

Prof. dr hab. n. farm. Bolesław T. KARWOWSKI

Łódź, 25-VIII-2023 r.

Zakład Bromatologii UM w Łodzi

ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź

tel. +48 722 220 711

e-mail.: [Boleslaw.Karwowski@umed.lodz.pl](mailto:Boleslaw.Karwowski@umed.lodz.pl)

## RECENZJA

### rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Skalskiej-Bugały

Magister Aleksandra Skalska-Bugała wykonała swoją pracę doktorską, pt. *Analiza produktów aktywnej demetylacji DNA w moczu pacjentów z rakiem jelita grubego oraz ostrą białaczką szpikową*, na Wydziale Farmaceutycznym *Collegium Medicum* w Bydgoszczy (Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu) pod kierunkiem Pana Profesora UMK dr hab. n. med. Rafała Różalskiego. Tematyka przedstawionej rozprawy doktorskiej jest bezpośrednią kontynuacją oraz rozwinięciem prac naukowo-badawczych prowadzonych od wielu lat w Katedrze Biochemii Klinicznej. Należy podkreślić, iż praca została wykonana pod kierunkiem i opieką Promotora, który posiada ugruntowaną pozycję naukową w badaniach nad oceną stresu oksydacyjnego oraz analizą produktów naprawy uszkodzeń DNA wydalanych z moczem, o czym świadczą liczne publikacje w czasopismach o międzynarodowym zasięgu. Powyższe umożliwiło Pani Magister wykonanie i późniejsze napisanie recenzowanej pracy doktorskiej w oparciu o uzyskane wyniki badań prowadzonych w/w Jednostce.

Podstawę recenzowanej rozprawy doktorskiej stanowią cztery publikacje o międzynarodowym zasięgu. Wyniki prac zostały zaprezentowane w układzie edytorskim stosownym dla rozpraw doktorskich opartych na cyklu publikacji, zawierającym:

- wykaz skrótów stosowanych w dalszej części tekstu,
- wstęp, będący wprowadzeniem teoretycznym do dalszej części rozprawy,
- cele pracy,
- omówienie publikacji stanowiących podstawę rozprawy, wraz z załączonymi ich kopiami,
- podsumowanie, stanowiące zwięzłą prezentację osiągnięć badawczych,

– wnioski, stosowne oświadczenia współautorów publikacji, streszczenie, abstrakt oraz obszernie aktualne piśmiennictwo (189 pozycje) stosowane w dysertacji.

Recenzowana praca zawiera adekwatną i dobrze dobraną ilość rysunków, schematów oraz tabel, które we właściwy sposób prezentują omawiane dane naukowe.

Ze względu na złożoność tematyki pracy, jak i różnorodność zadań badawczych, podjąłem decyzję o omówieniu i merytorycznej ocenie dysertacji zgodnie z jej chronologicznym układem.

### **Wstęp (Część teoretyczna)**

Na 26 stronach tej części dysertacji Autorka przedstawiła zwięźle i merytorycznie współczesne problemy związane z stanami patologicznymi indukowanymi przez dysfunkcję procesów metylacji/demetylacji materiału genetycznego. W tej części został uwzględniony zarówno wpływ stresu oksydacyjnego na powstawanie zmian w informacji genetycznej, jak również przedstawiono znaczenie stosownych białek zaangażowanych w systemy naprawcze DNA, zarówno BER, NER, jak i MMR oraz konsekwencje wynikające z zaburzeń ich prawidłowego funkcjonowania. Dalsza część wstępu poświęcona jest chorobom nowotworowym, których podłoża molekularnego można upatrywać w zmianach epigenetycznych związanych z w/w procesami metylacji zasad nukleinowych. Uwaga Pani Magister skoncentrowana została na dwóch jednostkach chorobowych, t.j.: raku jelita grubego oraz ostrej białaczce szpikowej. Należy podkreślić, że ten wybór jest niezwykle trafny, w ujęciu społecznym obydwie nowotwory związane są bezpośrednio z procesami starzenia się społeczeństwa oraz niewłaściwym stylem życia (aktywność fizyczna, stosowana dieta). Tą część pracy kończy przejrzyste napisany podrozdział poświęcony technikom identyfikacji uszkodzeń DNA, ze szczególnym uwzględnieniem spektrometrii mas sprzężonej z wysokosprawną chromatografią cieczą.

Kolejną część rozprawy doktorskiej stanowi omówienie czterech celów pracy tworzących chronologiczną całość:

1. Synteza wzorców wewnętrznych znakowanych stabilnymi izotopami dla metylowanych pochodnych cytozyny;
2. Optymalizacja warunków rozdzielania i detekcji epigenetycznych modyfikacji DNA oraz 7,8-dihydro-8-okso-2'-deoksyguanozyny przy użyciu 2D-UPLC-MS/MS;

3. Ocena wartości diagnostycznej i prognostycznej produktów aktywnej demetylacji DNA w ostrej białaczce szpikowej oraz u pacjentów z zespołami mielodysplastycznymi;

4. Analiza produktów aktywnej demetylacji DNA oraz 8-okso-dG w moczu jako potencjalnych biomarkerów rozwoju raka jelita grubego.

Powyższe punkty stały się podstawą czterech publikacji naukowych, w których Pani Aleksandra Skalska-Bugała jest pierwszym autorem lub autorem równorzędnym z pierwszym.

Prace te zostały ocenione pozytywnie przez niezależnych recenzentów będących, jak sądzę, specjalistami w dziedzinie i nie wymagają dalszej mojej oceny. Natomiast na uznanie zasługuje otrzymanie przez Autorkę, na drodze syntezy chemicznej, znakowanych nukleozydów do dalszych badań, w których zostały one wykorzystane jako wzorce wewnętrzne. Pozwoliło to Pani Magister na opracowanie i optymalizację 2D-UPLC-MS/MS metody oznaczania ilościowego 5-hmCyt, 5-fCyt, 5-caCyt oraz nukleozydów 8-oksydG, 5-mdC, 5-hmdC i 5-hmdU w moczu pobranym od osób podlegających badaniom (zgody stosownych Komisji Bioetycznych zostały zamieszczone). Związki te zostały wyselekcjonowane, ponieważ komórki nowotworowo zmienione wykazują zwiększoną metylację w porównaniu do komórek prawidłowych, co jest związane z defektami białek, takich jak: DTG, TET, IDH, *etc.* Przyjmuje się, iż 30% przypadków klinicznych MDS ulega konwersji w czasie do AML, ze względu na powyższe przeprowadzone badania stanowią istotną wartość poznawczą, a w przyszłości być może również diagnostyczną. Podobny zakres prac został wykonany w kierunku różnicowania nowotworów, gruczolaków i nieswoistej choroby zapalnej jelita grubego. Ze względu na stale rosnącą ilość diagnozowanych przypadków nowotworów CRC, związanych z brakiem aktywności fizycznej i niewłaściwą dietą (żywność wysokoprzetworzona) nieinwazyjne metody diagnostyczne, inne niż kolonoskopia połączona z następczą histopatologią, są wysoko pożądane. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki prac wykazały zmiany w aktywności enzymów biorących udział w naprawie DNA, jak i w procesach ratowania nukleotydów na podstawie analizy materiału (mocz) pobranego od probantów zdrowych oraz ze zdiagnozowanym: IBD lub CRC, lub AD.

Po przeanalizowaniu przedstawionego w formie dysertacji materiału nasunęły mi się cztery zagadnienia, dotyczące części teoretycznej i badawczej, a nieuwzględnione w kolejnych etapach dyskusji:

- 1) Brak jest, według mnie, w części teoretycznej omówienia mitochondrialnych mechanizmów naprawy DNA oraz brak omówienia mechanizmu usuwania uszkodzeń DNA przez glikozylazy dwufunkcyjne.
- 2) W przypadku omawiania poziomów metylowanych cytozyn Autorka nie podaje ich poziomów w innych komórkach zmienionych nowotworowo.
- 3) W recenzowanym tekście nie odnalazłem informacji o wadach stosowania GC MS/MS w oznaczaniu uszkodzeń DNA.
- 4) Doktorantka powinna moim zdaniem zwrócić uwagę również na efekt izotopowy w kontekście reakcji enzymatycznych.

**Podsumowując:** przedstawioną rozprawę doktorską pt. *Analiza produktów aktywnej demetylacji DNA w moczu pacjentów z rakiem jelita grubego oraz ostrą białaczką szpikową* cechuje zwięzłość w jej części teoretycznej. Dzięki syntetycznemu przedstawieniu problemu badawczego, możliwe było zaprezentowanie na 122 stronach tekstu dużej ilości wielokierunkowych badań. Sposób prezentowania badań naukowych w dysertacji potwierdza, iż Doktorantka dysponuje odpowiednią wiedzą z zakresu: uszkodzeń i biochemii kwasów nukleinowych (włącznie z mechanizmami ich naprawy), chemii organicznej oraz analitycznej. Pod względem edytorskim praca zawiera drobne błędy, niemające wpływu na jakość prezentowanych wyników, n.p.: nazwy obcojęzyczne powinny być zapisane kursywą, wykaz skrótów jest niepełny.

Po zapoznaniu się z przedstawioną dysertacją stwierdzam, iż Pani mgr Aleksandra Skalska-Bugała wykonała i przedstawiła dobrą rozprawę doktorską. Ze względu na powyższe wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Skalskiej-Bugały do dalszych etapów związanych z przewodem doktorskim.

Praca spełnia warunki określone w artykule 187 ustęp 1 i 2 Ustawy z dnia 20 Lipca 2018 r, Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. 2023 poz. 742.)

