SAMODZIELNA PRACOWNIA BIOLOGII MEDYCZNEJ
KATEDRY I ZAKŁADU TOKSYKOLOGII
UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE

p.o. kierownika: Dr hab. n. med. Agnieszka Korga-Plewko
20-090 Lublin, ul. Jaczewskiego 8b, tel. (081) 448 65 22

Lublin, 08.04.2020

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Pawła Koniecznego
pt.: *„Rola kinazy aktywowanej AMP (AMPK) w regulacji procesu przerzutowania komórek nowotworowych"*
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Marcina Majki
w Zakładzie Transplantologii
Katedry Immunologii Klinicznej i Transplantologii,
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Rak szyjki macicy to jeden z najczęściej występujących nowotworów u kobiet na świecie. Niestety Polska ma jeden z najwyższych wskaźników zachorowalności i umieralności w Europie. Przyczyna wysokiej śmiertelności tkwi przede wszystkim w zbyt późnej diagnozie, gdy choroba nowotworowa jest bardzo zaawansowana. Z tego powodu istnieje pilna potrzeba zarówno poprawienia efektywności działań profilaktycznych, jak i opracowania terapii skutecznych w zaawansowanych stadiach choroby.

W dobie niezwykle intensywnego testowania zarówno przez firmy farmaceutyczne jak i ośrodki akademickie nowych cząsteczek o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych potrzebne są nie tylko nowe pomysły na strukturę chemiczną tych związków, ale przede wszystkim nowe cele terapeutyczne. Przedłożona mi do oceny praca doskonale odpowiada na tę potrzebę, bo pomimo intensywnych badań w ostatnich latach, rola kinazy aktywowanej AMP (AMPK) w funkcjonowaniu komórek nowotworowych, nadal pozostaje zagadką. Sam Autor trafnie określa AMPK jako „miecz obosieczny" – z jednej strony wiadomo, że aktywacja tej kinazy hamuje główne procesy anaboliczne, które

utrzymują proliferację i wzrost komórek nowotworowych, ale z drugiej strony może im nadać plastyczność umożliwiającą przetrwanie w warunkach stresu metabolicznego, takiego jak niedotlenienie i niedobór glukozy, które są powszechnie obserwowane w szybko rosnących guzach. W niniejszej pracy Doktorant zgłębia zagadnienia związane z rolą AMPK w procesie progresji nowotworu, co jest ważne z punktu widzenia opracowywania nowych, bardziej skutecznych terapii zaawansowanych stadiów raka szyjki macicy.

Opracowanie ma układ typowy dla eksperymentalnych prac doktorskich i składa się z sześciu głównych rozdziałów: Wstęp, Cele projektu, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja oraz Wnioski. W pracy zawarto również wykaz cytowanego piśmiennictwa, streszczenie w języku polskim i angielskim, a także wykaz stosowanych skrótów.

Wstęp

Wstęp pracy nie jest zbyt obszerny, ale biorąc pod uwagę złożoną tematykę należy postrzegać to jako zaletę - w zwięzły i zrozumiały sposób Doktorant przedstawił w nim kluczowe informacje niezbędne do zrozumienia celu pracy jak również zastosowanego modelu i metod badawczych. W tej części Doktorant przedstawił najważniejsze informacje dotyczące zaburzeń metabolicznych w procesie kancerogenezy, dosyć szczegółowo przedstawił historię badań nad AMPK, budowę, mechanizmy regulujące aktywność AMPK oraz rolę tej kinazy w komórkach różnych rodzajów nowotworów. W ostatniej części wstępu Autor przedstawił najważniejsze z punktu widzenia tematyki pracy, informacje dotyczące molekularnych mechanizmów przerzutowania. To czego w mojej ocenie zabrakło we wstępie tej pracy to informacje nt. aktualnego stanu wiedzy o roli AMPK w komórkach raka szyjki macicy. Brak takich informacji może sugerować, że tego typu badania nie były dotychczas prowadzone, natomiast już pobieżna analiza publikacji w bazie PubMed wskazuje, że w ostatnich latach ten temat był podejmowany. Utrudnia to nieco ocenę poziomu nowatorskości niniejszej pracy doktorskiej.

Druga uwaga dotycz Ryciny 2-2 która przedstawia „Umiejscowienie AMPK w wewnątrzkomórkowej sieci szlaków metabolicznych" i jest niezwykle cenna dla zrozumienia prezentowanych treści, jednak w jej podpisie powinno znaleźć się odniesienie do pracy przeglądowej „Recent advances in the role of AMP-activated protein kinase in metabolic reprogramming of metastatic cancer cells: targeting cellular bioenergetics and biosynthetic pathways for anti-tumor treatment" w Journal of Physiology and Pharmacology, gdzie w niemal niezmienionej formie została wykorzystana już wcześniej. Nawet jeżeli

Doktorant jest współautorem tej publikacji, to prawa autorskie z wysokim prawdopodobieństwem zostały przekazane wydawnictwu.

Cel pracy

Cel pracy określony jest precyzyjnie, w skoncentrowanej formie jasno przedstawia koncepcję pracy i uzasadnia wykorzystane modele badawcze.

Materiały i metody

Na uwagę zasługuje mnogość wykorzystanych technik, w wielu przypadkach bardzo złożonych, tak jak te z zakresu modyfikacji genetycznych linii komórkowych. Świadczy to niewątpliwie o bogatym warsztacie naukowym pana mgr inż. Pawła Koniecznego. Paradoksalnie jednak to właśnie do tego rozdziału mam najwięcej uwag:

- moim najpoważniejszym zarzutem jest to, że część metod zastosowanych do uzyskania zaprezentowanych dalej wyników badań nie została opisana W rozdziale Materiały i metody zupełnie pominięto metody takie jak: ocena proliferacji zmodyfikowanych genetycznie komórek metodą MTS, oznaczenie wskaźników zużycia tlenu przez komórki, cytofluorymetryczna ocena indukcji apoptozy, badania wykonane na modelu mysim NOD-SCID oraz materiale klinicznym. W mojej ocenie braki są na tyle poważne, że uniemożliwiają ostateczną ocenę przedłożonej pracy. Szczególnie ubolewam nad brakiem opisu metody pomiaru zużycia tlenu. Jak wynika z podpisu ryciny obrazującej wyniki, oznaczenie było wykonane na aparacie Seahores, a jest to nowoczesne urządzenie, którym niewiele polskich laboratoriów może się pochwalić, niezwykle cenne w badaniach zmian metabolizmu komórek nowotworowych. Jeśli chodzi o badania na modelu mysim oraz na materiale klinicznym oprócz opisu metodyki brakuje informacji nt zgody odpowiednich komisji bioetycznych na przeprowadzenie tych badań. Pozwolę sobie również skomentować wybór metody do oceny proliferacji komórek. Jest to metoda oparta na redukcji związków tetrazoliowych i choć rzeczywiście wielu autorów, a nawet producentów testów, opisuje tego typu metody jako test na proliferację, warto popatrzeć na to nieco krytycznie. Jest szereg innych metod bezpośrednio oceniających proliferację komórek (np. metody wykorzystujące inkorporację znakowanych nukleotydów). Test MTS to w rzeczywistości ocena aktywności komórkowych dehydrogenaz NADPH-zależnych i dlatego raczej powinno się go używać do oceny żywotności komórek, a nie proliferacji.

- ocena ekspresji genów przy użyciu PCR w czasie rzeczywistym – jest to metoda bardzo powszechna i niezwykle cenna, ale podstawowym warunkiem uzyskania wiarygodnych wyników jest rzetelny wybór genu referencyjnego. Kluczowa z definicji jest niezmienna w warunkach doświadczenia ekspresja tego genu. Wybór genu dla enzymu glikolitycznego (GAPDH) w doświadczeniu które bazuje m.in. na deregulacji szlaków metabolicznych, na pierwszy rzut oka wydaje się nieuzasadniony. Nie podważam tutaj możliwości zastosowania GAPDH jako genu referencyjnego w ogóle, ale wybór ten powinien być potwierdzony empirycznie, a w opisie metodyki powinno się znaleźć uzasadnienie dla jego wyboru. W ostatnich latach pojawia się coraz więcej doniesień, że stosowane dotychczas bezkrytycznie geny (w tym geny metabolizmu podstawowego) często nie spełniają definicji referencyjności. Dlatego w każdym doświadczeniu gen referencyjny należy wybrać na podstawie rzetelnych badań własnych, bo od tego zależy wiarygodność analizy PCR w czasie rzeczywistym. Co więcej aktualnie rekomendowane jest używanie co najmniej dwóch genów referencyjnych.

- pomiar stężenia białka – faktem jest, że metoda Bradforda ze względu na swoją powszechność nie wymaga szczegółowego opisu, ale stwierdzenie, że metoda ta polega na „odczycie absorbancji przy długości fali 595 nm" to zbyt duże jak na pracę naukową uproszczenie.

- ostatnia uwaga z zakresu metodyki pracy dotyczy obliczeń statystycznych. Z wyjątkiem badań na modelu mysim, Doktorant podaje jedynie informacje, że analizowano wyniki z dwóch niezależnych powtórzeń. Można odnieść wrażenie, że analizy były prowadzone na dwóch wynikach w porównywanych grupach. Brakuje jasnej informacji dotyczącej wykonanej liczby powtórzeń oznaczeń w porównywanych grupach (liczba n). W tym miejscu pozwolę sobie również skomentować materiał kliniczny, w którym Doktorant oznaczał ekspresję AMPKα1 – to bardzo cenne, że próbki z guza pierwotnego oraz przerzutu do węzła chłonnego pochodziły od tej samej pacjentki, ale trudno jest wyciągać wiarygodne wnioski jeżeli przeanalizowano materiał pochodzący tylko od 3 pacjentek.

Wyniki

Pomimo złożoności zastosowanych modeli badawczych i mnogości technik, opis wyników jest spójny i jasny. Doktorant zilustrował wyniki szeregiem wykresów, rycin i mikrofotografii, które zdecydowanie ułatwiają lekturę tego rozdziału i zrozumienie uzyskanych rezultatów. Moje krytyczne uwagi dotyczą technicznych aspektów niektórych

mikrofotografii, które mogą być istotne przy publikacji wyników pracy doktorskiej. Na zdjęciach obrazu mikroskopowego brakuje skali. Na rycinie 5-3, fotografie komórek w jasnym polu są bardzo złej jakości, a na fotografiach komórek barwionych immunofluorescencyjnie pojawia się zielona poświata która może być wynikiem m.in. zbyt długiego czasu ekspozycji, albo niedostatecznego odpłukania barwnika. Podobne uwagi mam do zdjęć zielonej fluorescencji na ryc. 5-22. W opisie wyników prezentowanych na rycinie 5-3 Doktorant stwierdza że „uzyskane zdjęcia pozwalają doszukiwać się wyższej ekspresji GLUT-1 w linii HTB-35 – wyższa jasność zielonej fluorescencji". „Doszukiwanie się" to dosyć mało naukowe stwierdzenie, a w mojej ocenie wyższa jasność fluorescencji jest raczej wynikiem niedostatecznej jakości zdjęcia.

Dodatkowo Doktorant nie wyjaśnia dlaczego na ryc. 5-4, na zdjęciu membrany Western Blot widoczny jest podwójny prążek dla transportera GLUT-1 i jaki miało to wpływ na sposób pomiaru densytometrycznego. Zauważyłam również, pewien brak konsekwencji jeśli chodzi o prezentację wyników analizy PCR. W opisie metod zawarta jest informacja, że relatywną ekspresję genów obliczano przy użyciu metody „ΔΔCt", natomiast na wykresach obrazujących wyniki na osi y zamiast wartości RQ widzimy stosunek genu badanego do referencyjnego.

Dyskusja

Ten rozdział podsumowuje całość pracy od jej założeń badawczych poprzez uzyskane wyniki, aż do omówienia i interpretacji uzyskanych danych. Trzeba przyznać, że Doktorant sprawnie porusza się po gąszczu uzyskanych wyników, a dyskusja jest logiczna i spójna. Niemniej jednak, podobnie jak we wstępie zabrakło w mojej ocenie dyskusji z wynikami innych ośrodków dotyczącymi konkretnie raka szyjki macicy. Doktorant powołuje się w zasadzie tylko na jedną pracę (Wingo i wsp.), a według mojej analizy piśmiennictwa takich prac jest zdecydowanie więcej.

W ostatnim akapicie dyskusji Doktorant stwierdza, że „AMPK można zdecydowanie postrzegać jako marker prognostyczny". Mam pewną wątpliwość, czy zastosowane w pracy modele uprawniają do tak kategorycznego wniosku. Natomiast cenne na pewno byłoby odwołanie się w tym miejscu do prac innych autorów, którzy oceniali wartość ekspresji/aktywności AMPK jako markera prognostycznego w raku szyjki macicy na obszernym materiale klinicznym (Choi i wsp. 2015).

Zarówno we wstępie jak i w dyskusji Autor zwraca uwagę na różną, często przeciwstawną rolę AMKP w komórkach różnych typów nowotworów. Doskonale wiadomo, że nowotwory złośliwe to niezwykle heterogenny zbiór różnych jednostek chorobowych i najczęściej nie jest możliwe formułowanie uniwersalnych stwierdzeń prawdziwych dla wszystkich nowotworów. Z tego względu uważam, że w tytule pracy doktorskiej Autor powinien uwzględnić, że badania dotyczą konkretnie raka szyjki macicy

Wnioski

Podsumowanie uzyskanych wyników Doktorant przedstawił w postaci 10 wniosków. Moją wątpliwość budzi jedynie wniosek 9 dotyczący roli AMPK jako potencjalnego markera prognostycznego, co zostało omówione powyżej. Pozostałe wnioski znajdują odzwierciedlenie w uzyskanych wynikach.

Piśmiennictwo

Pracę zamyka piśmiennictwo, zawierające 159 pozycji. Piśmiennictwo, prawie wyłącznie anglojęzyczne, jest aktualne i prawidłowo uporządkowane.

Na koniec zwracam uwagę na drobne niedociągnięcia edytorskie, które zostały już wychwycone, być może przez samego Doktoranta, ponieważ większość z nich została zaznaczona ołówkiem w kopii pracy przedłożonej mi do oceny. Przed publikacją wyników badań należy poprawić brak indeksów górnych w pisowni wykładników potęg przy liczbie wysiewanych komórek czy zapisie $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Chciałam również zwrócić uwagę na błąd w ostatnim akapicie wstępu pracy doktorskiej, w którym Doktorant pisze że najbardziej onkogenne typy wirusa HPV to typ 16 i 17 – w tym przypadku błąd, najprawdopodobniej edytorski, stał się błędem merytorycznym.

Większość powyższych uwag nie umniejsza jakości i wartości poznawczej niniejszej pracy i mogą być one przedmiotem dyskusji podczas publicznej obrony. Doktorant przeprowadził oryginalne badania i zrealizował postawione cele w bardzo pożądanym obszarze wiedzy i z pewnością podejmie próbę publikacji uzyskanych wyników. Niemniej jednak biorąc pod uwagę omówione wyżej poważne braki w opisie metodyki badań, w oparciu o rozporządzenie MNiSW z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim (Dz. U. 2018, poz. 261) wnoszę o uzupełnienie rozprawy doktorskiej w takim zakresie, który umożliwi

sformułowanie konkluzji recenzji i pozwoli stwierdzić, że praca doktorska pana mgr inż. Pawła Koniecznego w pełni odpowiada wymaganiom ustawy z dnia 14 marca 2003r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2017, poz. 1789)

p.o. KIEROWNIKA
Samodzielnej Pracowni Biologii Medycznej
Katedry i Zakładu Toksykologii
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
Agnieszka Korga-Plewko
Dr hab. n. med. Agnieszka Korga-Plewko