



UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W
POZNANIU

KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII FARMACEUTYCZNEJ

ul. Święcickiego 4
60-781 Poznań

tel. 061 8546620
fax 061 8546620

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Skalskiej-Bugały
pt. *Analiza produktów aktywnej demetylacji DNA*
w moczu pacjentów z rakiem jelita grubego oraz ostrą białaczką szpikową
wykonanej w Katedrze Biochemii Klinicznej Collegium Medicum w Bydgoszczy,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
pod kierownictwem dr. hab. Rafała Różalskiego, prof. UMK

Recenzja pracy doktorskiej mgr Aleksandry Skalskiej-Bugały została przygotowana w odpowiedzi na powierzenie mi obowiązków recenzenta przez Radę Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Collegium Medicum w Bydgoszczy uchwałą nr 68 z dnia 26 czerwca 2023 roku. Rozprawę stanowi cykl czterech artykułów opublikowanych w latach 2021 - 2022 w renomowanych wydawnictwach. Opisane w rozprawie badania zostały przeprowadzone w ramach realizacji projektów badawczych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki (nr 2013/09/B/NZ5/00767; 2015/17/B/NZ5/00640; 2015/19/B/NZ5/02208; 2017/27/B/NZ7/01487). Układ rozprawy jest właściwy dla pracy doktorskiej na podstawie cyklu publikacji, choć przydatne byłoby uwzględnienie krótkiego biogramu obejmującego opis dotychczasowej aktywności naukowej Doktorantki.

Aktywna demetylacja zasad azotowych od kilkunastu lat stanowi przedmiot interesujących badań w aspekcie funkcjonalnego znaczenia modyfikacji DNA w regulacji komórkowej w stanach prawidłowych i patologicznych, a wiedza z tego zakresu może przyczynić się m.in. do identyfikacji markerów stanów chorobowych, szczególnie nowotworów. Wiedza naukowa na ten temat jest wciąż niepełna, co uzasadnia kierunek badawczy obrany przez doktorantkę. We wstępie teoretycznym doktorantka przedstawiła podstawowe, niezbędne informacje na temat zjawisk epigenetycznych, procesu aktywnej demetylacji DNA, a także profilu zmian epigenetycznych obserwowanych w nowotworach

jelita grubego i ostrej białaczce szpikowej, które stanowiły podstawę do wyprowadzenia celów badawczych. Z poważnych uchybień zwróciła moją uwagę bardzo niezręczna i wprowadzająca w błąd kalka z języka angielskiego na stronie 22 (i ponownie na stronie 117): „...hipermetylacją promotora wysp CpG...” (zapewne od ang. „promoter CpG island”) zamiast prawidłowego sformułowania - „hipermetylacją wysp CpG w promotorach genów”.

Ze względu na niedobór wystandaryzowanych, czułych i specyficznych metod oznaczania różnych modyfikowanych zasad azotowych i nukleozydów, pierwsze dwa cele pracy obejmowały rozwój i optymalizację chromatograficznej techniki ilościowej oceny modyfikowanych zasad/nukleozydów, których obecność jest wynikiem procesu aktywnej demetylacji DNA. W pierwszej pracy z cyklu (Starczak M, Skalska A, et al. *Methods Mol. Biol.* 2021, 2198, R.10) opisany został proces syntezy i oczyszczania znakowanych izotopowo wzorców wewnętrznych do zastosowania w rozdziale chromatograficznym. Do syntezy niekanonicznych zasad azotowych użyto metod opisanych przez Divakara i Reese (1982), Burdzy et al. (2002), a także Rahmana et al. (2001). Procedura syntezy i oczyszczania związków została szczegółowo opisana w postaci protokołu. Dzięki temu uzyskano wszystkie standardy wewnętrzne niezbędne do oznaczania badanych produktów aktywnej demetylacji DNA. W kolejnej pracy (Skalska A, et al. *Methods Mol. Biol.* 2021, 2198, R.9) wykorzystano uzyskane standardy wewnętrzne do optymalizacji techniki 2D-UPLC-MS/MS do oznaczania modyfikowanych zasad i nukleozydów w próbkach moczu, a także HPLC/GC-MS do oznaczania 5-hmUra. Ponownie, procedury analityczne przedstawiono w formie szczegółowego protokołu.

Obie przedstawione prace wskazują, że Doktorantka biegle porusza się w obszarze zaawansowanych technik analitycznych, które zostały wybrane do przeprowadzenia analiz biologicznych. Docenić należy zakres przeprowadzonych prac przygotowawczych, które wymagały poruszania się zarówno w obszarze syntezy organicznej, jak i analizy instrumentalnej. Zdobyte doświadczenie w wykorzystywaniu technik chromatograficznych wskazuje, że Doktorantka stała się specjalistką w tej dziedzinie.

W drugiej części badań Doktorantka wykorzystwała zoptymalizowane techniki chromatograficzne do oznaczenia poziomu modyfikowanych zasad azotowych w próbkach klinicznych krwi i moczu pochodzących od pacjentów z ostrą białaczką szpikową (AML), zespołami mielodysplastycznymi (MDS) lub nowotworami jelita grubego.

Nieprawidłowości białek związanych z metylacją/demetylacją DNA, wynikające z mutacji lub zaburzonej ekspresji kodujących je genów, są często obserwowane u pacjentów z AML i MDS. Spodziewać się zatem można zmian w poziomie modyfikowanych zasad azotowych u chorych. Taka ocena była celem trzeciej publikacji (Skalska-Bugała et al., *Cells*, 2022), w której analizowano materiał w postaci izolatów DNA z próbek krwi (leukocytów) oraz próbek moczu od 65 pacjentów z AML oraz 44 pacjentów z MDS, w porównaniu do 50 osób z grupy kontrolnej. Na uwagę zasługuje nie tylko nakład wykonanej pracy, ale również dbałość o precyzję i wszechstronna analiza danych, z wykorzystaniem różnych metod statystycznych. Zaobserwowane zostały istotne statystycznie różnice w poziomie większości badanych zasad azotowych u chorych w porównaniu do grupy kontrolnej, a w przypadku niektórych modyfikacji także pomiędzy grupami pacjentów z MDS i AML. Przeprowadzone analizy statystyczne wykazały, że zmiany w poziomie wybranych modyfikacji są dobrymi markerami dla MDS i AML. Najciekawszą obserwacją było odnotowanie możliwości wykorzystania zmian w poziomie 5-hmC w DNA z leukocytów, oraz zmian w znormalizowanej na zawartość kreatyniny ilości 5-hmCyt, 5-caCyt i 5-hmU w próbkach moczu do oceny ryzyka transformacji MDS w AML. Szacowanie ryzyka przejścia MDS w AML jest niezwykle istotnym zagadnieniem klinicznym, m.in. ze względu na potencjalne różnice w schematach leczenia pacjentów. Uzyskane wyniki wskazują zatem na identyfikację markerów o możliwym znaczeniu aplikacyjnym.

W ostatniej pracy z cyklu (Skalska-Bugała et al., *Int. J. Mol. Sci.*, 2022) analizie chromatograficznej pod kątem zawartości modyfikowanych zasad azotowych poddano próbki moczu pobrane od pacjentów z nowotworami jelita grubego (CRC, n=121), pacjentów z gruczolakiem okrężnicy (AD, n=65), w porównaniu do pacjentów z nieswoistym zapaleniem jelit (IBD, n=42), a także do osób z grupy kontrolnej (n=45). W stosunku do grupy kontrolnej, zaobserwowano wzrost poziomu 5-hmCyt u pacjentów z CRC oraz wzrost 8-oxodG u pacjentów z CRC lub IBD, a także spadek poziomu 5-fCyt u pacjentów z CRC i AD. Wartościowym uzupełnieniem (być może możliwym do wykonania w przyszłości) byłaby prospektywna analiza pacjentów z IBD oraz AD, co mogłoby ewentualnie wskazać potencjalne markery ryzyka transformacji w kierunku CRC.

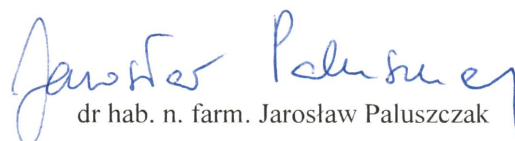
Przedstawione prace nie budzą zastrzeżeń merytorycznych. Zaprezentowane wnioski końcowe (str. 122) są syntetyczne i adekwatne do opisanych danych eksperymentalnych.

Analizując sposób przygotowania rozprawy doktorskiej, w mojej ocenie zabrakło klarownego przedstawienia hipotez badawczych. Ponadto, choć nie budzi wątpliwości, że prace tworzą dobry i spójny cykl, zabrakło jednak w tekście opisu, który wskazywałby powiązania pomiędzy poszczególnymi artykułami. Dodatkowo, niedosyt pozostawia opis zakresu prac wykonanych przez doktorantkę. Ogólne stwierdzenia przedstawione w oświadczeniu na stronie 135 są w mojej ocenie niewystarczające i powinny zostać uzupełnione bardziej szczegółowymi informacjami odnośnie wkładu w powstanie poszczególnych publikacji, szczególnie z uwagi na częściowe nakładanie się zadań pomiędzy współautorami.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że Doktorantka z powodzeniem zrealizowała cele badawcze postawione w rozprawie doktorskiej. Doktorantka opanowała do perfekcji warsztat laboratoryjny w zakresie zaawansowanych technik analizy instrumentalnej. Ponadto wykazała się umiejętnością wszechstronnej analizy danych z wykorzystaniem adekwatnych metod statystycznych. Zaprezentowane wyniki badań mają nie tylko dużą wartość poznawczą, ale również potencjalnie aplikacyjną. Dokumentują oryginalny wkład Doktorantki w poszerzenie wiedzy dotyczącej kompleksowej oceny zmian w profilu modyfikowanych zasad azotowych w materiale biologicznym pozyskiwanym nieinwazyjnie (krew i mocz).

W oparciu o pozytywną ocenę przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej stwierdzam, że Doktorantka spełnia wymogi stawiane kandydatom do uzyskania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu i dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Rekomenduję zatem Radzie Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy dopuszczenie mgr Aleksandry Skalskiej-Bugały do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Poznań, 15.09.2023 r.


dr hab. n. farm. Jarosław Paluszczak