



Dr hab. Edyta Reszka, prof. IMP
Kierownik Zakładu Genetyki Molekularnej i Epigenetyki,
Instytutu Medycyny Pracy im. prof. dra med. J. Nofera w Łodzi

OCENA

**rozprawy doktorskiej mgr Martynty Modrzejewskiej pt.
„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.”,**

**wykonanej pod kierunkiem dr hab. Marka Foksińskiego, w Katedrze Biochemii Klinicznej,
Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja
Kopernika w Toruniu.**

Niewątpliwie interesujący, a zarazem unikalny temat badawczy, który podjęła Doktorantka w swojej dysertacji mieści się w bardzo szerokim zagadnieniu metabolizmu energetycznego organizmów heterotroficznych, pozyskujących energię z różnego rodzaju reakcji redoks w połączeniu z regulacją epigenetyczną. Zmiany w metabolizmie energetycznym są obecnie uważane za cechę charakterystyczną dla nowotworów, a wyniki badań tzw. przeprogramowania metabolicznego, oprócz dostarczania wciąż nowych informacji na temat podstawowych mechanizmów choroby nowotworowej, mogą mieć zastosowanie kliniczne. Przykładem może być tzw. efekt Warburga, obserwowany w komórkach nowotworowych, przeprogramowanych do glikolizy w warunkach tlenowych, z nadmiernym wychwytem glukozy, który z powodzeniem stosuje się w metodzie pozytonowej tomografii emisyjnej z zastosowaniem fluorodeoksyglukozy (FDG-PET).

Deregulacja metaboliczna może mieć tragiczne konsekwencje dla komórki, a zmiany w metabolizmie energetycznym zostały zidentyfikowane w wielu stanach chorobowych, w tym w nowotworach o różnej lokalizacji. Co istotne, jednym z najbardziej wyraźnych związków między metabolizmem energetycznym a nowotworami stanowią tzw. onkometabolity. Pani mgr Martyna Modrzejewska, realizując swoje badania w ramach doktoratu, zainteresowała się wybranymi metabolitami powstającymi w mitochondrialnym cyklu Krebsa oraz w alternatywnym szlaku ich dostarczania, czyli w reakcjach anaplerotycznych. Doktorantka skupiła się na analizie 2-ketoglutaranu oraz dwóch izomerów 2-hydroksyglutaranu: D-2-hydroksyglutaranu i L-2-hydroksyglutaranu. Strukturalne podobieństwo D-2-hydroksyglutaranu, L-2-hydroksyglutaranu, ale także pozostałych onkometabolitów, czyli bursztynianu i fumaranu, do 2-ketoglutaranu zapewnia im zdolność do konkurencyjnego hamowania dioksygenaz zależnych od 2-ketoglutaranu oraz Fe(II), dużej grupie enzymów w szerokim zakresie funkcji biologicznych. Należą do nich, m.in. hydroksylazy prolinowe (PHD1-3), hydroksylazy 5-metylocytozyny (TET 1-3, biorące swą nazwę od częstych translokacji między chromosomami 10 i 11, obserwowanych w nowotworach hematologicznych) i demetylazy histonowe lizyny zawierające domenę Jumonji C (KDM1-8). Oprócz wybranych onkometabolitów, Doktorantka podjęła się również analizy witaminy C jako potencjalnego modulatora aktywnej demetylacji DNA. Wiadomo bowiem, że egzogenna witamina C u człowieka, wskazywana jest jako kofaktor białek Tet, zwiększający ich aktywność katalityczną i zapewniających fizjologiczny poziom 5-hydroksymetylocytozyny oraz dalszych produktów jej utleniania.

Ośrodek Współpracujący z WHO





Od ponad 10 lat wiadomo, że mutacje (głównie somatyczne) określonych enzymów metabolizmu energetycznego na stałe przeprogramowują metabolizm komórek, prowadząc do nadmiernej syntezy onkometabolitów. W przypadku 2-hydroksyglutaranu, jego podwyższone stężenie wiąże się z mutacjami enzymów dehydrogenazy izocytrynianowej 1 i 2 (IDH1 i IDH2), które obserwowane są z największą częstością w glejakach, a także ostrej białaczce szpikowej, ale bardzo rzadko w nowotworach jelita grubego. Wiadomo, że zaburzenia syntezy 2-ketoglutaranu oraz dwóch izomerów 2-hydroksyglutaranu, obserwowane w innych typach nowotworów nie wynikają z mutacji. Niestety wciąż brakuje badań charakteryzujących odmienne powstawanie oraz funkcje D-2-hydroksyglutaranu i L-2-hydroksyglutaranu w komórkach prawidłowych i zmienionych nowotworowo. Stąd pani mgr Martyna Modrzejewska w swojej dysertacji podjęła się badań dotyczące stężenia 2-ketoglutaranu, L- i D-2-hydroksyglutaranu oraz witaminy C jako potencjalnych modulatorów aktywności katalitycznej białek Tet, z wykorzystaniem modelu chorób jelita grubego. Konsekwencją działania w/w modulatorów jest bowiem powstawanie modyfikacji epigenetycznych DNA, często obserwowanym w chorobie nowotworowej. Model ten wybrano ze względu na możliwość przeanalizowania progresji zmian klinicznych od przewlekłych stanów zapalnych, poprzez łagodne zmiany rozrostowe (polipy) do nowotworu.

Dysertacja Pani mgr Martyny Modrzejewskiej liczy 97 stron starannie przygotowanego maszynopisu, zawierającego teoretyczny wstęp, cele pracy, materiał i metody z analizą statystyczną, wynikami badań, dyskusją, wnioskami i piśmiennictwem w liczbie 322 publikacji, streszczeniem w języku polskim i angielskim; praca zawiera również kopię zgody lokalnej Komisji Bioetycznej. Część wyników dysertacji, została opublikowana w postaci 3 prac oryginalnych w wysokopunktowanych (IF oraz MNiSzW) czasopismach (poz. piśmiennictwa 235, 237 i 322), a Doktorantka jest pierwszym autorem lub współautorem.

Na uwagę zasługuje obszerny tematycznie i przedstawiony w bardzo interesujący sposób wstęp dysertacji pani mgr Martyny Modrzejewskiej, gdzie podejmuje się ona opisu zagadnień z zakresu metabolizmu energetycznego, charakterystyki 2-ketoglutaranu oraz dwóch izomerów 2-hydroksyglutaranu, a także dwóch pozostałych onkometabolitów, opisu metylacji i demetylacji DNA, opisu roli witaminy C, przedstawienia znaczenia mikrobiomu i kwasu masłowego w przewodzie pokarmowym, aby zakończyć wprowadzenie do dysertacji zwięzłym opisem chorób jelita grubego. Chciałabym podkreślić dużą erudycję Doktorantki i jej swobodę w opisywaniu trudnego i obszernego zagadnienia badawczego, którym się szczególnie zainteresowała. Jej autorska i jednocześnie logiczna wizja wstępu dysertacji widoczna jest m.in. w postaci tytułów wybranych podrozdziałów wstępu. Jednakże moim zdaniem, we wstępie lub dyskusji brakuje terminu „efekt Warburga”, który również wiąże się ściśle z zagadnieniem deregulacji metabolizmu energetycznego w komórkach nowotworowych.

Jak słusznie podkreśliła konieczność podjęcia niniejszej tematyki badawczej Doktorantka: „w literaturze brak jest wyników badań eksperymentalnych testujących możliwość zastosowania ilościowych oznaczeń 2-ketoglutaranu i 2-hydroksyglutaranu w osoczu czy moczu jako markera chorób jelit” (str. 94, streszczenie). Większość danych literaturowych odnoszących się do ilości glutaranów w płynach ustrojowych oparta jest na analizach półilościowych, często obarczonych dość dużą możliwością popełniania błędów analitycznych. Brak jest wiarygodnych informacji na temat bezwzględnej ilości tych metabolitów w analizowanym materiale biologicznym” (str. 37, cele). Stąd, na podkreślenie zasługuje zastosowanie przez Doktorantkę nowoczesnych metod analitycznych, wymagających dużego doświadczenia i wiedzy badawczej. Tak więc, do zrealizowania celów badawczych opracowano, zwalidowano oraz zoptymalizowano metody ilościowe do analiz poziomu metabolitów w osoczu, moczu oraz homogenatach tkankowych (fragment guza oraz margines chirurgiczny), z wykorzystaniem ultrasprawnej chromatografii ciekowej (UPLC) z detekcją UV

Ośrodek Współpracujący z WHO





(witamina C) oraz tandemową spektrometrią mas MS/MS (2-ketoglutaran oraz dwa izomery L- i D-2-hydroksyglutaranu).

Autorka dysertacji zaplanowała szczegółowo zakres prac badawczych i przedstawione założenia projektu ujęła w postaci 4 celów rozprawy doktorskiej, które przedstawiłabym krótko jako: 1) Opracowanie, walidacja i optymalizacja chromatograficznych metod ilościowych w matrycy biologicznej (osocze, mocz, homogenaty tkankowe); 2) Pomiar stężenia metabolitów; 3) Ocena wpływu zmierzonych metabolitów na aktywność białek Tet; 4) Ocena możliwości zastosowania ilościowych oznaczeń metabolitów w płynach ustrojowych w charakterze markera chorób jelit (w tym raka jelita grubego).

Z obowiązku usystematyzowania wiedzy, chciałabym zapytać Doktorantkę, czy znane jest jej zastosowanie kliniczne ilościowego oznaczania onkometabolitów w płynach ustrojowych, tkankach i komórkach nowotworowych w hodowli, w badaniach przesiewowych, diagnostyce i monitorowaniu pacjentów z wrodzonymi błędami metabolizmu energetycznego?

Realizując tak szeroko zakrojone badania, pani mgr Martyna Modrzejewska uzyskała wiele interesujących wyników, które następnie szczegółowo przedyskutowała z obszernymi danymi literaturowymi. I tym razem, podobnie jak we wstępie pracy doktorskiej, Doktorantka wykazała się dużą erudycją. Lektura dysertacji wskazuje niezbicie, że jest młodym badaczem stojącym już u progu dojrzałości, realizującym cele naukowe we właściwy sposób, nie naruszając podstawowych zasad pracy naukowej. Doktorantka wykazała cechy starannego i rzetelnego pracownika naukowego, który dba o wiarygodne przedstawienie wykonanych eksperymentów i uzyskanych wyników; i który perfekcyjnie opanował warsztat naukowy.

Przy tak profesjonalnej realizacji tematu rozprawy doktorskiej, trudno dopatrzeć się braków, uchybień, czy niedopowiedzeń, bo wszelkie kwestie merytoryczne oraz metodologiczne zostały przedstawione rzetelnie, szczegółowo i w sposób klarowny. Należy zauważyć, że dwa z najintensywniej badanych efektów onkometabolitów i witaminy C na funkcje komórek i podkreślane przez Doktorantkę w pracy doktorskiej, obejmują indukcję stanu pseudohipoksycznego i analizowaną przez nią regulację epigenetyczną, czyli aktywność białek Tet mierzonych pośrednio poprzez stężenie 5-hydroksymetylocytozyny. Z racji pełnego zgłębienia tematu badawczego, przy publikacji wyników badań sugeruję przedstawienie znaczenia witaminy A, działającej synergistycznie do witaminy C w regulacji białek Tet. Sugeruję również przedyskutowanie wyników badań, pominiętych przez Doktorantkę w zbiorze obszernego piśmiennictwa, a dotyczących znaczenia wybranych izomerów 2-hydroksyglutaranu w raku jelita grubego: Colvin H i wsp., 2016, Leisenfeld DB i wsp., 2016 oraz raku nerki: Shim EH i wsp., 2014.

Chciałabym podkreślić, że pani mgr Martyna Modrzejewska wykazała się umiejętnością prowadzenia dyskusji naukowej w sposób bardzo wnikliwy oraz wyciągania ze swoich badań wniosków; według mnie raczej odważnych i ambitnych, niż ostrożnych i wyważonych. Wyciąganie wniosków jest sprawą dość trudną i często spotykanym błędem u młodych badaczy jest przedstawianie jedynie wyników, jako konkluzji z przeprowadzonych badań. Doktorantka przedstawiła swoje wnioski w sposób bardzo oryginalny, co oceniam pozytywnie, chociaż część z nich przedstawia raczej hipotezy badawcze, nie poparte wykonanymi badaniami. Tak jest w przypadku przywoływanego w pierwszym wniosku/akapicie (str. 77) podjednostki α czynnika indukowanego hipoksją - HIF1 α , który przecież nie był analizowany przez doktorantkę. Określenia ujęte w cudzysłów, np. działanie „jednokierunkowe” D-2-hydroksyglutaranu i „rozproszone” L-2-hydroksyglutaranu są jak najbardziej zrozumiałe, chociaż przy publikacji wyników badań powinno być opisane w sposób nie budzący wątpliwości. Chciałabym prosić Doktorantkę o wyjaśnienie następującego wniosku: „Słaba korelacja pomiędzy zawartością 2-ketoglutaranu w guzie i tkance zdrowej może wskazywać na to, że

Ośrodek Współpracujący z WHO





wewnątrzkomórkowy poziom 2-ketoglutaranu jest zdeterminowany genetycznie” (str.78, akapit drugi).

Przytoczone z obowiązku recenzenta uwagi, w większości polemiczne, nie wpływają na pozytywną ocenę przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej. Pani mgr Martyna Modrzejewska wykonała żmudne, trudne technicznie i ciekawe badania, wymagające dużego zaangażowania zarówno w pracę laboratoryjną, wymagającą umiejętności stosowania nowoczesnych hybrydowych technik badawczych. Wykazała cechy starannego i rzetelnego pracownika naukowego dbałego o wiarygodną dokumentację szeroko zakrojonych badań i spostrzeżeń, a wykonanie pracy doktorskiej wymagało również dużej wiedzy na temat metabolizmu energetycznego oraz modulatorów procesów epigenetycznych w chorobach jelita grubego.

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska jest niewątpliwie oryginalna. Należy podkreślić, że pomysł i koncepcja pracy doktorskiej są pionierskie. Wciąż brakuje badań z wykorzystaniem materiału klinicznego, w których analizuje się rolę onkometabolitów i witaminy C jako potencjalnych modulatorów aktywnej demetylacji DNA, szczególnie w przypadku najczęściej występującego nowotworu, jaki jest rak jelita grubego. Wiadomo, że istnieje związek między onkometabolitami i dynamiką mitochondriów, co stanowi potencjalny ekscytujący obszar przyszłych badań oraz obszar do opracowania nowych strategii terapeutycznych, w celu zapewnienia większej skuteczności terapii nowotworowych. Zaprezentowane w pracy doktorskiej ilościowe wyniki modulatorów białek Tet wydają się szczególnie cenne w tym kontekście, skoro uzyskano je zwalidowanymi metodami analitycznymi.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska pani mgr Marty Modrzejewskiej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wnoszącego istotne, nowe treści do rozwoju nauki oraz wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki, a także jej umiejętność samodzielnego i odważnego prowadzenia pracy naukowej, tj. spełnia warunki określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytułach naukowych oraz o stopniach i tytułach w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami).

Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersyteut Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnioskuję do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy doktorskiej (wniosek w załączeniu).

Edyta Świdur

Łódź, 30 kwietnia 2019r.

Ośrodek Współpracujący z WHO

