



UNIwersytet  
MEDYCZNY  
W ŁODZI



Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Międzywydziałowa Katedra Chemii i Biochemii Medycznej

Łódź, 06.06.2016

Prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterek  
Kierownik Zakładu i Katedry  
Zakład Chemii i Biochemii Klinicznej  
Międzywydziałowa Katedra Chemii i Biochemii Medycznej  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi  
pl. Hallera 1, 90-647, Łódź  
Tel.: (42) 6393306  
Fax: (42) 6331113  
e-mail: ireneusz.majsterek@umed.lodz.pl

## O c e n a

**pracy doktorskiej mgr Piotra Czarnego**

**pt.: „Uszkodzenia i naprawa DNA oraz zmienność genów szlaku naprawy  
DNA przez wycinanie zasad w depresji”**

Zaburzenia depresyjne (ZD, depresja) są ciężką chorobą psychiczną, która według szacunków do 2020, obok chorób niedokrwiennych serca, może stać się jedną z najbardziej ekonomicznie i społecznie problematycznych chorób. Niestety, około jedna trzecia pacjentów nie odpowiada na tradycyjne, farmakologiczne leczenie. Pomimo intensywnych badań, patogeneza ZD nie została do końca poznana. Wiadomo, że u pacjentów cierpiących na tę chorobę występują zaburzenia w ekspresji neuroprzekaźników, zmiany w osi podwzgórze-przysadka-nadnercza, strukturalne i genowe zmiany w obrębie mózgu i stan zapalny. Nieliczne prace wskazują, że obok stanu zapalnego u pacjentów z depresją występują zaburzenie równowagi pro-anty



UNIwersytet  
MEDYCZNY  
W ŁODZI



Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Międzywydziałowa Katedra Chemii i Biochemii Medycznej

oksydacyjnej. Stres oksydacyjny spowodowany jest m.in. zwiększoną produkcją mitochondrialnych reaktywnych form tlenu (RFT), które mogą powodować uszkodzenie DNA prowadząc do niestabilności genomowej. Potwierdza to fakt wykrycia u pacjentów z ZD podwyższonego poziomu 8-oksoguaniny (8-oksoG), markera oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Za usuwanie 8-oksoG w komórkach ssaków odpowiedzialny jest sprawnie działający mechanizm naprawy DNA przez wycinanie zasad azotowych (BER). Zwiększone stężenie 8-oksoG u pacjentów z depresją znaleziono w osoczu, moczu i komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej, co świadczyć może o zaburzonym procesie naprawy BER.

Tematem dysertacji doktorskiej Pana mgr Piotra Czarnego było określenie związku pomiędzy zmiennością genów naprawy DNA, uszkodzeniami DNA i efektywnością ich naprawy, a ryzykiem wystąpienia depresji. Praca doktorska w całości została wykonana w Katedrze Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego, pod kierunkiem Pana dr hab. n. biol. prof. nadzw. UŁ Tomasza Śliwińskiego. Osoba Promotora, który posiada wieloletnie doświadczenie i liczne istotne odkrycia naukowe uzasadnia trafność wyboru tematu i jego realizacji, tym bardziej, iż laboratorium w którym praca była wykonywana posiada możliwość zastosowania metod z zakresu nowoczesnej biologii molekularnej. Praca finansowana był z grantu NCN PRELUDIUM nr DEC-2014/13/N/NZ7/00232 „Uszkodzenia i naprawa mitochondrialnego DNA w depresji”. Ponadto, Doktorant był beneficjentem grantów w ramach dotacji Dziekana Wydziału BiOŚ UŁ dla prac rozwojowych młodych naukowców oraz w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, Poddziałania 8.2.1. projektu Doktoranci – Regionalna Inwestycja w Młodych Naukowców, które realizował dzięki modelowo układającej się współpracy ze swoim Promotorem.

Oceniana rozprawa została złożona jako cykl prac pod wspólnym tytułem „Uszkodzenia i naprawa DNA oraz zmienność genów szlaku naprawy DNA przez





UNIWERSYTET  
MEDYCZNY  
W ŁODZI



Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Międzywydziałowa Katedra Chemii i Biochemii Medycznej

wycinanie zasad w depresji”, w skład której wchodzi 1 praca poglądowa oraz 3 oryginalne prace eksperymentalne.

W pracy poglądowej:

1. Czarny P, Galecki P, Sliwinski T. *Stres oksydacyjny oraz uszkodzenia i naprawa DNA w zaburzeniach depresyjnych. Farmakoterapia w Psychiatrii i Neurologii 2015;31:243–249. 8 pkt*

Doktorant wyczerpująco opracował zagadnienia pozostające w ścisłym związku z wykonywanym projektem badawczym określającym działanie, elementy składowe oraz aktywność komórkową szlaku BER w zaburzeniach depresyjnych.

W pracach oryginalnych:

2. Czarny P, Kwiatkowski D, Kacperska D, Kawczyńska D, Talarowska M, Orzechowska A, Bielecka-Kowalska A, Szemraj J, Galecki P, Śliwiński T. *Elevated level of DNA damage and impaired repair of oxidative DNA damage in patients with recurrent depressive disorder. Med Sci Monit 2015;21:412-8. 15 pkt; IF 1,433; IF 5-letni 1,300.*
3. Czarny P, Kwiatkowski D, Galecki P, Talarowska M, Orzechowska A, Bobinska K, Bielecka-Kowalska A, Szemraj J, Maes M, Su KP, Sliwinski T. *Association between single nucleotide polymorphisms of MUTYH, hOGG1 and NEIL1 genes, and depression. J Affect Disord 2015;184:90-6. 35 pkt; IF 3,383; IF 5-letni 3,940.*
4. Czarny P, Kwiatkowski D, Toma M, Galecki P, Orzechowska A, Bobinska K, Bielecka-Kowalska A, Szemraj J, Berk M, Anderson G, Sliwinski T. *Single-nucleotide polymorphisms of genes involved in repair of oxidative DNA damage and the risk of recurrent depressive disorder. Med Sci Monit DOI: 10.12659/MSM.898091. 15 pkt; IF 1,433; IF 5-letni 1,300.*

analizie poddano poziom uszkodzeń DNA, pęknięć nici, miejsc alkalicznie labilnych



UNIWERSYTET  
MEDYCZNY  
W ŁODZI



Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Międzywydziałowa Katedra Chemii i Biochemii Medycznej

oraz modyfikacji oksydacyjnych puryn i pirymidyn, jak również efektywność naprawy DNA u pacjentów z depresją w porównaniu do grupy kontrolnej bez zaburzeń psychicznych. Umożliwiło to bezpośrednie porównanie poziomu endogennych i indukowanych uszkodzeń DNA pomiędzy pacjentami z depresją, a grupą kontrolną bez zaburzeń psychicznych. Ponadto, możliwe stało się określenie efektywności naprawy DNA pomiędzy pacjentami a kontrolami. Dodatkowo, ze względu na to, że obecność polimorfizmów pojedynczego nukleotydu w genach kodujących białka naprawy może modulować efektywność tej naprawy DNA, zbadane zostało 12 polimorfizmów genów w tym, *hOGG1*, *MUTYH*, *NEIL1*, *APEX1*, *FEN1*, *LIG1*, *LIG3*, *XRCC1*, *PARP1*.

Materiał do badań stanowiło 599 próbek krwi obwodowej pobranych od 288 pacjentów ze zdiagnozowaną depresją oraz od 311 osób bez ZD stanowiących grupę kontrolną we współpracy z zespołem prof. Piotra Gałęckiego, Kierownika Kliniki Psychiatrii Dorosłych Uniwersytetu Medycznego. Pacjenci i grupa kontrolna zostali dopasowani pod względem rozkładu płci oraz wieku. Uczestnicy złożyli pisemną zgodę na uczestnictwo w projekcie po zapoznaniu się z przebiegiem i celem badania zgodnie z protokołem zaaprobowanym przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (No. RNN/70/14/KE).

Uszkodzenia DNA i efektywność ich naprawy została oceniona za pomocą alkalicznej wersji testu kometowego, który rozpoznaje pęknięcia jedno- i dwuniciowe DNA oraz miejsca alkalicznie labilne. W celu wykrycia oksydacyjnych modyfikacji puryn oraz pirymidyn użyto zmodyfikowanego testu kometowego za pomocą, odpowiednio, *hOGG1* i *Nth*. po działaniu nadtlenkiem wodoru w czasie do 120 min inkubacji naprawczej. Natomiast, badanie rozkładu genotypów i alleli badanych polimorfizmów zostało przeprowadzone na wyizolowanym z krwi obwodowej DNA genomowym z użyciem sond TaqMan w łańcuchowej reakcji polimerazy z detekcją





UNIwersytet  
MEDYCZNY  
W ŁODZI



Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Międzywydziałowa Katedra Chemii i Biochemii Medycznej

w czasie rzeczywistym.

W celu porównania poziomu uszkodzeń i efektywności naprawy pomiędzy pacjentami, a grupą kontrolną wykorzystano test t-studenta, jeżeli grupy wykazywały rozkład normalny w teście Shapiro-Wilka lub w odwrotnym przypadku, test Manna-Whitneya. Do analizy statystycznej wyników otrzymanych z genotypowania użyto regresji logistycznej, za pomocą której wyliczono iloraz szans (ang. odds ratio, OR) nieskorygowany i skorygowany dla płci przy przedziale ufności równym 95%.

Wyniki z testu kometowego potwierdziły zwiększoną liczbę uszkodzeń oksydacyjnych DNA u pacjentów z depresją w porównaniu do grupy kontrolnej. Wykazały również podwyższoną obecność innych typów uszkodzeń, takich jak jedno- i dwuniciowe pęknięcia czy miejsca alkalicznie labilne. Co więcej, naprawa zaindukowanych przez nadtlenuk wodoru uszkodzeń przebiegała wolniej u pacjentów, niż w grupie kontrolnej.

W analizie rozkładu genotypów i alleli stwierdzono, że następujące genotypy: G/G NEIL1 c.\*589G>C, T/G APEX1 c.-468T>G, A/A LIG3 c.\*83A>C, C/C LIG3 c.\*50C>T oraz allele: G NEIL1 c.\*589G>C, A LIG3 c.\*83A>C, C LIG3 c.\*50C>T związane są z podwyższonym ryzykiem występowania depresji. Związek z obniżonym ryzykiem wykazywały genotyp C/C NEIL1 c.\*589G>C oraz allele: C NEIL1 c.\*589G>C, C LIG3 c.\*83A>C, T LIG3 c.\*50C>T. Dodatkowo haplotyp CA polimorfizmów c.\*50C>T i c.\*83A>C w genie NEIL1 związany był z podwyższonym ryzykiem zachorowania na ZD, podczas gdy haplotyp TC z obniżonym ryzykiem. Analiza dwugenowa wykazała, że następujące genotypy: 441G>A mogą modulować ryzyko wystąpienia depresji, pomimo, że pojedynczo polimorfizmy te nie wykazywały tego typu zależności.

Należy podkreślić, iż wszystkie wchodzące w skład cyklu prace pierwszoautorskie są wysoko punktowane w skali naukometrycznej, ich ogólna punktacja wynosi 73 pkt MNiSW; IF 6,249; IF 5-letni 6,540 i co najważniejsze stanowią



UNIwersytet  
MEDYCZNY  
W ŁODZI



Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Międzywydziałowa Katedra Chemii i Biochemii Medycznej

doskonałą dokumentację badawczą przeprowadzonych eksperymentów. Ponadto, poza cyklem wchodzącym w skład dysertacji, Doktorant wykazuje się bogatym dorobkiem naukowym w sumie 12 prac, 1 monografia oraz 12 komunikatów na krajowych oraz międzynarodowych konferencjach naukowych o punktacji 368 pkt MNiSW, IF 35.385, IF 5-letni 35,654, podkreślającym wyśmienite przygotowanie Doktoranta do pracy badawczej. Drobne uwagi dotyczące zestawu prac mają charakter edytorski i nie zmieniają wysokiej oceny niniejszej dysertacji. Jestem głęboko przekonany, że stanowi ona dobry przykład samodzielnego rozwiązania określonego problemu badawczego, który ma szansę znaleźć w przyszłości przełożenie w badaniach stosowanych. Przedstawione wyniki stanowią oryginalny wkład mgr Piotra Czarnego w badania nad znaczeniem uszkodzeń DNA i efektywnością ich naprawy dla ryzyka wystąpienia depresji.

Podsumowując, wyniki uzyskane w toku tej dysertacji, potwierdzają obecność uszkodzeń oksydacyjnych oraz innych typów uszkodzeń DNA. Co więcej wskazują, że obecność podwyższonej ilości uszkodzeń DNA w ZD może być spowodowana nie tylko stresem oksydacyjnym, ale również zaburzeniami w naprawie DNA. Dodatkowo, polimorfizmy genów kodujących białka zaangażowane w BER, szlaku w głównej mierze odpowiedzialnego za usuwanie oksydacyjnych uszkodzeń DNA, mogą modulować ryzyko wystąpienia depresji. Tym bardziej więc, na tym zaawansowanym etapie badań, niezwykle istotne jest określenie zależności genotyp-fenotyp zważywszy, że badane polimorfizmy mogą mieć związek z progresją choroby. Dlatego poprosiłem Doktoranta o omówienie możliwych implikacji uzyskanych wyników w korelacji do parametrów choroby oraz zastosowania w praktyce klinicznej. We wniosku końcowym stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa w pełni odpowiada warunkom stawianym dysertacjom doktorskim. Uwzględniając nowatorskie idee i koncepcje badawcze oraz warsztat badawczy zastosowany w pracy, z wielką



UNIWERSYTET  
MEDYCZNY  
W ŁODZI



Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Międzywydziałowa Katedra Chemii i Biochemii Medycznej

przyjemnością przedkładam wniosek o dopuszczenie Pana mgr Piotra Czarnego do dalszych etapów przewodu doktorskiego, oraz występuję do Wysokiej Rady Wydziału o wyróżnienie recenzowanej pracy doktorskiej.

**KIEROWNIK**  
Międzywydziałowej Katedry  
Chemii i Biochemii Medycznej  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

*[Signature]*  
prof. dr hab. n. med. Krzysztof Majsterek