



Dr hab. n. med. Agnieszka Bossowska, prof. UWM

Olsztyn, 18.04.2019

Katedra Fizjologii Człowieka

Wydział Lekarski Collegium Medicum

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr Martynty Modrzejewskiej zatytułowanej

„Wpływ pochodnych kwasu glutarowego oraz witaminy C na aktywność białek Tet zaangażowanych w proces aktywnej demetylacji DNA. Zmiany ilościowe modulatorów białek Tet w chorobach jelita grubego”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska miała odpowiedzieć na pytanie, czy metabolity przemian komórkowych, którymi są pochodne kwasu glutarowego (2-ketoglutaran i 2-hydroksyglutaran) oraz witamina C mogą wpływać na zmianę aktywności białek Tet, a precyzyjny monitoring zmian ilościowych wymienionych modulatorów może być wykorzystany jako wczesny wskaźnik przebiegu procesów chorobowych prowadzących do nowotworzenia.

Autorka podjęła się tego zadania badawczego prawidłowo stawiając poniższe cele pracy, którymi były:

1. Opracowanie, walidacja i optymalizacja chromatograficznych metod ilościowych służących do analiz poziomu 2-ketoglutaranu, L-, D-2-hydroksyglutaranu oraz witaminy C w matrycy biologicznej (osocze, mocz, homogenaty tkankowe).
2. Zmierzenie oraz porównanie poziomu wyżej wymienionych metabolitów komórkowych w badanym materiale biologicznym pobranym od pacjentów z różnymi chorobami jelita grubego.
3. Ocena wpływu zmierzonych metabolitów na aktywność białek Tet.
4. Ocena możliwości zastosowania ilościowych oznaczeń 2-ketoglutaranu oraz L-, D-2-hydroksyglutaranu w płynach ustrojowych, takich jak krew i mocz w charakterze markera





chorób jelit (w tym raka jelita grubego).

Przedłożona do oceny praca posiada typowy układ rozpraw doktorskich z kolejno ułożonymi rozdziałami: wstępem, założeniami i 4 celami pracy, materiałem i metodą, wynikami, dyskusją, wnioskami, piśmiennictwem oraz streszczeniem pracy w języku polskim i angielskim. Obejmuje 104 strony maszynopisu wraz z bardzo dobrze wykonanymi 24 rycinami (w tym 18 rycin kolorowych), które to ilustracje same w sobie stanowią cenny, wspaniale dokumentujący materiał. Dodatkowo dokumentację uzupełnia jedna przejrzysta tabela przedstawiająca dane literaturowe dotyczące stężeń 2-ketoglutaranu oraz 2-hydroksyglutaranu w różnym materiale klinicznym mierzonych przy użyciu różnych metod badawczych. Praca zawiera licznie cytowane piśmiennictwo (obejmujące 322 pozycje) – w przeważającej większości anglojęzyczne.

We *Wstępie* Doktorantka przedstawia szczegółowo aktualny stan wiedzy dotyczącej związków pomiędzy powstającymi w komórce metabolitami a aktywnością enzymów zaangażowanych w tworzenie modyfikacji epigenetycznych. Wyczerpująco przedstawione zostały zarówno czynniki (hipoksja czy niewydolność enzymów uczestniczących w regulacji poszczególnych reakcji w cyklu Krebsa) prowadzące do rozregulowania podstawowego metabolizmu komórki, jak i funkcja i mechanizm działania metabolitów (w tym 2-ketoglutaranu oraz 2-hydroksyglutaranu), które produkowane lub kumulowane w nadmiarze w komórce, jako efekt nieprawidłowego przebiegu procesów metabolicznych, mogą pośrednio wpływać na procesy transformacji nowotworowej poprzez hamowanie aktywności białek Tet, a co za tym idzie, za prawidłowy przebieg procesów aktywnej demetylacji DNA i histonów. Opisany został także bardzo szczegółowo sam mechanizm metylacji i aktywnej demetylacji DNA oraz funkcja białek Tet oraz witaminy C w tym procesie. Ostatnim elementem tej części pracy jest uzasadnienie wyboru modelu badawczego, który stanowili pacjenci z chorobami jelita grubego. Doktorantka wyjaśnia, że wybranie właśnie tego modelu badawczego umożliwi przeanalizowanie progresji zmian klinicznych od przewlekłych stanów zapalnych wywoływanych nieswoistymi zapaleniami jelit, poprzez łagodne zmiany rozrostowe do raka jelita grubego, którego inicjacja i progresja głównie spowodowana jest wieloletnią akumulacją zmian genetycznych i epigenetycznych związanych





z rozregulowaniem procesu metylacji DNA. Poruszane w tym rozdziale zagadnienia w sposób logiczny korespondują z podjętą przez Doktorantkę tematyką badawczą, a zapoznanie się z nimi ułatwia czytanie kolejnych części rozprawy.

Założenia i cel pracy precyzują pytania, na które Doktorantka chciałaby uzyskać odpowiedzi w trakcie przeprowadzania planowanych badań. Są one sformułowane jasno i ujmują problem, któremu poświęcona jest rozprawa w sposób całościowy.

W rozdziale *Material i Metody* opisany został podział pacjentów na grupy badane w zależności od rozpoznania klinicznego i potwierdzenia histopatologicznego, określono rodzaj oraz sposób pozyskiwania materiału badawczego oraz sposób mierzenia ilości metabolitów w pozyskanym materiale. W dalszej części tego rozdziału bardzo szczegółowo, krok po kroku, omówiono procedurę analizy ilościowej badanych metabolitów (2-ketoglutaranu i 2-hydroksyglutaranu) oraz witaminy C w materiale badawczym z wykorzystaniem techniki ultrasprawnej chromatografii cieczowej a także sposoby oceny ilościowej uzyskanych wyników.

W *Wynikach* Autorka zwięźle, ale wyczerpująco, opisała uzyskane rezultaty, które zgodnie korespondują z założonymi celami pracy. Należy podkreślić, że recenzowana rozprawa została przygotowana bardzo starannie pod względem graficznym, a zastosowane metody statystyczne nie pozostawiają jakichkolwiek wątpliwości interpretacyjnych. Dodatkowo część wyników przedstawionych w pracy, dotyczących między innymi zmian poziomu witaminy C w badanym materiale oraz jej wpływu na aktywność białek Tet, a także wpływ aktywności białek Tet na poziom produktów powstających w wyniku modyfikacji epigenetycznych 5-metylocytozyny w DNA, zostało opublikowanych w 3 oryginalnych publikacjach o łącznym współczynniku oddziaływania **Impact Factor** równym **16,308**.

Rezultaty badań zostały omówione i poddane dogłębnej analizie w rozdziale *Dyskusja*, który podzielono na szereg logicznie spójnych akapitów, co w znacznej mierze uporządkowało tę, na ogół najtrudniejszą do napisania, część pracy doktorskiej.

Rozprawę zamyka krótki rozdział *Wnioski*, w którym Autorka w sposób wyczerpujący odnosi się do postawionych celów pracy.





Reasumując należy stwierdzić, iż przedłożona do oceny rozprawa doktorska mgr Martyny Modrzejewskiej ma układ typowy dla rozpraw na stopień doktora nauk, napisana jest zwięźle, przejrzystie, poprawnym językiem polskim z bardzo staranną szatą graficzną, a zastosowana metodyka odpowiada wszelkim standardom obowiązującym w tego typu badaniach i nie wzbudza jakichkolwiek wątpliwości.

Aczkolwiek, z obowiązku recenzenta muszę jednak zwrócić uwagę na niedociągnięcia natury technicznej lub redakcyjnej, które co prawda w żaden sposób nie umniejszają wartości merytorycznej pracy, powinny jednak, moich zdaniem, zostać poprawione przed jej opublikowaniem. Uwagi te dotyczą między innymi:

- a) braku cytowania w tekście manuskryptu pozycji piśmiennictwa nr 140 (w rozdziale Wstęp str. 27)
- b) braku cytowania w tekście manuskryptu następujących rycin: w części Wstęp ryciny nr 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, i 9; w części Wyniki ryciny nr 13 oraz 15 i 16
- c) na stronie 33 manuskryptu w zdaniu „Można spodziewać się, że na wczesnych etapach ścieżki ząbkowanej mutacja *BRAF* up-reguluje IGFBP7 w ACF i MVHP (schemat str. 20)” – błędnie została podana strona, na której cytowany schemat się znajduje – powinna być str. 30. Sugeruję ujednolicenie cytowania użytych schematów i rycin w tekście manuskryptu poprzez podanie ich numeracji.
- d) niektóre skróty używane po raz pierwszy w tekście manuskryptu w rozdziale Wstęp np. ATP, CO₂, DNA, NADPH, AA, GLUTs czy GALT nie zostały wyjaśnione pełną nazwą. Być może dla większości czytelników ich znaczenie jest oczywiste, niemniej zgodnie z zasadą pisania prac naukowych, wszystkie skróty nazw użyte po raz pierwszy powinny być wyjaśnione pełną nazwą.
- e) brak wyjaśnienia skrótu 5-mCyt po raz pierwszy pojawiającego się w tekście manuskryptu. Pomimo że, użyty skrót został wyjaśniony w wykazie ważniejszych skrótów stosowanych w pracy na samym początku pracy, pojawiając się po raz pierwszy w tekście, także powinien być wyjaśniony
- f) w rozdziale Materiał i Metody należałoby uzupełnić informację dotyczącą czasu pozyskiwania próbek krwi od pacjentów





Podsumowując, pragnę jeszcze raz podkreślić, że przytoczone powyżej uwagi w żadnej mierze nie umniejszają wartości merytorycznej recenzowanej rozprawy doktorskiej, którą oceniam bardzo wysoko. Uważam także, iż przedłożona do oceny rozprawa doktorska w pełni odpowiada wymogom znowelizowanej ustawy o stopniach i tytule naukowym, dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum w Bydgoszczy o dopuszczenie mgr Martyny Modrzejewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę trafność wyboru tematu badań, wszechstronność podjętych założeń pracy oraz bardzo dobry warsztat badawczy Doktorantki, a także fakt, że niniejsza praca wykracza zdecydowanie poza ramy stawiane rozprawom doktorskim, wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.

dr hab. n. med. Agnieszka Bossowska, prof. UWM

