



93-232 Łódź
ul. Lodowa 106

tel.: 042 2723633
fax.: 042 2723630

NIP: 982-03-52-085
REGON: 100492431

Zaopatrzenie
tel.: 042 2723600

Łódź, 21 lipca 2023 r.

dr hab. Agnieszka B. Olejniczak, prof. IBM PAN
Instytut Biologii Medycznej PAN
ul. Lodowa 106
93-232 Łódź,
tel. 42-272-36-37
e-mail: aolejniczak@cbm.pan.pl

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr. Michała Szewczuka

**pt. "Wpływ 5',8-cyklo-2'-deoksypuryn na aktywność glikozylaz
w naprawie uszkodzeń zespolonych DNA"**

**przedstawiona Radzie Nauk Farmaceutycznych Wydziału Farmaceutycznego
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi**

Recenzowana rozprawa doktorska mgr. Michała Szewczuka została wykonana i przygotowana w Zakładzie Bromatologii Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, pod kierunkiem Pana Prof. dr hab. n. farm. Bolesława T. Karwowskiego. W Zespole kierowanym przez prof. B. T. Karwowskiego prowadzone są badania związane m.in. z mechanizmami powstawania i naprawy uszkodzeń zespolonych DNA potwierdzone znaczącymi, międzynarodowymi doniesieniami literaturowymi.

Informacja genetyczna zawarta w komórce, w postaci DNA, narażona jest na ciągłe uszkodzenia, ze względu na wszechobecność czynników mutagennych tak w środowisku życia jak i pracy człowieka. Niewydajne mechanizmy naprawy DNA mogą prowadzić do chorób dziedzicznych, skutkujących przedwczesnym starzeniem się organizmu, zwiększoną wrażliwością na czynniki rakotwórcze, a w efekcie zwiększoną zachorowalnością na nowotwory. Nowa wiedza na temat sposobów reagowania komórki na uszkodzenia DNA, może oznaczać innowacyjne i lepsze możliwości leczenia chorób. Tematyka przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej wpisuje się w nurt badań związanych z oceną aktywności enzymów zaangażowanych w naprawę uszkodzeń DNA.

Dysertacja została przygotowana w sposób tradycyjny, w formie 165-stronicowej rozprawy, na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne, zawierającej



Cel i założenia pracy, Część teoretyczną, Dyskusję, Podsumowanie wyników, Część doświadczalną oraz Dane tabelaryczne i Wykazy skrótów, rysunków i tabel.

Cel i założenia pracy zostały przedstawione zwięźle, czytelnie, uzasadniają celowość przeprowadzonych badań, ich wpływ na rozwój i poszerzenie wiedzy związanej z naprawą uszkodzeń DNA, i są one kontynuacją wcześniejszych badań dotyczących wpływu 5',8-cyklo-2'-deoksyuracyny (cdPus) na system usuwania uszkodzeń DNA poprzez wycinanie zasady (BER). Aby uzyskać nakreślony cel Doktorant założył realizację trzech zadań badawczych.

Na kolejnych stronach pracy znajduje się wykaz osiągnięć Doktoranta zawierający:

- publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej – trzy prace opublikowane w: *Acta Biochimica Polonica* (opublikowana w 2022), *Molecules* (dwie prace opublikowane w 2021 roku), w których mgr M. Szewczuk jest pierwszym autorem;
- pozostałe publikacje naukowe, w których Doktorant jest pierwszym autorem – pięć publikacji opublikowanych w latach 2017-2020: *Molecular Biology Reports*, *Tumor Biology* oraz *Wybrane zagadnienia z zakresu nauk biologicznych i weterynaryjnych* (Wydawnictwo Naukowe Tygiel);
- pozostałe publikacje naukowe, w których Doktorant jest kolejnym autorem – osiem publikacji opublikowanych w latach 2019-2021: *Cells*, *Yale Journal of Biology and Medicine*, *Molecules*, *Cellular and Molecular Life Sciences* *Wybrane zagadnienia z zakresu nauk biologicznych i weterynaryjnych* (Wydawnictwo Naukowe Tygiel), *Nauka i wiedza kluczem do poznania świata cz. 3* (Wydawnictwo Naukowe Intellect).

Dorobek naukowy mgr. M. Szewczuka jest dodatkowo wzbogacony doniesieniami konferencyjnymi zaprezentowanymi w postaci plakatu (dziewięć wystąpień), w latach 2016-2019, na konferencjach krajowych. Wymieniony powyżej dorobek naukowy oceniam wysoko (współautorstwo szesnastu publikacji) i jest to duże osiągnięcie jak na młodego badacza.

Dalsza część pracy to 3. *Część teoretyczna* (33 strony), w której Doktorant opisał tematy związane z uszkodzeniami materiału genetycznego organizmów żywych, czynnikami ryzyka w uszkodzeniach DNA, charakterystyką uszkodzeń z podkreśleniem uszkodzeń DNA będących przedmiotem tej pracy doktorskiej i mechanizmami naprawczymi oraz charakterystyką jednostek chorobowych wywołanych przez DNA. Jest to dobrze i kompetentnie napisany rozdział wsparty dziewięcioma rysunkami i dwoma tabelami. Wprowadza on do dalszych części rozprawy i jednoznacznie przekonuje czytelnika co do ważności podjętego tematu.



93-232 Łódź
ul. Lodowa 106

tel.: 042 2723633
fax.: 042 2723630

NIP: 982-03-52-085
REGON: 100492431

Zaopatrzenie
tel.: 042 2723600

W uwagach krytycznych chciałabym zwrócić uwagę na niektóre rysunki np. 6 i 7, które Doktorant mógł połączyć w jeden, ze względu na powtarzające się struktury związków, natomiast zamieściłabym schemat przedstawiający tworzenie 8-oksodG, w wyniku działania rodnika hydroksylowego, ze względu na wykorzystanie takiego modyfikowanego nukleozydu w dalszych badaniach. Do tej części pracy mam jedno pytanie odnośnie zawartej informacji:

1. *„CdPus powstają w wyniku utraty atomu wodoru z grupy 5'-metylenowej 2'-deoksyrybozy w wyniku aktywności rodnika hydroksylowego ($\cdot\text{OH}$).” (podrozdział 3.3.3.2. 5',8-cyklo-deoksypuryny). Czy tylko pod wpływem działania tego rodnika tworzą cdPus czy też mogą powstawać w wyniku działania innych czynników?*

Proszę o ustosunkowanie się do tego pytania podczas publicznej obrony pracy doktorskiej.

Omówienie wyników przeprowadzonych prac doświadczalnych zostało zawarte w rozdziale 4. *Dyskusja* (45 stron, chociaż uważam, że bardziej fortunną nazwą tego rozdziału byłoby „Wyniki i dyskusja”), a jego swoistą esencję można znaleźć w podrozdziale 4.5. Podsumowanie wyników. Ten rozdział Doktorant rozpoczyna wstępem związanym z zastosowaniem terapeutycznym tematyki poruszonej w części teoretycznej (podrozdział 4.1.). Wiodące podrozdziały tego rozdziału – 4.2., 4.3., 4.4., mają podobną konstrukcję i związane są z badaniem wpływu obecności 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny i 5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyny w dsDNA na aktywność glikozylazy UDG, endonukleazy hAPE1 wobec 2'-deoksyurydyny (podrozdział 4.2.); wpływu obecności 5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyny w dsDNA na aktywność glikozylaz OGG1 i FPG wobec 7,8-dihydro-8-oksoguaniny (podrozdział 4.3.) oraz wpływu obecności 5',8-cyklo-2'-deoksyadenozyny i 5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyny w dsDNA na aktywność endonukleaz restrykcyjnych SspI i BsmAI (podrozdział 4.4.). W każdym z wymienionych podrozdziałów mgr M. Szewczuk zamieścił charakterystykę badanego enzymu wraz ze szczegółowo opisanym mechanizmem jego działania dopełnionym odpowiednimi rysunkami, co było bardzo dobrym pomysłem na właściwe wprowadzenie do przedstawienia wyników przeprowadzonych badań. Następnie zamieszczone zostały otrzymane wyniki uzupełnione rysunkami przedstawiającymi kinetykę reakcji udokumentowaną autoradiogramami oraz wykresami pokazującymi spadek ilości substratu oraz wzrost ilości produktu.

Doktorant wykazał zwiększoną aktywność enzymów UDG i hAPE1 wobec cząsteczek dU jeśli w sekwencji oligonukleotydów są modyfikowane nukleozydy cdPus. Ponadto na aktywność enzymów CDG i hAPE1 ma wpływ izomeria modyfikowanych nukleozydów (5'S-cdA/5'R-cdA oraz 5'S-cdG/5'R-



cdG) oraz pozycja dU w stosunku do cdPus.

W kolejnej części mgr M. Szewczuk zajmował się oceną wpływu aktywności enzymów OGG1 i FPG wobec 7,8-dihydro-8-oksoguanozyny w obecności 5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyny (S-cdG/R-cdG). Doktorant wykazał, że obecność cdG ma wpływ na zwiększoną aktywność badanych enzymów w porównaniu do zastosowanej kontroli oraz diastereoizomeria cdG, z przewagą dla diastereoizomeru R, wpływa na zwiększenie skuteczności działania obu enzymów.

W ostatniej części tego rozdziału mgr M. Szewczuk zajmował się oceną wpływu 5',8-cyklo-2'-deoksyadenizyny i 5',8-cyklo-2'-deoksyguanozyny w dupleksach DNA na aktywność endonukleaz restrykcyjnych SspI i BsmAI oceniając, że miejsce modyfikacji w łańcuchu DNA, w stosunku do sekwencji rozpoznawanej przez enzym oraz miejsca hydrolizy DNA, ma wpływ na aktywność tego enzymu.

Doktorant sformułował jednoznaczne wnioski z tych badań w osobnych podrozdziałach (4.2.4., 4.3.4., 4.4.4.) to zdecydowanie uporządkowało dużą porcję liczbowych informacji zamieszczonych w poprzedzających podrozdziałach.

Proszę o odniesienie się, podczas publicznej obrony pracy doktorskiej, do poniższych pytań/uwag dotyczących tego rozdziału pracy:

- 1. Dlaczego do badań wybrano oligonukleotydy o długości 40 par zasad?*
- 2. Na jakiej podstawie zaprojektowano modyfikowane oligonukleotydy (miejsce rozpoznawalne przez enzym i położenie cdPus) w łańcuch oligonukleotydowym?*
- 3. We wniosku w podrozdziale 4.3.4. „aktywność enzymów OGG1 i FPG wobec cząsteczek 8-oxodG wzrasta względem próby kontrolnej, przy czym w przypadku substratu zawierającego diastereoizomery 5'S-cdG ten wzrost jest większy niż w przypadku substratu zawierającego diastereoizomery 5'R-cdG” raczej powinno być –jest większy niż w przypadku substratu zawierającego diastereoizomery 5'R-cdG niż w przypadku substratu zawierającego diastereoizomery 5'S-cdG.*
- 4. Czy przeprowadzone badania pozwalają na jednoznaczny wniosek w podrozdziale 4.3.4. – „aktywność enzymów OGG1 i FPG jest wyższa wobec cząsteczki 8-oxodG znajdującej się w pozycji +6 nukleotydów względem cdG, bliżej końca 5' nici uszkodzonej? W dysertacji wyniki przedstawione są w odniesieniu do -6/+6(H/ScdG) lub -6/+6(H/RcdG).*



93-232 Łódź
ul. Lodowa 106

tel.: 042 2723633
fax.: 042 2723630

NIP: 982-03-52-085
REGON: 100492431

Zaopatrzenie
tel.: 042 2723600

Podsumowanie wyników, z ich głębszą interpretacją, znajduje się w podrozdziale 4.5. Doktorant starał się wyjaśnić otrzymane wyniki biorąc pod uwagę mechanizm działania badanych enzymów, budowę i stereochemię modyfikowanych oligonukleotydów oraz budowę modyfikowanych nukleozydów.

Prace eksperymentalne zamieszczone zostały w rozdziale 5. *Część doświadczalna* i zawierają opis przeprowadzonych doświadczeń. Badania zostały zaplanowane prawidłowo i wykonane z wykorzystaniem odpowiednich metod i technik badawczych. Ta część jest zredagowana poprawnie i zawiera niezbędne szczegóły do powtórzenia testów. Opis sprzętu, odczynników stosowanych w pracy został przedstawiony w tabelach wraz z ich charakterystyką. To zdecydowanie ułatwia odszukanie potrzebnych informacji.

W trakcie oceny tej części pracy nasunęły mi się pytania:

1. Czy brana była pod uwagę analiza RP-HPLC produktów reakcji enzymatycznych zamiast elektroforezy w żelu poliakryloamidowym co by nie wymagało znakowania gorącym fosforem?
2. Jak udało się precyzyjnie odmierzyć bardzo małą objętość enzymu do reakcji, np. UDG – 0,05, 0,004 μ l? (taka objętość jest zamieszczona w np. Tabelach 18, 19).

Proszę o odniesienie się do tych pytań w trakcie publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

Część doświadczalną pracy uzupełniają *Dane tabelaryczne* (rozdział 6) będące zbiorem 5 tabel, które zawierają wyniki wszystkich przeprowadzonych doświadczeń w ramach zadań badawczych. Następnie Doktorant umieścił *Wykaz skrótów* (rozdział 7), wyjaśnione wyłącznie w języku angielskim, wydaje się w kolejności ich występowania w tekście (bez uporządkowania alfabetycznego). Szkoda, że mgr M. Szewczuk nie podał ich wyjaśnień w języku polskim.

Następnie znajduje się *Wykaz rysunków* (rozdział 8) oraz *Wykaz tabel* (rozdział 9). *Bibliografia* cytowana w pracy (rozdział 10) obejmuje 134 pozycje. Są one anglojęzyczna opublikowane w latach 1993-2022 (około 38% stanowią prace opublikowane w latach 2018-2022). Wszystkie publikacje zostały prawidłowo dobrane i zacytowane. W oddzielnym wykazie podane zostały strony internetowe, z których Doktorant korzystał przygotowując tę pracę.

W dysertacji nie znalazłam streszczenia w języku polskim i angielskim. Streszczenia te znajdują się na załączonej do pracy płycie CD.

Praca napisana jest poprawnym językiem aczkolwiek Doktorant nie uniknął błędów gramatycznych, dużo jest błędów literowych. Niektóre tabele czy rysunki powinny być zamieszczone w innym miejscu w stosunku do ich cytowania w tekście. Doktorant konsekwentnie w całej w dysertacji



93-232 Łódź
ul. Lodowa 106

tel.: 042 2723633
fax.: 042 2723630

NIP: 982-03-52-085
REGON: 100492431

Zaopatrzenie
tel.: 042 2723600

nie stosował akapitów/wcięć akapitowych. Stosowanie wcięć akapitowych jest dzisiaj bardziej liberalne niż dawniej, ale jednak ułatwia porządkowanie i odczytywanie przekazywanej treści. Oczywiście nie umniejsza to zawartości merytorycznej doktoratu, ale zalecam Doktorantowi, na przyszłość, aby zwrócił większą uwagę na te zastrzeżenia przy okazji kolejnych opracowań naukowych

Podsumowanie

Wyniki zamieszczone w rozprawie doktorskiej mgr. Michała Szewczuka zat. *Wpływ 5',8-cyklo-2'-deoksypuryn na aktywność glikozylaz w naprawie uszkodzeń zespolonych DNA* wnoszą nowe informacje związane z uszkodzeniami zespolonymi DNA, działaniem odpowiednich enzymów zaangażowanych w naprawę takich uszkodzeń. Są one oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego i całą pewnością inspirują do stawiania kolejnych wyzwań badawczych. O wartości poznawczej, uzyskanych w pracy doktorskiej, wyników świadczy fakt ich opublikowania w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym.

Stwierdzam, iż rozprawa doktorska Pana mgr Michała Szewczuka, spełnia wszelkie wymagania stawiane pracom doktorskim, określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) a tym samym znacząco przyczynia się do rozwoju dyscypliny nauk farmaceutycznych. W związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr. Michała Szewczuka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.