



**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Skalskiej-Bugały  
p.t. „Analiza produktów aktywnej demetylacji DNA w moczu pacjentów  
z rakiem jelita grubego oraz ostrą białaczką szpikową”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa powstała pod kierunkiem dr hab. n. med. Rafała Różalskiego, profesora UMK, na Wydziale Farmaceutycznym Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Celem opisanych w rozprawie badań było opracowanie wiarygodnej, powtarzalnej metody ilościowej analizy modyfikacji epigenetycznych, a zwłaszcza produktów aktywnej demetylacji DNA, w łatwo pozyskiwanym materiale biologicznym – moczu i komórkach krwi oraz zweryfikowanie jej wartości prognostycznej u pacjentów z ostrą białaczką szpikową lub z rakiem jelita grubego.

Rozprawa ma postać cyklu czterech publikacji z elementami dodatkowymi. Dwie pierwsze publikacje to rozdziały książki *DNA modifications. Methods and protocols* z 2021 r. należącej do serii *Methods in molecular biology* wydawnictwa Springer, a dwie pozostałe to prace oryginalne opublikowane w *Cells* oraz *International Journal of Molecular Sciences* w 2022 r. Doktorantka jest pierwszą autorką jednej publikacji metodologicznej oraz obydwu prac oryginalnych i drugą autorką w drugiej publikacji metodologicznej, co wskazuje na jej kluczową rolę w realizacji projektu będącego podstawą rozprawy doktorskiej.

Publikacje uzupełniono o:

- Spis treści,
- Wykaz skrótów,
- Wstęp,
- Cele pracy,
- Krótkie wprowadzenie do każdej publikacji,
- Podsumowanie,
- Wnioski,
- Oświadczenia współautorów zawierające opis ich wkładu merytorycznego w powstanie publikacji,

- Streszczenia w języku polskim i angielskim,
- Spis literatury,
- Opinie Komisji Bioetycznych.

Rozprawa jest starannie napisana i zawiera niewiele błędów edytorskich. W zasadzie jedynym istotnym edytorskim problemem jest wielokrotne wyjaśnianie skrótów.

We **Wstępie** omawiane są wybrane aspekty epigenetyki, naprawy DNA, nieprawidłowości epigenetycznych w wybranych typach nowotworów oraz techniki oznaczania zmodyfikowanych zasad DNA i nukleozydów w moczu. Opisy dotyczące metylacji i demetylacji DNA oraz enzymów biorących udział w tych procesach i opisy szlaków naprawy DNA zaangażowanych w usuwanie modyfikacji powstających w procesie aktywnej demetylacji są wyczerpujące. Podobnie, wystarczająco szczegółowe są opisy nieprawidłowości epigenetycznych w nowotworach układu krwiotwórczego i raku jelita grubego. Ciekawy jest też krótki opis metod wykorzystywanych do oznaczania ilości zmodyfikowanych zasad DNA i nukleozydów w moczu. Na tym tle zbyt uproszczony wydaje się być opis epigenetyki jako takiej (1.1. Epigenetyka – definicja), który ponadto zawiera nieścisłości. Na przykład, w rzeczywistości definicja epigenetyki nie obejmuje niekodujących cząsteczek RNA; modyfikacje epigenetyczne są kluczowe dla nie wspomnianego różnicowania. Uproszczenia to np. stwierdzenie, że Dnmt3a i Dnmt3b przeprowadzają metylację *de novo* podczas rozwoju organizmu, podczas gdy dzieje się to nie tylko na tym etapie życia osobniczego. Brak jest informacji, że nie tylko metylacja, ale również produkty demetylacji, zwłaszcza 5-hydroksymetylocytozyna, mają udowodnioną aktywną rolę w regulacji transkrypcji. Za zrozumiałe samo przez się Doktorantka potraktowała współdziałanie TET2 z CXXC4, podczas gdy zdanie znajdujące się na końcu strony 10 powinno być uzupełnione wyjaśnieniem, na czym polega i dlaczego ich współdziałanie jest konieczne do katalitycznej aktywności TET2. Dodatkowo, referencje 30-32 nie dotyczą TET2. W opisie modyfikacji epigenetycznych w chorobach nowotworowych są również nieścisłości: Doktorantka pisze o genach białek TET2, podczas gdy znany jest jeden gen *TET2*, który faktycznie ma alternatywne promotory (Lou et al., *Front. Cell Dev. Biol.* 2019;7:99), ale nadal jest to jeden gen. Kilukrotnie (wstęp i podsumowanie) powtórzono frazę „hipermetylacja promotora wysp CpG / hipermetylacja regionów promotorowych wysp CpG”. Wyspy CpG nie mają swoich promotorów; jest odwrotnie – kilkadziesiąt procent promotorów posiada wyspy CpG. Wreszcie, stwierdzenie, że „w AML mutacje *IDH1/2* i *TET2* wykluczają się wzajemnie” sugeruje, że istnieje mechanistyczny powód, by nie mogły zaistnieć jednocześnie. Twierdzenie to oparte jest o analizę przypadków AML opisaną w publikacji z 2010 r., gdzie nie stwierdzono współwystępowania takich mutacji. Nie oznacza to jednak, że nie jest to możliwe. W takich sytuacjach proponowałabym

stosowanie mniej radykalnych stwierdzeń. Podsumowując, w mojej opinii Wstęp jest wystarczający, ale jest jednocześnie najłabszą częścią tej bardzo dobrej rozprawy.

**Cele pracy** są jasno sformułowane.

**Publikacje** wraz z opisami są z kolei najmocniejszą stroną rozprawy. Połączenie publikacji metodologicznych z publikacjami opisującymi praktyczne zastosowanie opracowanej metodologii stanowi wybitny przykład kompleksowego podejścia do tematu. W **publikacji 1** p.t. *Preparation of internal standards for 2D-UPLC-MS/MS quantification of noncanonical DNA bases*, w której Doktorantka jest drugą autorką, opisana jest metoda syntezy wzorców wewnętrznych znakowanych stabilnymi izotopami dla oznaczanych w płynach ustrojowych epigenetycznych modyfikacji DNA. Dodanie do próbek kontroli wewnętrznej – znakowanego wzorca, różniącego się od badanego związku tylko składem izotopowym i w związku z tym – masą cząsteczkową, ale nie strukturą lub innymi właściwościami, pozwala na selektywne i precyzyjne oznaczanie ilości związku natywnego. Publikacja zaopatrzona jest w klarowne schematy i przykładowe chromatogramy oraz tabele i bardzo szczegółowy opis kolejnych etapów syntezy, umożliwiając czytelnikowi samodzielne przygotowanie takich kontroli, co może być konieczne w przypadku ich komercyjnej niedostępności lub zbyt wysokiej ceny. Wytworzone wzorce zostały wykorzystane przez Doktorantkę i współautorów w metodzie zautomatyzowanej dwuwymiarowej ultrasprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (2D-UPLC-MS/MS) opisanej w **publikacji 2** p.t. *MS analysis of DNA modifications in urinary/body fluids*, której Doktorantka jest pierwszą autorką. Metoda ta łączy wstępne oczyszczanie próbki metodą chromatograficzną z właściwą analizą chromatograficzną, do której trafia tylko wybrany fragment rozdziału z pierwszego etapu, zawierający analizowany związek. W publikacji 2 opisano metodę optymalizacji warunków rozdziału i detekcji w moczu epigenetycznych modyfikacji DNA takich jak 5-hydroksymetylocytozyna, 5-formylocytozyna i 5-karboksycytozyna oraz nukleozydów 8-okso-2'-deoksyguanozyna, 5-metyl-2'-deoksycytydina, 5-hydroksymetylo-2'-deoksycytydina i 5-hydroksymetylo-2'-deoksyurydina. Również i ta publikacja zawiera przykładowe chromatogramy oraz szczegółowe tabele i dokładne opisy kolejnych etapów analizy. Jako osoba bez kierunkowego wykształcenia w dziedzinie biochemii nie mogę ocenić samej metody, ale jestem przekonana, że byłabym w stanie, posiłkując się publikacją, analizę wykonać. Natomiast bardzo doceniam publikacje, których Doktorantka jest pierwszą autorką, opisujące efekty wykorzystania opracowanej metody do analizy ilościowej produktów aktywnej demetylacji DNA w moczu osób cierpiących na choroby układu krwiotwórczego – zespoły mielodysplastyczne (MDS) i ostrą białaczkę szpikową (AML) oraz choroby jelit – nieswoiste zapalenie jelit (IBD, obejmujące chorobę Crohna i wrzodziejące zapalenie jelita

grubego), gruczolaki (AD) i raki jelita grubego (CRC). We wstępie **publikacji 3** p.t. *Diagnostic and prognostic power of active DNA demethylation pathway intermediates in acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndromes* Doktorantka między innymi wskazuje, że mutacje genów związanych z metylacją i demetylacją DNA (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1* i *IDH2*) są częste u pacjentów z MDS i AML, co znacząco wpływa na poziom i profil metylacji DNA. Dodatkowo, często opisuje się spadek ekspresji *TET2* w tych schorzeniach. Dlatego też przyjęto racjonalne założenie, że ilość produktów aktywnej demetylacji DNA w moczu pacjentów, które znajdują się tam wskutek działania mechanizmów naprawy uszkodzonego DNA (elementy „wycięte” i uwolnione z DNA), może wykazywać związek z tymi chorobami i stopniem ich zaawansowania, co mogłoby z kolei być wykorzystane do diagnostyki i prognozowania przebiegu choroby. W tym celu przeanalizowano poziomy 5-mCyt, 5-fCyt, 5-caCyt, 5-hmUra, 5-mdC, 5-hmdC, 5-hmdU, 8-oksydG i 5-hmUra, po skorygowaniu ich względem poziomu kreatyniny. Najwyższe poziomy produktów demetylacji DNA stwierdzono w moczu pacjentów z AML. Wykorzystując odpowiednie metody statystyczne wykazano, że MDS od zdrowej grupy kontrolnej najlepiej odróżniał 5-hmCyt w moczu i 5-hmdC w DNA komórek jądrazstych krwi obwodowej, zaś AML od zdrowej grupy kontrolnej – poziom 5-hmCyt i 5-hmdU w moczu. Transformację MDS do AML najlepiej przewidywał poziom 5-cadC i 5-hmdU w DNA komórek jądrazstych krwi. Znalaziono również korelacje pomiędzy wynikami analiz cytogenetycznych a niektórymi modyfikacjami DNA. Doktorantka i współpracownicy konkludują, że produkty szlaku aktywnej demetylacji DNA oznaczane w moczu lub w DNA komórek jądrazstych krwi mogą być przydatne w diagnostyce MDS i AML. Z kolei w **publikacji 4** p.t. *Urinary measurement of epigenetic DNA modifications and 8-oxodG as possible noninvasive markers of colon cancer evolution* analizowano ilość produktów aktywnej demetylacji DNA w moczu pacjentów z rakiem jelita grubego oraz schorzeniami predysponującymi do tej choroby – nieswoistymi zapaleniami i gruczolakiem, również po skorygowaniu względem stężenia kreatyniny. Mam drobną uwagę do wstępu publikacji 4 – mianowicie stwierdzenie „Thus, using a recently developed, most reliable 2D-UPLC-MS/MS technique, we focus on the role of DNA epigenetic modifications in urine, in colon cancer development.” wydaje mi się nieprawidłowe, bo analiza ilości modyfikacji epigenetycznych w moczu nie jest równoznaczna z badaniem ich roli/funkcji (*role*) w rozwoju raka, natomiast może być powiązana (*associated with*) z rakiem. Założenia pracy były podobne, jak w publikacji 3. U pacjentów z CRC i AD zaobserwowano istotnie niższy poziom 5-fCyt w moczu niż u zdrowej grupy kontrolnej, u chorych z CRC i IBD – istotnie wyższy poziom 8-oksydG. Ponadto, w moczu pacjentów z rakiem stwierdzono wyższy niż u kontroli poziom 5-hmCyt. Na podstawie tych oraz innych wyników, Doktorantka i współpracownicy wnioskują, że poziom 5-fCyt, 5-hmCyt i 8-oksydG w moczu mogą być nieinwazyjnymi biomarkerami rozwoju raka jelita grubego.

**Podsumowanie** łączy w całość opisane w publikacjach 1-4 wyniki oraz przypomina i w sposób syntetyczny łączy najważniejsze elementy dyskusji. W tej przyjaznej odbiorcy części rozprawy zabrakło mi jednak ważnego z medycznego punktu widzenia elementu – mianowicie przedyskutowania problemu specyficzności wyników uzyskanych w badaniach opisanych w publikacjach 3 i 4. Produkty pośrednie aktywnej demetylacji DNA oraz inne modyfikacje epigenetyczne w moczu, jak również kierunki zmian w ich ilości, najprawdopodobniej nie są charakterystyczne jedynie dla konkretnego typu nowotworu. Czy w takiej sytuacji faktycznie mogą być nieinwazyjnymi markerami AML lub CRC lub stopnia ich zaawansowania? Czy można je oceniać samodzielnie czy raczej w powiązaniu z wynikami innych badań diagnostycznych? Może raczej są uniwersalnymi biomarkerami nowotworów? Czy mogą być biomarkerami innych schorzeń? A co ze związanymi z wiekiem zmianami w epigenomie i w związku z tym potencjalnymi zmianami metabolitów pośrednich demetylacji w moczu? Chętnie wysłucham opinii Doktorantki na ten temat podczas obrony.

**Wnioski** są prawidłowo sformułowane.

W **Literaturze** w mojej opinii znajduje się zbyt dużo publikacji przeglądowych.

Inne elementy rozprawy nie wymagają omówienia.

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Aleksandry Skalskiej-Bugały zawiera oryginalne, wartościowe wyniki, które uzyskano stosując poprawną metodologię. Rozprawa całkowicie spełnia warunki ustawowe dotyczące oryginalności problemu naukowego, wiedzy Doktorantki oraz umiejętności prowadzenia badań. Dlatego pozwalam sobie **wnioskować do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne w Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie mgr Aleksandry Skalskiej-Bugały do dalszych etapów przewodu doktorskiego.** Zgodnie z Uchwałą w sprawie wyróżnień rozpraw doktorskich w dyscyplinie nauki farmaceutyczne na Wydziale Farmaceutycznym Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, wniosek o wyróżnienie rozprawy przedstawiam w osobnym dokumencie.

Z wyrazami szacunku,



Warszawa, 10.08.2023