

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Wójcik
prowadzonej przed Radą Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UŁ

Promotor: prof. dr hab. Janusz Błasiak

Promotor pomocniczy: dr Ewelina Synowiec

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Katarzyny Wójcik została przygotowana w Katedrze Genetyki Molekularnej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UŁ pod kierunkiem prof. Janusza Błasiaka wspomaganego przez dr Ewelinę Synowiec. Wstępne zapoznanie się z rozprawą wskazuje, że pochodzi z ośrodka o zainteresowaniach badawczych w znacznym zakresie pokrywających się z moimi i stosującego zbliżony zestaw technik laboratoryjnych. Własne zainteresowania badawcze i tematyka uprawiana w obrębie mojego zakładu spowodowały, że mogłem czuć się kompetentny do oceny rozprawy przedstawionej do recenzji.

Lubię mieć rozeznanie w dorobku publikacyjnym doktoranta. Przepisy (Dz. Ustaw poz. 1383, 2014) nakazują podać tę informację podczas otwierania przewodu doktorskiego; na dalszych etapach ten nakaz znika. Doktorantka wyraźnie wyczuła moje oczekiwania i włączyła spis do rozprawy. Poza czterema publikacjami wchodzącymi w skład rozprawy - o czym niżej – Doktorantka podaje listę siedmiu prac, które w różnym stopniu wiążą się z tematyką rozwiązywaną w ramach pracy doktorskiej. Cztery z nich ukazały się w czasopismach osiadających współczynnik IF w granicach 1,44 do 2,69. Baza PubMed wskazuje, że dorobek publikacyjny przedstawiał się tak w momencie składania rozprawy a nie było to ostatnie słowa, bo zauważam, że pojawiły się kolejne dwie niezłe pozycje. Mam nadzieję, że prawidłowo rozpoznałem prace Doktorantki, bo K Wójcików w PubMed jest mnogość. W każdym razie jak na etap przed obroną pracy doktorskiej dorobek publikacyjny jest doprawdy bardzo pokaźny i pozwala traktować Doktorantkę już jako bardzo przyzwoicie rozwiniętą młodą adeptkę nauki.

Podano również informację o źródłach finansowania badań oraz wymaganych pozwoleń bioetycznych. W tym ostatnim przypadku przywykłem do uściślenia informacji przynajmniej przez podanie danych formalnych (np. data i numer decyzji). Często decyzja

komisji bioetycznej jest *in corpore* włączana do rozprawy. Uwagę jednak wycofuję znalazłszy stosowną informację w jednej z publikacji (*Int.J.Med.Sci.*, 2014, str. 19 691).

Właściwą rozprawę stanowi cykl bardzo ściśle powiązanych tematycznie 4 publikacji, pochodzących z uznanych recenzowanych czasopism obdarzonych współczynnikiem IF w granicach od 1,78 do 2,72. We wszystkich przypadkach Doktorantka jest pierwszą autorką. Prace ukazały się na przeciągu dwóch lat. W odniesieniu do wspomnianego wcześniej dorobku publikacyjnego w tym samym zakresie a nie włączonego do doktoratu dobór prac jest bardzo właściwy i obejmuje prace najnowsze, najwyżej punktowane i - co ważne - zawiera jedną pracę przeglądową i 3 doświadczałne. W ten sposób nawiązano do tradycyjnych rozpraw, gdzie wymagane było literaturowe wprowadzenie do tematyki badawczej. Ponieważ proste połączenie czterech publikacji może doprowadzić do niewystarczającego przedstawienia spraw ogólniejszych Doktorantka dodała kilkustronicowe opracowanie pozwalające na lepsze odczytanie zwłaszcza celu badań (jasne i przejrzyste sformułowanie) i ostatecznych wniosków.

Zanim przejdę do meritum rozprawy chciałbym nadmienić o konieczności nowego samokreślenia się recenzenta w przypadku rozprawy przygotowanej po nowemu. Ponieważ prace przeszły przez sito recenzentów powoływanych przez redakcje można to odebrać jako (częściowe?) zwolnienie z kolejnego recenzowania [kogo: autora(-ów)? recenzentów? wyników konfrontacji autor-recenzent?]. Pracy może i mniej ale odpowiedzialność podwójna.

Przedmiotem badań było określenie udziału czynnika genetycznego w występowaniu stożka rogówki i dystrofii śródbłonka Fuchsa. Doktorantka w części literaturowej wyraźnie wskazuje na wieloczynnikowe uwarunkowanie badanych schorzeń i ma pełną świadomość, że czynnik genetyczny może współistnieć ze środowiskowymi, nawykowymi i innymi. W każdym razie stan niewiedzy na temat przyczyn schorzeń jest wystarczającym uzasadnieniem podjęcia badań. Autorzy świadomie zdecydowali się na zawężenie pola badań do oceny roli polimorfizmu genów naprawy DNA. Na taką decyzję naprowadza znana w literaturze rola stresu oksydacyjnego. W tytule rozprawy tylko pośrednio jesteśmy naprowadzani na to założenie, chociaż wymienienie enzymów odpowiedzialnych za naprawę uszkodzeń DNA przez wycinanie zasad (BER) a ten mechanizm naprawia małe i oksydacyjne (znaczące nakładanie się pojęć) uszkodzenia cząsteczki DNA pośrednio zorientuje nas na rolę stresu oksydacyjnego.

Materiał badawczy stanowiły leukocyty krwi obwodowej pobieranej od osób ze stożkiem rogówki i dystrofią śródbłonka rogówki Fuchsa (łącznie 250 do 284 przypadków) oraz od osób kontrolnych (n = 322 – 353). Grupę chorych dodatkowo różnicowano na przypadki powiązane rodzinnie i sporadyczne. Materiał i część kliniczną badań zapewniał współpracujący ośrodek warszawski. Liczebność grup jest duża i odpowiada dzisiejszym

oczekiwaniom w badaniach nad rolą polimorfizmu genetycznego w ocenie ryzyka wystąpienia choroby. Z niewyjaśnionych powodów nienajlepiej dobrano grupy badaną i kontrolną pod względem wieku i rozkładu płci, co mogła doprowadzić do kłopotów interpretacyjnych w dyskusji wyników.

Podstawową część badań stanowiło określenie częstości występowania wariantów polimorficznych 6 genów. Dla trzech z nich analizowano po 2 polimorfizmy a więc otrzymujemy analizę 9 miejsc polimorficznych. W tym zagadnieniu zespół prof. Błasiaka ma niekwestionowaną wprawę metodyczną i interpretacyjną z czego Doktorantka mogła obficie korzystać. W ośmiu przypadkach do genotypowania zastosowano analizę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) a w przypadku *NEIL1* posłużono się techniką analizy krzywych topnienia o wysokiej rozdzielczości. Wprowadzenie innej techniki nie powinno prowadzić do rozbieżności wyników zwłaszcza gdy analizę prowadzimy w odniesieniu do poszczególnych genów. Niemniej ciekawi mi przyczyna, dla której nastąpiło takie odstępstwo metodyczne.

Na tej drodze wskazano na polimorfizm genu *FEN1* jako powiązany ze zwiększonym występowaniem stożka rogówki. Cztery dalsze zwiększają lub zmniejszają częstość występowania stożka rogówki. Ponieważ brakuje dowodu na jednogenowe uwarunkowanie wystąpienia stożka rogówki podjęto analizę oddziaływań międzygenowych a ryzykiem wystąpienia choroby. Autorka pisze o obserwacji szeregu asocjacji. Ponieważ jednak odnośne wyniki znajdują się w tabelach jako materiał uzupełniający publikacje *Int. J. Med. Sci.* 2014 a nie pojawiają się w rozprawie dlatego uchylam się od oceny tego zagadnienia.

Natomiast wobec wspomnianego we wprowadzeniu wieloczynnikowego uwarunkowania wystąpienia stożka rogówki Doktorantka zebrała informację o wskaźnikach demograficznych i stylu życia zarówno chorych jak i osób stanowiących grupę kontrolną. Pewnie wbrew oczekiwaniom okazało się, że najwyższym poziomem ryzyka są obarczone osoby, gdzie w rodzinie już występował stożek rogówki a przynajmniej inne zaburzenia widzenia. Ciekawe spostrzeżenie, które na powrót powinno kierować uwagę w stronę czynników genetycznych.

Po stronie ogólniejszej dyskusji rozprawy podnoszę następujące sprawy:

1. Po pierwsze, wszystkie badane geny należą do tzw. genów niskiej penetracji i tym samym wpływ pojedynczego wariantu polimorficznego genu z założenia nie jest duży. Dalej, geny naprawy DNA nie są krańcowo specyficzne i w pewnym zakresie mogą kompensować brak aktywności innego genu. Takie zjawisko może obniżać wartość ustaleń ilościowych. Z drugiej strony oddziaływanie genów w znaczeniu interakcji międzygenowych może intensyfikować efekt ale analiza przedstawiona w pracy nie stanowiła przełomu interpretacyjnego. Ostatecznie, autor badań nad rolą

genów niskiej penetracji może liczyć na włączenie własnych wyników do meta analiz własnych lub innych autorów o dopiero wtedy zbiorcze wyniki oparte o tysiące (dziesiątki tysięcy) przypadków prowadzą do wiarygodnych wyników. Tym stwierdzeniem bynajmniej nie wycofuję wyżej wyrażonego uznania dla przeprowadzenia analizy opartej o materiał pozyskany od setek osób.

2. Podstawowa część badań polegała na pokreśleniu częstości występowania określonych wariantów badanych genów w grupie chorych i grupie kontrolnej wolnej od choroby. Takie podejście jest typowe i jak widać przyjmowane do opublikowania. Jednak ostatnio oczekuje się wzmocnienia wyników na drodze analizy funkcjonalnej. W tym mieści się wykazanie wpływu enzymów, białek kodowanych przez badane geny na szlaki metaboliczne pozostające w związku z wystąpieniem lub przebiegiem choroby, dysfunkcji, defektu pozostającego w zakresie zainteresowań. Nie podejmowano żadnych działań w tym kierunku.
3. Wymieniona przy zbieraniu materiały do badań i traktowana osobno dystrofia śródbłonna Fuchsa trochę umyka uwadze w kolejnych fragmentach pracy.

Pozostaje forma pracy. Jeżeli podstawową masę informacyjną niosą 4 publikacje, to nie można formułować zbyt wielu uwag. Ponadto wiem, że prace wypuszczane przez prof. Błasiaka są należycie wypieszczone pod względem formalnym. Dla obowiązku odnotowuję zamieszczenie formalno-biurokratyczne oświadczeń wymaganych ustawowo i doświadczeniem uczelni.

Kończąc stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Katarzyny Wójcik spełnia ustawowe warunki stawiane pracom doktorskim. Dobra znajomość przedmiotu badań, szeroki zakres eksperymentowania, duża porcja wyników a nade wszystko poszerzenie wiedzy w niszy mało zbadanej a naruszającej zdrowie nosicieli badanego defektu genetycznego stanowią bezsporne walory pracy. Uwagi wyliczone w recenzji żaden sposób nie obniżają rangi pracy. Zauważone niedociągnięcia lokują się na marginesach rozprawy i nie wypaczają pozytywów. Dlatego wnoszę do Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UŁ o dopuszczenie do dalszych etapów przewodu.

Prof. med. dr hab. Krzysztof Szyfter

Poznań, 22.06.2015