyczyła mięśnia głębokiego po stronie wklęsłej skrzywienia, w dwóch pozostałych mięśnia powierzchownego. Na podstawie wyznaczonych wartości kwartyli dla procentowego poziomu metylacji utworzono przedziały obejmujące hipometylację, metylację średnią oraz hipermetylację. W przypadku przedziałów metylacji wyznaczonych na podstawie kwartyli dla promotora 0N genu *ESR2* w badanych tkankach dla żadnej z analizowanych 16 dinukleotydów CpG nie uzyskano istotnych różnic w przedziałowym poziomie metylacji.

Analiza przedziałów metylacji dla promotora 0N u chorych w zależności od wieku rozpoznania skoliozy idiopatycznej wykazała istotną różnicę w przypadku dwóch dinukleotydów dla mięśni powierzchownych oraz jednego CpG w mięśniach głębokich po stronie wypukłej skrzywienia. Pacjentki z młodzieńczą skoliozą idiopatyczną w przypadku mięśnia powierzchownego

charakteryzowały się w większości obniżoną metylacją w stosunku do grupy z dziecięcą skoliozą idiopatyczną. W mięśni głębokim po stronie wypukłej skrzywienia w obu grupach dominowała metylacja na poziomie średnim.

Analizując przedziały metylacji dla promotora 0N u chorych z kątem Cobba w przedziałach $\leq 75^\circ$ oraz $>75^\circ$, nie uzyskano istotnej różnicy w żadnej z analizowanych dinukleotydów CpG w badanych tkankach. Również w przypadku grup z piersiową lub lędźwiową lokalizacją głównego skrzywienia, nie uzyskano istotnych różnic w żadnym z analizowanych dinukleotydów CpG, niezależnie od badanej tkanki.

W zależności od liczby łuków skrzywienia wykazano istotną różnicę w przypadku dwóch dinukleotydów promotora 0N. Zarówno w skrzywieniu jednołukowym jak i dwułukowym w przypadku CpG11 dominowała hipometylacja, a w CpG15 metylacja na poziomie średnim.

W przypadku przedziałów metylacji wyznaczonych na podstawie rozstępu kwartyłowego dla eksonu 0N genu *ESR2* w badanych tkankach uzyskano istotną różnicę tylko dla jednego dinukleotydu. Niezależnie od lokalizacji mięśnia dominowała hipometylacja. Analizując przedziały metylacji dla eksonu 0N, w zależności od wieku w momencie rozpoznania skoliozy, uzyskano istotną różnicę w przypadku dinukleotydu CpG12 w mięśni po stronie wklęsłej skrzywienia. Zarówno w grupie z dziecięcą jak i młodzieńczą skoliozą idiopatyczną dominowały przypadki z metylacją średnią.

Analizując przedziały metylacji dla eksonu 0N w zależności od wielkości skrzywienia stwierdzono, że w sześciu dinukleotydach CpG u pacjentek z kątem Cobba $>75^\circ$ dominuje metylacja na poziomie średnim. U pacjentek z kątem Cobba wynoszącym $\leq 75^\circ$ w porównaniu do drugiej grupy było więcej przypadków z hipermetylacją.

Na podstawie przedziałów metylacji dla eksonu 0N stwierdzono różnicę dla dwóch dinukleotydów w zależności od lokalizacji anatomicznej głównego skrzywienia. U chorych z piersiową lokalizacją skrzywienia dominował średni poziom metylacji w mięśni głębokim po stronie wklęsłej. Natomiast w drugiej grupie nieznacznie przeważał odsetek przypadków z hipometylacją.

Biorąc pod uwagę przedziały kwartyłowe poziomu metylacji eksonu 0N genu *ESR2* stwierdzono różnicę dla dinukleotydów CpG13 i CpG19 w zależności od liczby łuków skrzywienia. W przypadku pierwszego z wymienionych dominowała metylacja średnia u pacjentek ze skrzywieniem dwułukowym (w mięśni głębokim po stronie wklęsłej). W CpG19 odsetek przypadków z hipometylacją i metylacją średnią był taki sam w skrzywieniu dwułukowym.

Poziom metylacji dinukleotydów CpG w obu badanych regionach genu *ESR2* był średnio, silnie lub bardzo silnie skorelowany ze sobą. Obserwowano istotną statystycznie korelację

poziomu metylacji promotora 0N z ekspresją *ESR2* po stronie wklęsłej skrzywienia (dziewięć dinukleotydów na szesnaście). Z kolei, po stronie wypukłej korelacja była istotna tylko w przypadku czterech CpG. Analiza korelacji wykazała, że po stronie wypukłej skrzywienia u pacjentek z AIS poziom metylacji siedmiu z szesnastu CpG promotora 0N był odwrotnie proporcjonalnie i istotnie statystycznie skorelowany z ekspresją *ESR2*. Dodatkowo wykazano istotną, odwrotnie proporcjonalną korelację między poziomem metylacji czterech (z szesnastu) CpG w mięśni głębokim po stronie wklęsłej skrzywienia u pacjentek z EOIS. Analiza korelacji wykazała z kolei, że wraz ze wzrostem poziomu metylacji w eksonie 0N stwierdzono zwiększoną ilość mRNA genu *ESR2* u pacjentów z AIS w mięśni głębokim po stronie wypukłej skrzywienia.

U chorych z kątem Cobba $>75^\circ$ nie zaobserwowano istotnych korelacji między poziomem metylacji promotora 0N a ekspresją genu *ESR2*. Z kolei w drugiej grupie w większości dinukleotydów poziom metylacji promotora 0N był odwrotnie proporcjonalnie skorelowany z ekspresją *ESR2* zarówno w mięśni powierzchniowym, jak i w mięśniach głębokich. Takiego wzoru nie zaobserwowano dla eksonu 0N. W mięśni powierzchniowym u pacjentek z kątem Cobba $>75^\circ$ poziom metylacji kilku dinukleotydów był odwrotnie proporcjonalnie skorelowany z ekspresją *ESR2*. Korelacja poziomu metylacji promotora 0N z ekspresją *ESR2* wykazała istotną statystycznie, średnią odwrotnie proporcjonalną zależność dla czterech dinukleotydów CpG po stronie wklęsłej skrzywienia w lokalizacji piersiowej. Z kolei w lokalizacji lędźwiowej, zarówno w mięśniach powierzchniowych, jak i głębokich zaobserwowano silną oraz bardzo silną odwrotnie proporcjonalną korelację w przypadku dwóch dinukleotydów CpG.

Wykazano również istotną statystycznie, odwrotnie proporcjonalną, średnią i silną korelację między poziomem metylacji sześciu dinukleotydów CpG promotora 0N a ekspresją genu *ESR2* w mięśni głębokim po stronie wypukłej skrzywienia jednołukowego. Analiza korelacji poziomu metylacji eksonu 0N z ekspresją *ESR2* nie wykazała jednoznacznych zależności.

Analiza grupowania aglomeracyjnego, niezależnie od badanej tkanki, pozwoliła na wyodrębnienie dwóch skupień o zróżnicowanym poziomie metylacji. W przypadku promotora 0N w grupie o niższym poziomie metylacji ekspresja *ESR2* była istotnie wyższa. Wyznaczając skupienia w grupach mięśniowych, uzyskano zróżnicowany poziom ekspresji tylko w mięśni głębokim po stronie wklęsłej skrzywienia. Zwiększony poziom metylacji promotora 0N w sposób istotny hamował transkrypcję genu *ESR2*.

W Dyskusji Doktorantka uzasadnia podjęcie badań w kontekście danych literaturowych, w prawidłowy sposób komentuje własne wyniki na tle aktualnej literatury

oraz podkreśla dużą ostrożność wysnuwania części wniosków z powodu chociażby ograniczonej liczebności poszczególnych grup badanych.

W kolejnej części rozprawy Doktorantka przedstawia 6 wniosków odpowiadających 6 celom szczegółowym pracy: 1. poziom metylacji globalnej genomowego DNA pacjentek ze skoliozą idiopatyczną nie różni się istotnie od jego poziomu w zdrowej populacji; 2. pacjentki z różnym obrazem klinicznym SI nie różnią się znamiennej poziomem metylacji globalnej genomowego DNA, co nie stwarza możliwości wykorzystania tej analizy do prognozowania przebiegu tej patologii; 3. wzór metylacji siedmiu badanych dinukleotydów CpG gDNA w obrębie regionów regulatorowych T-DMR1 i T-DMR2 genu *ESR1* pacjentek ze skoliozą idiopatyczną różni się znamiennej pomiędzy mięśniami powierzchniowymi a głębokimi grzbietu, różnicy takiej nie wykazuje poziom metylacji promotora 0N i eksonu 0N genu *ESR2*; 4. pacjentki operowane z powodu skoliozy idiopatycznej wykazują wyższy poziom metylacji dinukleotydów CpG gDNA w obrębie regionów regulatorowych genów *ESR1* i *ESR2* w mięśniach głębokich grzbietu po stronie wypukłej skrzywienia, w porównaniu do strony wklęsłej, co może się wiązać z etiopatogenezą SI; 5. analiza wzoru metylacji dinukleotydów CpG gDNA w obrębie regionów regulatorowych genów *ESR1* i *ESR2* wykonana w mięśniach grzbietu pacjentek ze skoliozą idiopatyczną wskazuje na obecność dinukleotydów CpG, których poziom metylacji wiąże się z fenotypem klinicznym skoliozy; 6. zaobserwowane w mięśniach grzbietu pacjentek operowanych z powodu skoliozy idiopatycznej zależności pomiędzy poziomem metylacji w obrębie regionów regulatorowych genów *ESR1* i *ESR2*, a ekspresją tych genów wskazują, że ten rodzaj modyfikacji genomu jest istotnym czynnikiem mogącym wpływać na odpowiedzi badanych tkanek na estrogeny.

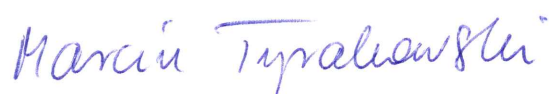
Piśmiennictwo obejmuje 245 pozycji literaturowych polskich i zagranicznych uporządkowanych w kolejności alfabetycznej i w prawidłowy sposób cytowanych w tekście.

Rozprawę doktorską mgr Małgorzaty Chmielewskiej oceniam pozytywnie. Dysertacja jest znaczącą pracą naukową, napisaną w oparciu o własne doświadczenia i spostrzeżenia, podpartą rzetelnymi badaniami i wynikami wraz z zaawansowaną analizą statystyczną, z umiejętnym wykorzystaniem piśmiennictwa. Wyniki pracy stanowią istotny wkład do wiedzy dotyczącej etiologii i przyczyn progresji skolioz idiopatycznych. Z obowiązku recenzenta muszę wspomnieć o nielicznych błędach interpunkcyjnych (strony: 33, 66, 71, 77), literowych (strony: 16, 17, 69, 78, 96, 102), co nie ujmuje w żaden sposób wartości rozprawy. Ponadto chciałbym podkreślić, że skoliozy dwułukowe klasyfikowane jako typ III i VI wg Lenke to skoliozy dwułukowe, tzn. z jednym łukiem zlokalizowanym w kręgosłupie piersiowym i drugim – w kręgosłupie lędźwiowym

lub piersiowo-lędźwiowym. We wstępie zostały one nieprawidłowo określone przez Doktorantkę jako skoliozy dwułukowe piersiowo-lędźwiowe. Kolejne szczegóły wymagające korekty przed ewentualną publikacją wyników pracy w języku polskim to określenie „mięśnie powierzchniowe grzbietu” oraz „średni poziom metylacji”. Zgodnie z polskim mianownictwem anatomicznym wyróżnia się dwie grupy mięśni grzbietu: mięśnie głębokie oraz powierzchowne (a nie powierzchniowe) grzbietu. Przedstawiając wyniki badań autorka w tekście pracy używa niepoprawnie sformułowania „średni poziom metylacji” (np. strony: 55, 58, 59, 60, 83, 91, 93) zamiast „średnia (wartość) poziomu metylacji”, co w tabelach i wykresach jest opisane poprawnie. Powyższe określenie może być nieprawidłowo interpretowane jako podawany w innych częściach wyników pracy „niski, średni bądź wysoki poziom metylacji” w kwartylach. Powyższe nie mają jednak wpływu na ogólną pozytywną ocenę pracy doktorskiej.

Doktorantka osiągnęła zamierzone cele pracy, wykazała dobrą znajomość tematu i zdolność samodzielnego rozwiązania problemu naukowego. Oceniana praca wzbogaca literaturę naukową zarówno z dziedziny genetyki jak i ortopedii, stanowi oryginalny dorobek naukowy i spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Na tej podstawie mam zaszczyt prosić Wysoką Radę Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie mgr Małgorzaty Chmielewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku



Dr hab. n. med. Marcin Tyrakowski, prof. CMKP
Kierownik Kliniki Chorób Kręgosłupa i Ortopedii
Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie