

2014 LIS. 19

Prof. dr hab. Jarosław Dziadek

Kierownik Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium

Instytut Biologii Medycznej PAN

DZIEKAN  
Wydziału Wojskowo-Lekarskiego  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Prof. zw. dr hab. n. med. Jurek Olszewski

Ocena pracy doktorskiej **mgr Anny Merez** „**Znaczenie procesu naprawy DNA oraz polimorfizmów genów mechanizmu wycinania zasad azotowych: *OGG1*, *XRCC1*, *MUTYH*, *ADPRT*, *APE1* w patogenezie neuropatii cukrzycowej**”.

Neuropatia cukrzycowa to zespół kliniczny dotyczący uszkodzenia układu nerwowego będący najczęstszym przewlekłym powikłaniem cukrzycy. Mechanizm powstawania neuropatii nie jest do końca wyjaśniony a obecnie pod uwagę brana jest hipoteza metaboliczna, niedokrwienność oraz udział procesów immunologicznych. Hipoteza metaboliczna zakłada bezpośrednie uszkodzenie nerwów wywołane zaburzeniami metabolicznymi generowanymi przez utrzymującą się w organizmie hiperglikemie. Wydaje się, że ważną rolę w patomechanizmie neuropatii odgrywiają reaktywne formy tlenu, których zwiększony poziom jest generowany przez hiperglikemie prowadzącą do glikacji białek, nasilenia przemian glukozy w cyklu polioliowym, zwiększonego powstawania diacylglicerolu, aktywacji kinazy białkowej C czy zwiększonej aktywności PARP. Nadmiar wolnych rodników powoduje uszkodzenia białek, lipidów, węglowodanów oraz DNA. Uszkodzenia DNA spowodowane obecnością RFT wynikają przede wszystkim z oksydacji zasad azotowych, ale mogą prowadzić również do pojedynczych i podwójnych pęknięć DNA. Podstawowym procesem naprawczym uszkodzeń oksydacyjnych jest system BER. Biorąc pod uwagę potencjalną rolę RFT w patomechanizmie neuropatii cukrzycowej oraz kluczową rolę procesu BER w usuwaniu uszkodzeń oksydacyjnych w DNA, Doktorantka podjęła się bardzo ambitnego zadania próbującego powiązać wydajność procesów naprawy DNA, a także obecność wybranych polimorfizmów genów systemu BER z występowaniem neuropatii cukrzycowej. Wieloletnie doświadczenie w podjętej tematyce pracy, zespołu prof. Ireneusz Majsterka, świetny warsztat naukowy oraz dostęp do bardzo dobrze dobranych, licznych grup kontrolnych i badawczej gwarantowały rzetelną weryfikację postawionej hipotezy badawczej.



Układ tekstu rozprawy jest tradycyjny. Część doświadczalna jest poprzedzona wstępem literaturowym napisanym ładnym językiem naukowym wprowadzającym czytelnika kolejno w definicje, klasyfikacje i patogenezę neuropatii cukrzycowej, źródła i znaczenie wolnych rodników w neuropatii cukrzycowej, hipotezy powstawania neuropatii, mechanizmy naprawy DNA ze szczególnym uwzględnieniem procesu BER. Niezręcznym wydało mi się jedynie stwierdzenie, że jednym z czynników predysponujących do rozwoju cukrzycy typu 2 jest urodzenie dziecka o masie powyżej 4 kg (str. 10), raczej wydaje się, że jest to czynnik jedynie mogący wskazywać na możliwość występowania tego schorzenia. Doktorantka przytacza również dane epidemiologiczne z których wynika, że cukrzycę w Polsce stwierdza się u 2 razy większej części populacji niż średnia dla populacji światowej. **Prosiłbym Doktorantkę o wyjaśnienie skąd w naszej populacji tak wysoki poziom zapadalności na cukrzycę oraz jak sytuacja pod tym względem wygląda w innych krajach europejskich.**

Cele pracy są jasno sformułowane i mają swoje bezpośrednie odzwierciedlenie w prezentowanych wynikach. Wydaje mi się jednak, że Doktorantka skupiła się wyłącznie na celach cząstkowych mówiących nie tyle o postawionej hipotezie badawczej co o konkretnych eksperymentach, które zostały zaplanowane do wykonania. Zabrakło mi więc, jednego ogólnego celu badań, którego realizacja powinna zweryfikować postawioną hipotezę badawczą.

**Prosiłbym Doktorantkę o sformułowanie takiej hipotezy podczas publicznej obrony.**

W rozdziale „Materiały i Metody” Doktorantka zapoznaje czytelnika z zastosowaną metodologią badań. Wszystkie wykorzystywane procedury są dokładnie opisane w sposób umożliwiający ich odtworzenie w innym laboratorium. Na podkreślenie zasługują bardzo dobrze dobrane, liczne grupy, badane oraz kontrolna. W opisanych procedurach jedynie oznaczenie oligonukleotydów w podrozdziale 6.2.4.2. budzi moje wątpliwości, jeden z nich powinien mieć raczej orientację 3'-5'. Metody badań zostały dobrane prawidłowo dla realizacji postawionych celów pracy.

Otrzymane w czasie realizacji badań wyniki dowodzą skutecznej realizacji ambitnych celów pracy. Przedstawiona dokumentacja naukowa oraz przeprowadzona analiza statystyczna wyników dowodzi realizacji poszczególnych etapów pracy i świadczy o bardzo dobrym, metodycznym przygotowaniu autorki.



W pierwszej części badań Doktorantka zastosowała metodę PCR-RFLP dla identyfikacji wybranych polimorfizmów w genach APE, ADPRT, OGG1, MUTYH oraz XRCC1 wśród pacjentów z cukrzycą typu 2, pacjentów z T2DM oraz ze współistniejącą neuropatią oraz dla grupy kontrolnej. Przedstawione, jednoznacznie udokumentowane wyniki badań, wykazały, że spośród badanych polimorfizmów, polimorfizm 399 w genie XRCC1 oraz 726 w genie ADPRT występują częściej w grupie osób z cukrzycą typu 2 oraz z neuropatią cukrzycową w stosunku do grupy kontrolnej. Zależności takich nie zaobserwowano dla innych badanych polimorfizmów. **Czy poznane jest znaczenie tych polimorfizmów (399 w genie XRCC1 oraz 726 w genie ADPRT) dla funkcji obu białek? Jak możemy powiązać funkcje tych białek z mechanizmami powstawania T2DM i/lub T2DM/DSPN?**

W kolejnej części badań przeprowadzonych na limfocytach izolowanych od pacjentów z cukrzycą, cukrzycą i neuropatią oraz na grupie kontrolnej, analizowano poziom uszkodzeń DNA indukowanych przez nadtlenuk wodoru w obecności, i przy braku, endonukleaz Nth i Fpg oraz efektywność ich naprawy. Zastosowany test kometowy pozwolił na ustalenie czasu niezbędnego do naprawy DNA w komórkach badanych i kontrolnych. Otrzymane wyniki wykazały wzrost uszkodzeń DNA u pacjentów z T2DM oraz z neuropatią, ponadto u tej ostatniej grupy pacjentów zaobserwowano również obniżoną efektywność naprawy DNA, wskazujące na udział wolnych rodników w patogenezie neuropatii. **Czy analizowane przez Doktorantkę limfocyty w poszczególnych grupach pochodziły od osób noszących badane polimorfizmy, jeśli tak to czy były one równomiernie rozłożone we wszystkich grupach?** Prosiłbym także Doktorantkę o przedstawienie wyników testów kometowych z poszczególnych grup na jednym wykresie dla danego stężenia  $H_2O_2$  aby lepiej zobrazować różnice pomiędzy grupą kontrolną a komórkami od pacjentów z cukrzycą oraz cukrzycą i neuropatiami. **Czy na otrzymane wyniki nie wpływa endogenne poziomy RFT, prawdopodobnie inny w limfocytach osób z grupy kontrolnej oraz osób z cukrzycą?** **Czy aktywność metaboliczna komórek (np. dostępność ATP) we wszystkich grupach jest jednakowa czy też odmienna w komórkach od pacjentów T2DM, i czy nie wpływa to na przeprowadzone analizy?** W ostatnim etapie badań doktorantka badała efektywność naprawy typu BER z zastosowaniem precyzyjnego testu opartego o pojedyncze uszkodzenie nici DNA. Przeprowadzone badania nie wykazały istotnych statystycznie zależności aktywności systemu BER w stosunku do poszczególnych grup pacjentów. **Czy analizowana grupa pacjentów z cukrzycą była nosicielem polimorfizmu**



**399 w genie XRCC1 lub 726 w genie ADPRT ? Jeśli nie to czy wybór takiej grupy mógłby zmienić wyniki testu ?**

Dyskusja pracy została napisana w sposób bardzo dojrzały, a Doktorantka krytycznie odnosi uzyskane przez siebie wyniki do danych literaturowych. Wskazuje na sprzeczności w literaturze w tym nawet w danych dotyczących populacji polskiej.

Głównym założeniem przeprowadzonych przez Doktorantkę badań było poszukiwanie korelacji pomiędzy polimorfizmami w genach systemu BER oraz występowaniem neuropatii cukrzycowej, co ze względu na udział w tym procesie RFT wydaje się całkowicie zrozumiałe. Możliwe jednak, że rola wolnych rodników w neuropatii cukrzycowej związana jest raczej z uszkodzeniami lipidów lub białek a nie samego DNA. Świadczyłby o tym również fakt korelacji pomiędzy polimorfizmami mogącymi skutkować zmianą poziomu wolnych rodników (syntetaza NO, reduktaza aldozy) ze zwiększonym ryzykiem rozwoju neuropatii. **Proszę Doktorantkę o komentarz do powyższej opinii.** Uszkodzenie DNA pod wpływem zwiększonego poziomu RFT w komórkach pacjentów z cukrzycą bez w pełni sprawnych mechanizmów naprawczych powinno skutkować zwiększoną częstością indukowania procesów nowotworzenia, korelujących z polimorfizmami w genach systemu BER obniżających sprawność tego mechanizmu naprawy DNA. **Czy dla populacji osób chorych na cukrzycę oraz osób z neuropatią cukrzycową prowadzone były takie badania, jeśli tak to polimorfizmy jakich genów wydają się tu najważniejsze ?**

Wnioski wyciągnięte przez autorkę są w pełni uprawnione i mają całkowite pokrycie w przedstawionych danych eksperymentalnych.

**Podsumowanie:**

Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą doktorską Pani mgr Anny Merecz uważam, że ambitne cele rozprawy doktorskiej zostały w pełni osiągnięte a uzyskane wyniki należy uznać za oryginalne i wartościowe. **Wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Wojskowo-Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pani mgr Anny Merecz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Kierownik  
Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium



Prof. dr hab. Jarosław Dziadek