



Prof. dr hab. Jarosław Dziadek
Kierownik Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium
Instytut Biologii Medycznej PAN

Dziekanat
Wydziału Wojskowo-Lekarskiego
wpłynęło dn. 09.12.2016
podpis  l.dz. 4398

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

Materiał genetyczny wszystkich komórek organizmu narażony jest na ciągłe działanie licznych czynników mutagennych pochodzenia endo- oraz egzogenne. Jednym z ważniejszych czynników generujących uszkodzenia zasad azotowych są reaktywne formy tlenu i azotu. RFT generowane są w wyniku działania promieniowania UV, X oraz gamma, ale także produkowane są podczas stanów zapalnych przez neutrofile i makrofagi. RFT powstają również endogennie w procesach fosforylacji oksydacyjnej zachodzącej w mitochondriach. Obecność wolnych rodników związana z uszkodzeniami oksydacyjnymi puryn lub pirymidyn, może prowadzić do powstania jedno- lub dwuniciowych pęknięć DNA. Najczęstszym uszkodzeniem oksydacyjnym w komórce jest utlenienie guaniny do 8-oxoG, które ma charakter zarówno cytotoksyczny jak i mutagenny. Przed akumulacją uszkodzeń w DNA, komórki chronione są dzięki systemom naprawy DNA. Nieprawidłowo funkcjonujące systemy naprawy DNA zwiększają ryzyko wystąpienia wielu chorób nowotworowych a także chorób o podłożu neurodegeneracyjnym. Naprawy DNA związane z uszkodzeniami zasad azotowych, w tym uszkodzeniami oksydacyjnymi, przeprowadzane są przez system BER a zaburzenia w prawidłowym funkcjonowaniu tego systemu mogą wiązać się ze zwiększeniem zapadalności lub progresją tych chorób. Uszkodzenia oksydacyjne wiąże się także z chorobami oczu takimi jak jaskra, zaćma czy zwyrodnienie plamki żółtej.

Biorąc pod uwagę potencjalną rolę RFT w patomechanizmie jaskry pierwotnej otwartego kąta 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

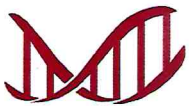


występowaniem tej jednostki chorobowej. Wieloletnie doświadczenie w podjętej tematyce pracy, zespołu prof. Ireneusz Majsterka, świetny warsztat naukowy oraz dostęp do bardzo dobrze dobranych, licznych grup kontrolnej i badanej gwarantowały rzetelną weryfikację postawionej hipotezy badawczej.

Układ tekstu rozprawy jest tradycyjny. Część doświadczalna jest poprzedzona wstępem literaturowym wprowadzającym czytelnika kolejno w definicje i klasyfikacje jaskry, epidemiologie, czynniki ryzyka rozwoju JPOK, stres oksydacyjny, uszkodzenia DNA, bariery antyoksydacyjne, naprawy DNA. Ze względu na sformułowany cel pracy szczególnie dużo miejsca Doktorantka poświęca mechanizmom naprawy DNA przez wycinanie zasad azotowych opisując molekularne mechanizmy procesu naprawy, znaczenie systemu BER w chorobach neurodegeneracyjnych, oraz poszczególne geny i ich produkty zaangażowane w system BER. Moją wysoką ocenę merytoryczną tej części pracy nieco obniżają liczne błędy językowe, których nie udało się wyeliminować podczas redakcji tekstu. Pod względem merytorycznym nie mogę się jedynie zgodzić z twierdzeniem Autorki (str. 43), „... makrofagi i neutrofile generują RFT w celu zniszczenia komórek bakteryjnych, które następnie usuwane są na drodze fagocytozy.” Oczywiście najpierw mikroorganizmy są fagocytowane przez komórki żerne a następnie w fagosomach i fagolizosomach zabijane w mechanizmach zależnych i niezależnych od tlenu. Doktorantka opisując endogenne źródła RFT pisze (str. 39), że „Większość RFT generowanych jest na drodze metabolizmu komórkowego, powstają one głównie w procesie fosforylacji oksydacyjnej zachodzącej w mitochondriach”. **Skoro endogenne RFT powstają głównie w mitochondriach to czy poziom uszkodzeń oksydacyjnych DNA mitochondrialnego w komórkach prawidłowych jest wyższy niż w przypadku jądrowego DNA tych samych komórek ?**

Cele pracy są jasno sformułowane i mają swoje bezpośrednie odzwierciedlenie w prezentowanych wynikach. Ponadto Doktorantka w przekonujący sposób uzasadnia podjęcie się realizacji wybranej tematyki badań.

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 prawie 900-osobowa grupa osób włączonych do badań (w grupie kontrolnej i badanej), a także szczegółowe badania kliniczne jakim zostały te osoby poddane. Zastanawia mnie jedynie czy pewnym



ograniczeniem w interpretacji wyników nie jest fakt, że grupa kontrolna została wyselekcjonowana spośród pacjentów u których co prawda nie stwierdzono objawów JPOK, czy innych chorób okulistycznych i neurodegeneracyjnych, ale z określonych powodów zgłosiły się do szpitala okulistycznego. Z tego samego powodu niepokoi mnie również fakt wysokiego odsetka osób z cukrzycą typu 2 (1/3) w grupie kontrolnej. **Proszę Doktorantkę o rozwianie moich wątpliwości podczas publicznej obrony.** Metody badań zostały dobrane prawidłowo dla realizacji postawionych celów pracy. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka w swoich badaniach nie ograniczyła się do charakterystyki obecności badanych polimorfizmów u osób z grupy kontrolnej i badanej, ale podjęła się znacznie trudniejszej metodycznie oceny poziomu uszkodzenia DNA izolowanego z krwi osób zdrowych oraz z krwi osób z JPOK oraz dynamiki naprawy indukowanych uszkodzeń oksydacyjnych DNA.

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 kodujących podstawowe białka zaangażowane w system BER: XRCC1, OGG1, MUTYH, ADPRT i APE1 wśród pacjentów z JPOK oraz w grupie kontrolnej. Przedstawione, jednoznacznie udokumentowane wyniki badań, wykazały, że spośród badanych polimorfizmów, polimorfizm 399 Arg/Gln lub Gln w genie *XRCC1* może być związany ze zwiększonym ryzykiem rozwoju jaskry pierwotnej otwartego kąta. Zależności takich nie obserwowano dla pozostałych badanych polimorfizmów. O znaczeniu polimorfizmu 399 Arg/Gln u pacjentów z JPOK mogą świadczyć również analizy układów dwugenowych, gdzie istotność statystyczną wskazującą na zwiększenie prawdopodobieństwa zachorowania na JPOK obserwowano wyłącznie w obecności tego polimorfizmu. Polimorfizm 399 Gln genu *XRCC1* Doktorantka wiąże również z podwyższonym ryzykiem progresji JPOK po przeprowadzonych analizach badań klinicznych, stosunku średnicy zagłębienia do średnicy tarczy nerwu wzrokowego. Pozostałe badania kliniczne takie jak ocena pola widzenia czy grubości warstwy włókien nerwowych mogące również świadczyć o progresji JPOK nie potwierdzają znaczenia tego polimorfizmu, a wskazują natomiast rolę polimorfizmów w genach ADPRT oraz APE1. **Jeśli progresja JPOK jest efektem pośrednim i wynika z zaburzonego**



procesu naprawy BER w odpowiedzi na uszkodzenia oksydacyjne to jak tłumaczyć obserwowane rozbieżności przy analizie różnych parametrów JPOK? Z danych literaturowych, przytaczanych przez Doktorantkę w Dyskusji pracy, wynika, że XRCC1 nie posiada aktywności enzymatycznej a stanowi „rusztowanie” dla innych białek systemu BER, natomiast polimorfizm 399 występuje w domenie BRCT1 odpowiedzialnej za oddziaływanie z białkiem ADPRT. Czy znana jest siła oddziaływania białka XRCC1 oraz jego wariantów polimorficznych z białkiem ADPRT i/lub innymi białkami systemu BER? Czy wybrane do badań polimorfizmy pozostałych genów obniżają aktywność enzymatyczną ich produktów lub oddziaływania z innymi białkami systemu BER ?

W kolejnej części badań przeprowadzonych na limfocytach izolowanych od pacjentów z grupy kontrolnej i badanej analizowano poziom uszkodzeń DNA indukowanych przez nadtlenuk wodoru oraz endogennych uszkodzeń oksydacyjnych, a także kinetykę ich naprawy. Podstawowe uszkodzenia DNA jak i uszkodzenia indukowane nadtlenukiem wodoru były badane z zastosowaniem testu kometowego oraz jego zmodyfikowanej formy z wykorzystaniem enzymów rozpoznających utlenione puryny i pirymidyny. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują na podwyższony poziom uszkodzeń podstawowych i indukowanych a także uszkodzeń endogennych rozpoznawanych przez enzym Fpg w limfocytach pacjentów z JPOK. Również kinetyka naprawy uszkodzeń DNA w limfocytach osób zdrowych była znacznie szybsza niż w komórkach izolowanych z krwi osób z JPOK. Efekt ten byłby jeszcze wyraźniej widoczny gdyby Doktorantka umieściła na jednym wykresie dane uzyskane dla grupy badanej i kontrolnej dla danego stężenia nadtlenuku wodoru a nie jak w przypadku Rycin 10.9 – 10.14 rozdzielała grupy badane i kontrolne na różnych wykresach. Doktorantka przeprowadziła także ocenę efektywności naprawy z zastosowaniem wyznakowanych oligonukleotydów zawierających uracyl wbudowanych do plazmidowego DNA. Również w tej analizie okazało się, że efektywność naprawy limfocytów od osób zdrowych jest wyższa niż komórek pozyskanych od pacjentów JPOK. Przesadą wydaje mi się jedynie określanie efektywności naprawy z dokładnością do tysięcznych części jedności (np. 68,270%) gdzie błąd pomiaru wynosi zapewne przynajmniej kilka procent. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazujące na osłabione zdolności do naprawy DNA przez limfocyty pochodzące od osób chorych na JPOK potwierdzają teorię wskazującą na rolę RFT w progresji tego schorzenia. W aspekcie prowadzonych przez Doktorantkę badań, ciekawym byłoby również określenie poziomu uszkodzeń oksydacyjnych



DNA oraz zdolności naprawczych w odniesieniu do badanych polimorfizmów. **Czy Doktorantka prowadziła takie analizy lub spotkała się z takimi badaniami w literaturze ?**

Dyskusja pracy została napisana w sposób bardzo dojrzały, a Doktorantka krytycznie odnosi uzyskane przez siebie wyniki do danych literaturowych. W dyskusji uzasadniono również wybór określonych polimorfizmów do badań w aspekcie JPOK. Zaburzenia w naprawach uszkodzeń oksydacyjnych powodują akumulacje mutacji, które mogą prowadzić do procesu nowotworzenia. **Czy wśród osób ze zdiagnozowaną JPOK obserwuje się większą zapadalność na nowotwory niż w pozostałej części populacji ?**

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 Magdy Jolanty Cuchra 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 Magdy Jolanty Cuchra do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Kierownik
Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium

Prof. dr hab. Jarosław Dziadek

