



Katedra
Wydziału Wojskowo-Lekarskiego
wpłynęło dn. 17. 11. 2016
Uniwersytet podpis..... I.dz. 2402
ŁÓDZKI ea Jędrzejewski

Uniwersytet Łódzki

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Katedra Genetyki Molekularnej

dr hab. Tomasz Popławski, prof. UŁ

Łódź, 10. 11. 2016

**Ocena pracy doktorskiej mgr Magdaleny Jolanty Cuchra
pt. "Znaczenie procesów naprawy DNA oraz polimorfizmów genów mechanizmu
wycinania zasad azotowych (BER): OGG1, XRCC1, MUTYH, ADPRT, APE1 dla rozwoju
jaskry otwartego kąta"**

Przedstawiona mi do recenzji praca dotyczy badań nad znaczeniem procesów naprawy oksydacyjnych uszkodzeń DNA dla prognozowania i terapii jaskry pierwotnej otwartego kąta (JPOK). Celem badań podjętych w pracy była ocena związku wariantów polimorficznych wybranych genów kodujących białka szlaku naprawy DNA przez wycinanie zasad (BER) oraz ich kombinacji z ryzykiem wystąpienia JPOK oraz określenie roli efektywności BER dla prognozowania i terapii JPOK. Przedstawiony cel uważam w pełni za uzasadniony z kilku powodów. JPOK jest zaliczana do grupy chorób społecznych nie tylko z powodu znaczącej liczby przypadków wystąpienia tej choroby, jej konsekwencji ale również z faktu nie poznanej etiologii. Do chwili obecnej nie udało się ustalić zarówno charakteru dynamiki rozwoju i przebiegu tej choroby jak i czynników rozwoju. Sugeruje się, że najważniejszym czynnikiem ryzyka rozwoju JPOK jest podwyższone ciśnienie wewnątrzgałkowe a spośród kilkunastu hipotez dotyczących rozwoju JPOK na czoło obecnie wysunęła się teoria stresu oksydacyjnego w rozwoju jaskry.

Materiał do badań stanowiły komórki jednojądrzaste izolowane z krwi pacjentów z JPOK. DNA do badań został wyizolowany z komórek jednojądrzastych krwi otrzymanej od 422 pacjentów oraz 464 osób u których nie zdiagnozowano JPOK. Dużą wartością pracy jest dokładna, szeroka charakterystyka pacjentów obejmująca nie tylko parametry kliniczne JPOK ale również historię rodzinną.

W części eksperymentalnej pracy oceniono rozkład genotypów i częstość alleli wariantów polimorficznych oraz ich kombinacji, kluczowych genów kodujących białka BER: XRCC1, OGG1, MUTYH, ADPRT i APE1. Analizowano dwa polimorfizmy genu XRCC1 oraz jeden polimorfizm pozostałych genów. Metodą użytą do genotypowania badanych polimorfizmów była reakcja RFLP-PCR. Efektywność naprawy i uszkodzeń DNA oceniano metodą elektroforezy pojedynczych komórek oraz funkcjonalnych testów analizujących aktywność systemu naprawy BER.

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano związek pomiędzy badanym polimorfizmem genu XRCC1 a rozwojem JPOK. Polimorfizm ten nieznacznie zwiększał ryzyko wystąpienia JPOK u nosicieli niekorzystnego genotypu. Interesujące są też wyniki w których podjęto próbę korelacji badanych genotypów z parametrami klinicznymi choroby. Z ich analizy wynika, że badane polimorfizmy genów XRCC1, ADPRT podnoszą ryzyko progresji JPOK a badany polimorfizm genu APE1 obniża. Odwrotną korelację mgr Magda Cuchra stwierdziła zestawiając grubość warstwy włókien nerwowych z badanymi polimorfizmami. Myślę, że publiczna obrona

pracy będzie dobrym forum na wyjaśnienie przez Doktorantkę tych pozornie wykluczających się wyników. Komórki jednojądrzaste izolowane z krwi obwodowej od pacjentów z JPOK charakteryzowały się zwiększoną ilością endogennych uszkodzeń DNA. Uszkodzenia te w większości mają charakter oksydacyjny, co Doktorantka potwierdziła stosując enzymy FPG i NTH. Szczególnie interesujące są natomiast wyniki wskazujące na niższą efektywność naprawy BER w komórkach izolowanych od pacjentów z JPOK w porównaniu do komórek izolowanych od osób bez tej choroby. BER jest przecież głównym systemem naprawy DNA zaangażowanym w naprawę uszkodzeń DNA indukowanych stresem oksydacyjnym, co potwierdza teorię stresu oksydacyjnego w rozwoju jaskry. Tą część pracy, oceniam bardzo wysoko, nie tylko z powodu wagi osiągnięć naukowych ale również z faktu zastosowanych metod wymagających perfekcyjnego opanowania warsztatu biologii molekularnej, czego potwierdzeniem jest publikacja tej części wyników w *Mutation Research*.

Szkoda, że mgr Magda Cuchra nie zdecydowała się na zestawienie wyników genotypowania z wynikami analizy uszkodzeń i naprawy DNA.

Podsumowując część doświadczalną pracy chciałbym podkreślić, że wyniki te są wyjątkowo cenne, mają bowiem przełożenie kliniczne wskazując ewentualną drogę prewencji JPOK.

Oceniając formalną stronę pracy stwierdzam, że praca jest napisana i zredagowana poprawnie z jednym wyjątkiem. Wyjątek ten dotyczy dość dużej liczby błędów edytorskich (literówek), które czasami zmieniają sens wyrazu (np. klastrogenne zamiast klastogenne, str. 52). Oceniana rozprawa doktorska ma typowy układ. We wstępie teoretycznym przedstawiono aktualną wiedzę dotyczącą epidemiologii oraz etiologii jaskry pierwotnej otwartego kąta. Mgr Magdalena Cuchra opisuje w nim również stres oksydacyjny i naprawę uszkodzeń DNA przez wycinanie zasad. Cele pracy są jasno i zwięźle przedstawione - nie ma wątpliwości do czego dąży mgr Magdalena Cuchra.

Metody stosowane w pracy opisane są przejrzysto, czytelnik nie będzie miał według mojej oceny problemów z powtórzeniem wszystkich procedur opisanych w pracy.

Wyniki są na ogół przedstawione czytelnie, w postaci 27 tabel, 9 wykresów i 6 rycin/elektroforegramów.

W rozdziale Dyskusja Doktorantka umiejętnie konfrontuje otrzymane wyniki z wynikami innych autorów. Co ważne, w Dyskusji mgr Magdalena Cuchra nie tylko podsumowała najważniejsze własne rezultaty, ale sformułował także bardziej ogólne, uprawnione wnioski i hipotezy w oparciu o własne wyniki oraz zgromadzoną wiedzę w literaturze przedmiotu. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka sformułowała dwa wnioski trafnie oceniające istotę przeprowadzonych badań. Trzeci wniosek jest ogólny i jest bardzo dobrym punktem wyjścia do dalszych badań. Prosiłbym Doktorantkę o jego doprecyzowanie podczas publicznej obrony. Obszerne piśmiennictwo pochodzi w większości z ostatnich 10 lat, zostało właściwie dobrane i zacytowane w pracy.

Jako że, recenzent musi pokazać swoją wnikliwość mam kilka uwag/komentarzy do recenzowanej pracy.

1. Autorka musi popracować nad stylem naukowym. Praca naukowa ma swój specyficzny styl. Styl, który jest prosty i jednoznaczny, co oznacza, że praca powinna być napisana krótko, zwięźle i być pozbawiona niepotrzebnych, nic nie wnoszących słów, zwrotów i kwiecistości (Autorka nadużywa w pracy zwrotu „co więcej”). Treść pracy powinna być starannie wyselekcjonowana, to znaczy pozbawiona wiadomości nieistotnych dla prezentowanej pracy. Dotyczy to szczególnie Wstępu i Dyskusji. Lepiej jest zrezygnować z kilku paragrafów czy podrozdziałów kosztem lepszej przejrzystości pracy jako całości. Tym samym ze Wstępu liczącego 64 strony usunąłbym informacje dotyczące np.: jaskry innej niż pierwotna czy też endogennych źródeł reaktywnych form tlenu. Skróciłbym też pozostałe rozdziały dotyczące uszkodzenia i naprawy DNA zawierające informacje takie jak na przykład opis typu uszkodzeń indukowanych przez promieniowanie jonizujące wstawiony pomiędzy informacje dotyczące oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Czasami Autorka podąża w drugą stronę i jest zbyt oszczędna – dlatego proszę Doktorantkę o rozwinięcie skrótów myślowych takich jak: „wprowadzanie błędnych adduktów” i „spontaniczna generacja miejsc AP” (str. 48), „uszkodzone wiązanie deoksyrybozy” (str. 38), „która część uszkodzeń DNA jest silnie

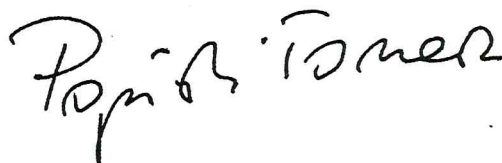
toksyczna a która silnie mutagenna” (str. 38), „indukcja mutacji GC>TA podczas łączenia się 8-oxoG z adeniną w czasie replikacji” (str. 49) czy też „wysoce mutagennej zmiany T>C do której dochodzi podczas blokady replisomu przez glikol tyminy”.

2. W pracy brakuje informacji na temat sprawdzania założeń do testu T-Studenta. Doktorantka prawidłowo zastosowała do analizy korelacji polimorfizmów z parametrami klinicznymi jaskry test χ^2 ale czy nie lepiej byłoby tu zastosować analizę za pomocą regresji logistycznej obejmującą wszystkie czynniki genetyczne i niegenetyczne? Dyskusyjne jest używanie SEM na wykresach zamiast SD, gdyż SD razem z średnią jest parametrem należącym do grupy statystyk tzw. opisowych, do których nie zaliczamy SEM. Opis ryciny 10.7 jest błędny.

3. Dyskusyjne jest też stwierdzenie, że „limfocyty osób chorych na JPOK wykazały brak naprawy po 120 minutach inkubacji naprawczej” jak i „limfocyty osób chorych na JPOK są bardziej wrażliwe na działanie nadtlenu wodoru” (Rycina 10.6 i 10.9).

Powyższe uwagi te nie mają wpływu na pozytywną ocenę całości pracy. O dużej randze prowadzonych badań świadczy fakt, iż były one finansowane ze środków finansowych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona mi do oceny praca ma wysoką wartość poznawczą. Przedstawione w niej wyniki analiz przeprowadzonych na unikatowym materiale badawczym, stanowią oryginalny wkład do badań nad JPOK. Doktorantka wykazała się wyjątkowym przygotowaniem teoretycznym w zakresie badanych zagadnień oraz przeprowadziła pracochłonne badania eksperymentalne, wymagające doświadczenia z zakresu technik molekularnych i cytogenetycznych. Wniosek ten potwierdza analiza Jej dorobku publikacyjnego. Obejmuje on 13 prac eksperymentalnych w większości opublikowanych w czasopiśmie z określonym współczynnikiem oddziaływania (IF). Uważam, że rozprawa doktorska mgr Magdaleny Cuchra spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Wojskowo-Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. prof. nadzw. UŁ Tomasz Popławski