

*Prof. dr hab. Ryszard Oliński*

*Katedra Biochemii Klinicznej*

*Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu*

*Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy*

Ocena rozprawy na stopień doktora mgr inż. Katarzyny Wójcik **„Związek zmienności genów naprawy DNA przez wycinanie zasad z występowaniem stożka rogówki i dystrofii śródbłonna rogówki Fuchsa”**

Materiał genetyczny żywych organizmów jest w sposób ciągły narażony na działanie czynników wprowadzających chemiczne modyfikacje. Zarówno czynniki środowiskowe, jak i te powstające jako wynik metabolizmu, mogą generować w każdej komórce, w przeciągu doby tysiące takich zmian. Wiele z nich może powodować trwałe zmiany w cząsteczce DNA, które mogą upośledzić albo pozbawić komórkę, a także organizm, możliwości prawidłowego funkcjonowania. Aby zapobiec utracie lub upośledzeniu funkcjonowania, każda komórka posiada złożone mechanizmy służące do wykrywania i naprawy DNA. Większość komórek ma kilka typów różnych systemów naprawy DNA. Jednym z podstawowych mechanizmów naprawy komórkowego DNA jest naprawa przez wycinanie zasad azotowych (angielska nazwa Base Excision Repair – BER). Znaczenie tego mechanizmu dla życia komórki podkreśla fakt, że całkowity brak jednego z kilku podstawowych komponentów tego systemu (APE1, XRCC1, ligaza I) jest letalny, a spadek aktywności białek uczestniczących w mechanizmie naprawy BER często związany jest z szeregiem patologii lub/i przyspieszonym starzeniem organizmu. W powyżej opisaną tematykę dobrze wpisuje się recenzowana praca doktorska.

Oceniana dysertacja ma niezbyt często spotykany w naszym Kraju układ dla tego typu opracowań. Składa się ze streszczenia, w języku polskim i angielskim, ale jej podstawową częścią są cztery prace opublikowane w dobrych specjalistycznych czasopismach z tzw. „listy filadelfijskiej”. Całość zamykają oświadczenia współautorów publikacji dotyczące udziału/wkładu pracy w powstaniu publikacji. Nie ma wątpliwości, że wkład pracy mgr inż. Katarzyny Wójcik był dominujący w każdej publikacji składającej się na oceniane dzieło.

Streszczenie pracy jest zwięzłym podsumowaniem zarówno części teoretycznej, nawiązującej do tematu dysertacji, jak i krótkim omówieniem wyników, a zakończone jest przedstawieniem wniosków. Streszczenie jest więc, w odczuciu recenzującego, typową rozprawą doktorską podaną w pigułce.

Cel rozprawy został dobrze, precyzyjnie określony przez Autorkę, a jego osiągnięcie udowodnione zostało w zebranych w dysertacji publikacjach.

Treści zawarte w pierwszej, poglądowej, publikacji włączonej do rozprawy doktorskiej opublikowanej w *Int.JMol.Sci* stanowi znakomite wprowadzenie w tematykę rozprawy. Można tutaj znaleźć charakterystykę strasu oksydacyjnego, ale przede wszystkim jego związek z patogenezą stożka rogówki i dystrofią śródbłonka rogówki Fuchsa. Przechodząc do merytorycznej oceny pracy chciałbym podkreślić, że wszystkie rezultaty badań opisane w trzech eksperymentalnych pracach opublikowanych w *Int.JMol.Sci* (dwie prace) i *Cellular. Mol. Biol. Lett.*, oraz w syntetycznej formie, w rozdziale *Streszczenia; Wyniki*, są w pełni oryginalnymi osiągnięciami naukowymi. W najbardziej skondensowanej wersji można je sprowadzić do konkluzji, że zmienność/polimorfizm genów naprawy komórkowego DNA przez wycinanie zasad azotowych może mieć znaczenie w patogenezie stożka rogówki i dystrofii śródbłonka rogówki Fuchsa. Autorka analizowała materiał biologiczny (krew) pobrany od pacjentów ze zdiagnozowanym stożkiem rogówki (279 osób) i dystrofią śródbłonka rogówki Fuchsa (225 osób) oraz osób z grupy kontrolnej, u których

wykluczono obecność tych chorób (322 osoby). Naprawdę imponuje liczebność badanych grup.

Doktorantka zastosowała bardzo trafnie spektrum nowoczesnych technik i testów używanych w dobrych laboratoriach genetyki molekularnej. Zwraca uwagę logiczny i konsekwentny zestaw metod: technika polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (PCR-RELP), metoda analizy krzywych topnienia o wysokiej rozdzielczości i metoda RT-PCR z użyciem sondy TaqMan. Dobór metodyki pozwolił na pełną realizację celów pracy.

Ze szczególnym uznaniem pragnę podkreślić fakt, że do realizacji celów badań Doktorantka przeprowadziła analizy 9 polimorfizmów kluczowych genów, które stanowią podstawowe komponenty mechanizmu naprawy BER.

Tak jak zaznaczyłem powyżej, wszystkie prace składające się na recenzowaną dysertację opublikowano w specjalistycznych czasopismach z „listy filadelfijskiej”, co jest z kolei związane z recenzjami, najczęściej przez wybitnych specjalistów z danej dziedziny. W ten sposób najbardziej istotna część dorobku naukowego Autorki została, wstępnie już raz zweryfikowana.

Nie będę więc w recenzji koncentrował się na detalicznym omawianiu wyników doktoratu. Czytelnik, który chciałby pobieżnie zaznajomić się z rezultatami znajdzie je w streszczeniu zamieszczonym na początku pracy, a w wersji szczegółowej w publikacjach, które są integralną częścią dysertacji.

Prezentacji oryginalnych i bardzo ciekawych rezultatów towarzyszą zwykle pytania i komentarze, co też niniejszym czynię. Jak już podkreśliłem powyżej, główną konkluzją recenzowanej dysertacji jest stwierdzenie, że zmienność/polimorfizm genów naprawy komórkowego DNA przez wycinanie zasad azotowych może mieć znaczenie w patogenezie obu analizowanych patologii. Można się domyślać, że wzmiankowana zmienność jest

bezpośrednio związana z obniżeniem aktywności białek/produktów badanych genów, co z kolei może skutkować wyższym poziomem modyfikacji DNA, a to może prowadzić do generowania mutacji. Najbardziej prawdopodobnym czynnikiem sprawczym takich mutacji wydaje się być stres oksydacyjny, co Doktorantka wielokrotnie sugeruje. Brak jest jednak w pracy bezpośredniej odpowiedzi na pytanie czy stres oksydacyjny obserwowany w obu patologiach jest ich przyczyną czy też skutkiem? Poniżej rozwinięcie tego ciągle nierozstrzygniętego problemu.

Wciąż nieodgadnionym pozostaje fakt, iż ewolucja biochemiczna włączyła w metabolizm komórek proces powstawania wolnych rodników. Tlen, który jest przecież niezbędny dla funkcjonowania organizmów aerobowych, staje się jednocześnie czynnikiem zagrażającym funkcjonowaniu czy nawet istnieniu komórek poprzez reakcję RFT z ich składnikami, prowadząc do modyfikacji i uszkodzeń biomolekuł. Szczególne niebezpieczeństwo dla układów biologicznych niosą ze sobą oksydacyjne uszkodzenia DNA.

Pomimo wielu naukowych ekspertyz dowodzących, iż podwyższony poziom oksydacyjnych uszkodzeń DNA towarzyszy licznym jednostkom chorobowym, wciąż pozostaje nierozstrzygnięte ważne pytanie czy uszkodzenia te są bezpośrednią przyczyną patologii, czy raczej ich skutkiem toczących się procesów chorobowych. Obecnie przeważa pogląd, że w zdecydowanej większości przypadków uszkodzenia DNA pojawiają się jako wynik stresu oksydacyjnego, który jest skutkiem toczących się procesów chorobowych. Dobrym przykładem są tutaj stany zapalne oraz infekcje, którym stany zapalne towarzyszą.

Zanim jednak oznaczanie polimorfizmu genów naprawy oksydacyjnych uszkodzeń DNA stanie się, jak sugeruje Doktorantka, użytecznym klinicznie narzędziem prewencji, diagnozy, oceny stopnia zaawansowania czy progresji choroby, a wreszcie czynnikiem decydującym o rodzaju terapii, metody te muszą być w pełni zewaluowane i zwalidowane.

Koniecznym jest, aby towarzyszyło temu pełniejsze zrozumienie roli RFT i uszkodzeń oksydacyjnych w patogenezie.

Pewien niedosyt budzi brak analiz oksydacyjnych uszkodzeń DNA w badanych grupach. Laboratorium Promotora pracy – prof. J. Błasiaka jest przecież jednym z nielicznych laboratoriów w Polsce, które rutynowo i wiarygodnie takie analizy wykonuje. Brak jest także odniesienia i bardziej szczegółowego omówienia pracy Czerny P. i wsp., (z pracowni Promotora) w której na reprezentacyjnej grupie pacjentów z dystrofią śródłonka rogówki Fuchsa i grupie kontrolnej takie analizy wykonano. (Jedno zdaniowa wzmianka znajduje się tylko w pracy przeglądowej). Dyskusyjny jest także brak odpowiednio wiekowo dobranej grupy kontrolnej dla pacjentów ze stożkiem rogówki; Średni wiek pacjentów to 36 lat, a grupy kontrolnej 63. Tylko częściowo można zaakceptować argumentację prezentowaną na stronie 60 (fragment z Dyskusji artykułu z Cell Mol. Biol Lett); Trudno byłoby rekrutować następną kilkuset osobową grupę kontrolną, wiekowo zbliżoną do grupy pacjentów, to prawda, ale rekrutacja grupy kilkudziesięcioosobowej, byłaby statystycznie akceptowalna i mogłaby rozstrzygnąć powyższe dylematy (?)

Powyższe uwagi/komentarze sprowokowane oryginalnymi i ciekawymi rezultatami i równie ciekawą ich interpretacją mają charakter dyskusyjny/polemiczny i niczym nie umniejszają mojej wysokiej oceny rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Wójcik. W moim przekonaniu obrona pracy będzie dobrym miejscem na wymianę poglądów/dyskusję dotyczącą moich komentarzy.

Wszystkie części rozprawy świadczą o dużej wiedzy Autorki i Jej dojrzałości naukowej, co nieczęsto się zdarza na tym etapie rozwoju. Uważam, że rozprawa, jest oryginalnym osiągnięciem naukowym, wnoszącym nowe dane do wiedzy o biologii

molekularnej i odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim. Dlatego też chciałbym złożyć wyrazy uznania nie tylko dla Doktorantki, ale i dla Promotora pracy.

Uwzględniając wartość poznawczą rozprawy, wykazaną w pracy bardzo dobrą znajomość problematyki badań, wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Katarzyny Wójcik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



*Bydgoszcz 31.08.2015*