



dziękuję
Wydziału Wojskowo-Lekarskiego
wpłynęło dn. 2016-02-04
podpis ... [signature] ... l.dz. 181

Uniwersytet Łódzki

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Katedra Genetyki Molekularnej

dr hab. Tomasz Śliwiński prof. nadzw. UŁ

Łódź, dnia 29 stycznia 2016 r.

Katedra Genetyki Molekularnej

2016-02-08

Uniwersytetu Łódzkiego

[signature]

DZIEKAN
Wydziału Wojskowo-Lekarskiego
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

O c e n a

Prof. zw. dr hab. t. med. Jurek Ciszewski

pracy doktorskiej mgr Patrycji Banaś-Leżańskiej

pt.: „**OCENA POZIOMU USZKODZEŃ DNA ORAZ POLIMORFIZMÓW GENÓW
METALOPROTEAZ MACIERZOWYCH W JASKRZE PIERWOTNEJ OTWARTEGO
KĄTA**”

Jaskra pierwotna kąta otwartego, określana również jako postępująca neuropatia nerwu wzrokowego, jest najczęstszą postacią jaskry, choroby będącej przyczyną nieodwracalnej utraty wzroku. Patogeneza tej choroby nie jest jak dotąd w pełni poznana i podwyższone ciśnienie uważane jest za główny czynnik ryzyka dla tej odmiany jaskry. To podwyższone ciśnienie może być związane ze zmianami w obrębie macierzy zewnątrzkomórkowej tworzącej sieci beleczkowania kąta przesączania. Zaburzenia te są najczęściej związane z podwyższonym poziomem syntezy składników macierzy, jak również ze zmianami czynników proteolitycznych modyfikujących macierz tj. metaloproteaz macierzowych (MMP) oraz ich tkankowych inhibitorów (TIMP). Wzrost aktywności tych pierwszych przekłada się również na aktywację mikrogleju oraz jest związany z utratą komórek zwojowych siatkówki.

Innym bardzo ważnym aspektem, z punktu widzenia powstawania jaskry, jest to, że długotrwała ekspozycja siatkówki na światło przyczynia się do wzrostu stężenia wolnych rodników w tej części oka. Fotoreceptory siatkówki są szczególnie narażone na uszkodzenia,

powstające w wyniku działania rodników, dlatego też w leczeniu jaskry stosuje się suplementację antyoksydantami istotnie obniżającymi ich poziom.

Ze względu na bardzo ograniczoną wiedzę dotyczącą profilu molekularnego dla genów, kodujących czynniki tj. MMPs oraz TIMP, które mogą być zaangażowane w mechanizmy związane z powstawaniem jaskry, jak również podwyższonego poziomu uszkodzeń oksydacyjnych w komórkach beleczenia u osób z jaskrą, uważam za bardzo zasadne podjęcie badań zaprezentowanych w recenzowanej rozprawie doktorskiej, szczególnie istotnych w przypadku właściwego zrozumienia patologii tego schorzenia, jak i wyznaczenia nowych kierunków terapeutycznych.

Oceniana rozprawa ma typowy układ dysertacji doktorskiej. W części pogładowej (30 stron) Doktorantka opisała kilka zagadnień pozostających w ścisłym związku z wykonywanym projektem badawczym. Mgr Patrycja Banaś-Leżańska szczegółowo opisała epidemiologię jaskry, jak również dokładnie omówiła teorie rozwoju neuropatii jaskrowej oraz czynniki ryzyka rozwoju jaskry pierwotnej. W dalszej części wstępu Doktorantka przybliżyła główne czynniki proteolityczne modyfikujące macierz zewnątrzkomórkową (MMP, TIMP). W części końcowej wstępu Pani magister dokładnie scharakteryzowała reaktywne formy tlenu oraz ich rolę w patogenezie jaskry. Część ta została poparta, bardzo dobrze dobranymi, pozycjami literaturowymi, w większości pochodzącymi z ostatnich kilku lat.

Głównym celem pracy była, niepodjęta do tej pory, ocena związku polimorfizmów genów -735C/T *MMP-2*, -1306C/T *MMP-2*, -181A/G *MMP-7* oraz -418G/C *TIMP-2* z ryzykiem występowania jaskry pierwotnej otwartego kąta, jak również analiza korelacji badanych polimorfizmów z parametrami klinicznymi w ocenie progresji tego schorzenia, czy wreszcie analiza związku mechanizmu naprawy uszkodzeń DNA z ryzykiem występowania jaskry.

Materiał do badań stanowiła pełna krew obwodowa pobrana od 255 osób ze zdiagnozowaną jaskrą pierwotną otwartego kąta. Grupę kontrolną stanowiło 256 osób dobranych pod względem wieku i płci, u których wykluczono choroby oczu. Rekrutacja osób do badań odbywała się w Klinice Okulistyki II Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz Samodzielnego Publicznego Szpitala Okulistycznego w Warszawie. Materiał do badań uzyskano dzięki współpracy z profesorem Jackiem Szaflikiem oraz profesorem Jerzym Szaflikiem. Na badania te została wydana zgoda właściwej Komisji Bioetyki UM w Łodzi.

W swojej pracy Doktorantka zajęła się analizą 4 polimorfizmów dla genów *MMP-2*, *MMP-7* oraz *TIMP-2*, które zostały wybrane z bazy danych NCBI, a które w populacji europejskiej występowały z częstością nie mniejszą niż 1%. Polimorfizmy te poddano analizie z wykorzystaniem metody PCR-RFLP (reakcja łańcuchowa polimerazy-polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych). Dodatkowo analizowano występowanie zależności pomiędzy badanymi polimorfizmami, a parametrami klinicznymi dla tego schorzenia. Oceny uszkodzeń endogennych oraz oksydacyjnych, jak również poziomu tego typu uszkodzeń dokonano przy użyciu testu kometowego. Materiałem do tego typu badań były komórki jednojądrzaste krwi obwodowej pochodzące od pacjentów z jaskrą oraz od osób kontrolnych.

Uzyskane wyniki są jednoznaczne, chociaż niektóre przedstawione reprezentatywne elektroforegramy (rycina 5 i 6) mogłyby być bardziej czytelne, gdyż w formie drukowanej jakość tego typu wyników znacznie się obniża w porównaniu do wersji elektronicznej.

Dobrze zaplanowany projekt badawczy i jego konsekwentna realizacja z wykorzystaniem właściwie dobranych metod, wnikliwa statystyczna ocena otrzymanych wyników zaowocowała uzyskaniem interesujących, oryginalnych ustaleń, m.in. Polimorfizm -1306C/T *MMP-2* może mieć związek z ryzykiem występowania jaskry pierwotnej kąta otwartego.

Ryzyko występowania jaskry pierwotnej otwartego kąta może mieć związek z zaburzeniem systemu naprawy uszkodzeń oksydacyjnych DNA.

Dyskusja jest napisana bardzo dojrzałe, a Doktorantka dokładnie analizuje uzyskane wyniki, na tle wyników podobnych badań wykonanych przez inne zespoły badawcze, oraz co bardzo istotne wyjaśnia mechanizmy mogące leżeć u podstaw zaobserwowanych korelacji.

W pracy znalazły się nieliczne błędy edytorskie, co na tak obszerną rozprawę (118 str.) jest godne podkreślenia.

W tym miejscu z obowiązku recenzenta przedstawiam uwagi dotyczące drobnych, nielicznych uchybień oraz własne sugestie:

W rozdziale materiały i metody przy opisie wyboru polimorfizmów powinna się znaleźć informacja dotycząca w jakich regionach genowych się one znajdują i co może być skutkiem ich występowania (chciałbym, żeby Doktorantka dokonała tej korekty w swojej prezentacji podczas obrony).

Pomimo poprawności merytorycznej wniosku 2 byłbym ostrożny w jego tak stanowczym formułowaniu ze względu na mało liczną grupę, na której wykonano eksperymenty

uprawniające do jego określenia. Dodatkowo dobrze by było uściślić z jakiego typu naprawą potencjalnie mamy tutaj do czynienia. Ta sama uwaga tyczy się pierwszej części wniosku 3. Ze względu na powyższą uwagę czy Doktorantka mogłaby wyjaśnić te dysproporcje w puli materiału badawczego użytego do badania polimorfizmów oraz uszkodzeń i naprawy DNA. Biorąc powyższą uwagę oraz to, że wyniki badań przedstawione w recenzowanej pracy doktorskiej należy uznać za oryginalne i istotne z punktu widzenia diagnostyki oraz potencjalnych terapii jaskry pierwotnej otwartego kąta chciałbym zadać pytanie: czy istnieje możliwość kontynuacji tych wartościowych badań w Międzywydziałowej Katedrze Chemii i Biochemii Medycznej UM, poszerzonych o liczniejszą pulę pacjentów w celu zwiększenia mocy statystycznej badań, co z kolei, w przypadku otrzymania istotnych korelacji, mogłoby w przyszłości pozwolić na zwiększenie grupy markerów diagnostyczno-prognostycznych dla tego typu schorzenia?

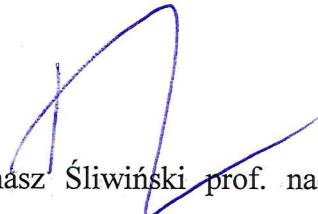
Kierownik zespołu badawczego, prof. dr. hab. n. med. Ireneusz Majsterek, jest uznanym naukowcem o renomie międzynarodowej, zajmującym się różnymi aspektami uszkodzeń oraz naprawy DNA (choć nie tylko) w kontekście wielu patologii występujących w organizmie człowieka, a spod jego ręki uzyskaliśmy szereg bardzo istotnych prac, jak również wypromował On kilku młodych perspektywicznych badaczy. W związku z tym myślę, że te zapoczątkowane przez zespół Profesora, bardzo istotne badania, powinny być kontynuowane, ze względu na to, że mogą przynieść wymierne efekty w postaci zrozumienia mechanizmu tej choroby, jak również proponowania nowych podejść terapeutycznych jaskry.

Pełną, przyszłościową odpowiedź dotyczącą roli uszkodzeń i naprawy DNA w jaskrze uzupełniłyby szczegółowe badania określające mechanizm działania tych czynników w kontekście tej choroby, w tym badania dotyczące ustalenia dokładnego szlaku naprawczego, który może odgrywać tutaj znaczącą rolę (prawdopodobnie naprawa przez wycinanie zasad).

Te drobne uwagi mają charakter roboczy i nie zmieniają mojej wysokiej oceny niniejszej dysertacji. Praca ta stanowi dobry przykład samodzielnego rozwiązania projektu badawczego, mogącego przynieść wymierne efekty praktyczne, w postaci nowych markerów diagnostycznych, niezbędnych we właściwej ocenie ryzyka powstawania jaskry, jak również tworzeniu nowych kierunków terapeutycznych tego schorzenia.

Promotor dysertacji prof. dr. hab. n. med. Ireneusz Majsterek oraz Doktorantka są współtwórcami tej pracy, którą z pełnym przekonaniem można określić mianem sukcesu naukowego, zwłaszcza że uzyskane oryginalne wyniki są unikatowe w skali światowej. Potwierdzeniem mojej tezy jest to, że część wyników uzyskanych podczas realizacji pracy doktorskiej zostało opublikowane w dobrym czasopiśmie z listy JCR.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Uwzględniając idee i koncepcje badawcze oraz warsztat praktyczny zastosowany w pracy, z przyjemnością przedkładam do Wysokiej Rady Wydziału Wojskowo-Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie Pani mgr Patrycji Banaś-Leżańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


dr hab. Tomasz Śliwiński prof. nadzw. UŁ